

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель
К.т.н, доцент
Марквичев Николай Семенович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ.....	6
Актуальность темы исследования.....	7
Степень разработанности темы	7
Цель и задачи работы.....	8
Методология и методы исследования.....	9
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость	10
Личный вклад автора	10
Положения, выносимые на защиту:	10
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	11
Степень достоверности и апробация результатов	11
Публикации.....	12
Благодарности.....	12
Объем и структура диссертации.....	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Корневые экссудаты	13
1.1.1 Механизм корневой экссудации	13
1.1.2 Ризосферные взаимодействия.....	14
1.1.2.1 Корневые экссудаты, участвующие в растительно-микробном взаимодействии	14
1.1.2.1.1 Взаимодействие микроорганизмов на фоне метаболизма экссудатов корневой системы растений	14
1.1.2.2 Углеводы и аминокислоты.....	15
1.1.2.3 Вторичные метаболиты и гормоны	17
1.1.2.4 Вещества белковой природы	18
1.2 Влияние условий окружающей среды на растение	18
1.2.1 Растительно-микробные взаимодействия при стрессах.....	20
1.2.1.1 Абиотический стресс	20
1.2.1.1.1 Засухи и их влияние на урожайность.....	20
1.2.1.1.2 Солевой стресс.....	22
1.2.1.1.3 Стресс, вызванный тяжелыми металлами	24

1.2.1.1.4 Температурный стресс.....	24
1.2.1.2 Биотический стресс и здоровье растений.....	26
1.2.1.2.1 Механизм биотической стрессоустойчивости.....	27
1.2.1.2.2 Индуцированная системная устойчивость растений при биотическом стрессе.....	28
1.2.1.2.3 Системная приобретённая устойчивость.....	28
1.3 Роль сахаров при абиотических стрессах растений.....	29
1.3.1 Метаболизм сахаров, важных при абиотическом стрессе.....	30
1.3.2 Удаление активных форм кислорода.....	32
1.3.3 Сахара как осмо-протекторы.....	33
1.3.4 Сахара как сигнальные молекулы.....	33
1.4 Современное состояние вопроса теории фитопатогенеза.....	34
Понимание лежащих в основе способов действия на фитопатогенез имеют решающее значение для преодоления сложившихся проблем.....	35
1.4.1 Фитопатогенез грибов и оомицетов.....	37
1.4.1.1 Характеристика грибов и оомицетов – фитопатогенов растений.....	38
1.4.1.2 Стратегии атаки грибковых и оомицетных инфекций, механизмы защиты растения.....	39
1.4.1.3 Факторы специфичности растения-хозяина у фитопатогенных грибов.....	41
1.5 Биологическая защита растений.....	43
1.5.1 Механизмы, используемые агентами биологического контроля для борьбы с болезнями растений.....	45
1.5.2 Скрининг потенциальных агентов биологического контроля.....	47
Заключение по обзору литературы.....	50
ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	52
2.1 Объекты исследования.....	52
2.2 Питательные среды для культивирования и поддержки микроорганизмов.....	55
2.3 Методы стерилизации.....	56
2.4 Определение концентрации грибов при глубинном культивировании.....	57
2.5 Микроскопирование методом раздавленной капли.....	57
2.6 Периодическое глубинное культивирование <i>T. viride</i> F2001 и <i>F. oxysporum</i> F2106 в условиях качалочного эксперимента.....	57
2.7 Метод определения фитотоксичности растворов.....	57
2.8 Метод стерильного выращивания огурца.....	58
2.9 Метод определения концентрации редуцирующих веществ.....	58

2.10	Метод определения целлюлолитической активности	59
2.11	Метод определения протеолитической активности по казеину.....	60
2.12	Метод определения концентрации экссудатов	61
2.13	Анализ состава экссудатов огурца	62
2.14	Метод встречных колоний	63
2.16	Определение абсолютно сухого веса растений (АСВ растений)	64
2.17	Обработка результатов экспериментов.....	64
	ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	65
3.1	Исследование экссудации растений огурца	66
3.1.1	Изучение секреции экссудатов и влияния экссудатов на растение	66
3.1.2	Анализ состава и количества экссудатов огурца гибрида F ₁ Атлет при выращивании растений.....	71
3.1.3	Оценка модельного раствора экссудатов в качестве основной среды для изучения развития и взаимодействия грибов.	74
	Время после высадки растений в минераловатный субстрат, сутки	76
3.1.4	Сравнение модельного раствора экссудатов с экссудатами корневой системы растений огурца гибрида F ₁ Атлет.....	78
3.2	Изучение развитие микроорганизмов на экссудатах корневой системы огурца.	80
3.2.1	Изучение развитие микроорганизмов на экссудатах огурца при поверхностном культивировании	81
3.2.2	Изучение особенностей развития и взаимодействия колоний грибов в условиях поверхностного культивирования при метаболизме модельного раствора экссудатов огурца.....	84
3.2.3	Изучение развития спорных форм <i>F. oxysporum</i> и <i>T. viride</i> при метаболизме модельного раствора экссудатов растений огурца гибрида F ₁ Атлет	87
3.3	Экспериментальное моделирование взаимодействий грибов и растений в ризосфере	97
3.3.1	Культивирование с непрерывной подачей компонентов питания.....	97
3.3.1.1	Описание установки для поверхностного культивирования с непрерывной подачей компонентов питания.....	97
3.3.1.2.	Исследование роста <i>F. oxysporum</i> при поверхностном культивировании с непрерывной подачей компонентов питания	99
3.3.1.3.	Исследование роста <i>T. viride</i> при поверхностном культивировании с непрерывной подачей компонентов питания	103

3.4 Исследование снижения биотических стрессовых воздействий с помощью внесения модели экссудатов при выращивании огурца (<i>Cucumis sativus</i>)	112
3.4.1 Моделирование снижения биотических стрессовых воздействий с помощью дополнительного внесения модельного раствора экссудатов.....	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
ВЫВОДЫ	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	120

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

F. oxysporum – *Fusarium, oxysporum*

QS - *Quorum sensing*

T. viride – *Trichoderma viride*

АСБ – Абсолютно сухая биомасса

АСВ – Абсолютно сухой вес

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

мл. - миллилитры

ТС – тепловой стресс

ХПК – Химическое потребление кислорода

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 [201, 202]. 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 [2, 203]. На сегодня нет достаточных 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 растения [204, 205]. 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 [7, 206].

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 [204]. Состав, количество и концентрация этих соединений в прикорневой зоне растения непосредственно влияют на размножение доминирующих в составе ризосферы видов микроорганизмов [7]. 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 [207].

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, о 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 взаимодействие при метаболизме экссудатов растений в концентрациях сравнимых с концентрациями в ризосфере при поверхностном культивировании.

3. Разработка метода (системы) для культивирования грибов, моделирующий 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 является 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 агrobiотехнологий), 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 подтверждается 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 5 – 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., профессору 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, выводов, списка использованной литературы автором. Общий объем работы 139 страниц, включая 37 рисунков, 4 таблицы, библиографию из 207 наименований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Корневые экссудаты

Корни растений секретируют 5%-21% от их фотосинтетически фиксированного углерода в качестве растворимых сахаров, аминокислот, или вторичных метаболитов, и они используются микробными сообществами в ризосфере [1].

Корневые экссудаты были сгруппированы [2] в два класса: низкомолекулярные соединения, такие как аминокислоты, органические кислоты, сахар, фенольные соединения и другие вторичных метаболиты, а также соединения с высокими молекулярной массой, такие как полисахариды и белки [3]. Качественный и количественный состав корневых экссудатов определяется сортом, видом растений, стадии развития растения, а также различных факторов окружающей среды, в том числе типа почвы, pH, температуры и наличия микроорганизмов [4]. Эти различия порождают особенности микробного сообщества в ризосфере, которые имеют определенную степень специфичности для каждого вида растений [4].

1.1.1 Механизм корневой экссудации

Растения используют различные механизмы транспорта для экспорта и секретируют соединения в ризосферу [5]. Как правило, корневые экссудаты могут выделяться из корней растений через пассивный или активный механизмы. Большинство низкомолекулярных органических соединений освобождаются от растений через пассивный механизм транспорта. Малые полярные и незаряженные молекулы транспортируются путем прямого пассивной диффузии, процесс, который зависит от проницаемости мембран, полярности соединений, и цитозольной pH [5]. Клетки корневой системы секретируют другие соединения, такие как вторичные метаболиты, полисахариды и белки, с помощью различных мембраносвязанных белков [6]. Эти транспортные белки включают АТФ-связывающие кассеты транспортеры [7].

Хотя детали функций мембраносвязанных транспортных белков недостаточно хорошо изучены, они были связаны с транспортировкой широкого круга соединений в ризосферу [8].

1.1.2 Ризосферные взаимодействия

1.1.2.1 Корневые экссудаты, участвующие в растительно-микробном взаимодействии

В последнее десятилетие были широко изучены средства, с помощью которых корневые экссудаты опосредуют ризосферные взаимодействия [9,10]. Выделяющиеся корнем фитохимические вещества могут способствовать ряду взаимодействий, таких как растение–растение, растение–микроорганизм. Эти взаимодействия могут варьироваться от нейтральных до полезных или вредных [11,12]. В некоторых случаях микроорганизмы могут переходить от патогенных к симбиотическим в зависимости от условий окружающей среды [13]. Для примера, *Rhizobium sp.*, клубеньковые азотфиксирующие грамм отрицательные бактерии, могут взаимодействовать с растением в диапазоне от симбиотического до нейтрального в зависимости от уровня азота в почве [14].

Кроме того, в условиях, малого количества азота в почве, бобовые культуры секретируют флавоны и флавонолы для привлечения и инициирования симбиоза [15]. Точно так же симбиотические отношения микоризы регулируются равным обменом питательных веществ и выгод для каждого участника взаимодействия [16]. Например, это наблюдалось в экспериментах с люцерной. Поскольку больше углерода было выделено микоризному партнеру, микориза, в свою очередь, обеспечила растение большим количеством фосфора. Эта "справедливая торговля" между растением и микоризой также происходит в отношении N, поскольку микориза обеспечивает растение N только тогда, когда оно получает углерод растения [17]. Другими словами, оба члена отношений должны приносить пользу.

1.1.2.1.1 Взаимодействие микроорганизмов на фоне метаболизма экссудатов корневой системы растений

В то время как взаимодействия между корнями и микроорганизмами интенсивно изучаются, мало известно о взаимодействиях между микроорганизмами, связанными с корнями.

Во многих средах микроорганизмы сосуществуют в сложных массивах, в которых взаимодействия между членами необходимы для сборки сообщества и функционирования экосистемы [164]. В зоне,

непосредственно окружающей корни, известной как ризосфера, растения поставляют углерод в почву, что делает эту среду обитания местом интенсивной микробной активности и взаимодействий [165]. Отражая экологическую важность ризосферного микробиома для круговорота питательных веществ и доступности для растений, литература богата исследованиями, в которых изучается состав ризосферных бактериальных сообществ [165]. Однако немногие из этих исследований исследуют взаимодействия между членами ризосферных сообществ или определяют, какие члены занимают ниши в ризосферной среде.

Выявление и определение взаимодействий, которые происходят среди почвенных микроорганизмов, имеет решающее значение для понимания микробного разнообразия и функций [166]. Ризосферные сообщества образуют значительно более крупные и сложные сети, чем окружающие массивные почвенные сообщества, ризосферные сети развиваются со временем по мере роста растения [167].

Повышенный уровень CO_2 увеличивает филогенетическую и функциональную сложность микробных сетей в почве, что, вероятно, связано с увеличением поступления углерода в почву при повышенном уровне CO_2 [168]. Корни растений изменяют непосредственную почвенную среду, меняя pH, влажность и кислород с течением времени, а также внося значительное количество углерода в почву [169].

Взаимодействия охватывают спектр от антагонистических до кооперативных, как показано на примере за счет конкуренции за ресурсы и действий, контролируемых кворумом [170].

1.1.2.2 Углеводы и аминокислоты

Несколько исследований показывает, что вещества, секретируемые корневой системой, являются посредниками в взаимодействии «растение-микроорганизм» в почве. Например, повышенная секреция хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты и снижение секреции коричной кислоты у арбуза повышает его сопротивление фитопатогенного микроорганизма *F. oxysporum* [18].

Канавалин, выделяемый из оболочки семян или корней бобовых растений, является противомикробным веществом, влияющим на большое количество ризобиальных микроорганизмов. Но не влияющий на микроорганизмы рода *Rhizobium sp.*, предполагается, что растение хозяин выделяет это вещество для отбора полезных бактерий [19]. Однако необходимы дополнительные исследования для выявления специфических факторов, определяющих эти взаимодействия.

Точно так же симбиотические ассоциации между не-бобовыми и микоризой выступают посредником для корень-секретируемых соединений, например, стриголактоны 5-диоксистригол [20], сахара [21], и углеводы [22]. В дополнение к этим симбиотическим взаимодействиям, корневые экссудаты участвуют в инициации взаимодействия растения с микроорганизмами, стимулирующими рост растений. Эти микроорганизмы могут помочь растениям при помощи прямых и косвенных механизмов. Корни растений привлекают полезные микроорганизмы посредством выделения сигналов (корневых экссудатов) в которых углеводы и аминокислоты большей частью действуют как хемоаттрактанты.

Недавние исследования показали, что белки арабиногалактана, которые принадлежат к гидроксипролину – богатому гликопротеину белков клеточной стенки растений, играют ключевую роль в различных взаимодействиях между корнями растений и микроорганизмами в ризосфере [23]. Кончик корня растения выпускает живые пограничные клетки в ризосферу, эти клетки содержат большое количество арабиногалактана. Хотя корни растений в изобилии выделяют арабиногалактан в ризосферу, роль арабиногалактана в ризосферных взаимодействиях изучена недостаточно. Недавние исследования показали, что арабиногалактан имеет важное значение для взаимодействия растений и микроорганизмов в ризосфере. Например, арабиногалактан не смог привлечь полезные микроорганизмы и отразить атаку корневых фитопатогенов [24]. Арабиногалактан, выделяемый клетками корня Резуховидки, влияет на колонизацию ризобиальных бактерий, предполагается, что арабиногалактан играет

важную роль в признании и привязанности ризобияльных бактерий к корневой системе растения [25].

1.1.2.3 Вторичные метаболиты и гормоны

В дополнение к углеводам и аминокислотам, растения производят и секретируют в ризосферу многочисленные вторичные метаболиты, большинство этих веществ играет важную роль в взаимодействиях «растение-микроорганизм». Растения используют эти вещества для того, чтобы привлечь полезные микроорганизмы почвы и защитить себя от патогенов. Например, бензоксаиноиды, найденные в корневых экссудатах кукурузы привлекают к растению полезные ризобактерии [26]. Эти вещества притягивают ризобияльные микроорганизмы к поверхности корня путем регулирования экспрессии гена клубенькообразования, который ответственен за синтез факторов клубенькообразования которые играют важную роль в установке взаимодействия [27]. В другом исследовании продемонстрировано, что яблочная кислота, обнаруженная в корневых экссудатах Резуховидки Таля, привлекает *Bacillus subtilis* в ризосферу при заражении патогенами [28]. Дальнейшие исследования показали, что присутствие *B.subtilis* вызывает накопление салициловой и абсцизовой кислоты, что приводит к закрытию устьиц корневой системы и ограничению проникновения патогена [29].

Имеется несколько сообщений об участии ризосферы (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *T. u Gliocladium*) в улучшение роста и здоровья растений [30, 31]. Однако, необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы определить функцию специфических химических сигналов в привлечении специфических полезных ризобияльных микроорганизмов к корням. Например, de Weert et al. [32] отметил, что хемотаксис к экссудатам корня необходим для колонизации ризосферы томатов *Pseudomonas spp.* Кроме того, некоторые виды *Pseudomonas* содержат сенсорные белки хемотаксиса для аминокислот, которые помогают в их колонизации корней томата [33].

Корни растений также выделяют вещества, которые имитируют *Quorum Sensing* (способность бактерий сообщать и координировать поведение с помощью

передачи сигналов молекулами) (QS) сигналы бактерий стимулировать или подавлять QS-регулируемые реакции ассоциированных бактерий. QS в растениях играет важную роль в создании ассоциаций прикорневых микроорганизмов. Не менее 15 соединений обнаружено в корневых экссудатах молодой рассады Люцерны. Эти вещества могли простимулировать или заблокировать реакции в прикорневых микроорганизмах [34].

1.1.2.4 Вещества белковой природы

Наряду с первичными и вторичными метаболитами растения выделяют белки в виде корневых экссудатов, но знания о том, как эти секретируемые белки влияют на ризосферные микробные взаимодействия, остаются ограниченными. Среди наиболее изученных белков находятся лектины, которые функционируют как факторы защиты и распознавания в симбиотических взаимодействиях. Кроме того, протеомный анализ экссудатов корня Резуховидки Таля показал, что корни растений выделяют больше белков, участвующих в защите, таких как хитиназы, глюканазы и мирозиназы, во время цветения [35].

1.2 Влияние условий окружающей среды на растение

XXI век ознаменовался глобальным изменением климата. Согласно многим исследованиям, экологические стрессы представляют собой серьезную глобальную угрозу для продовольственной безопасности в будущем [36], в то время как численность населения мира, по прогнозам, достигнет к 2050 году 7 миллиардов человек, приблизительно 8,9 миллиарда человек [37]. В связи с увеличением климатических изменений, население и снижение здоровья почвы для выращивания сельскохозяйственных культур представляют угрозу для устойчивости сельского хозяйства. Эта проблема может стать более распространенной в будущем из-за изменений климата и обширной сельскохозяйственной практики [38].

В традиционной системе сельского хозяйства, которая является неустойчивой в то время, как население растет [39], фермерам становится очень трудно производить такие большие объемы продовольствия для удовлетворения потребностей растущего населения. С другой стороны, неумеренное

использование химических удобрений, пестицидов, гербицидов и т. д. в земледелии причиняет весьма большую потерю полезного микробного разнообразия почвы. Агроэкосистема постоянно подвержена абиотическому и биотическому стрессу, который непосредственно влияет на продуктивность сельскохозяйственных культур, здоровье и плодородие почвы. Различные стрессовые факторы негативно влияют на рост и продуктивность сельскохозяйственных растений. Стрессы классифицируются как абиотический и биотический стресс. Абиотическим и биотическим стрессам способствует 50% и 30% соответственно потерь производительности в сельском хозяйстве по всему миру. Абиотический и биотический стресс может быть естественным или вызванным человеком. Основными абиотическими стрессами являются температура, засуха, соленость и стресс, вызванный тяжелыми металлами. Стрессовое состояние оказывает широкий спектр влияния на морфологию растений, физиологию, биохимию и даже на регуляцию генов. Температура, дефицит воды, соленость и загрязнение тяжелыми металлами являются основными факторами стресса в связи с изменением климата. Абиотические стрессовые факторы также влияют на биотический стресс и снижают урожайность сельскохозяйственных культур. Основным эффектом этих стрессов приводит к потере микробного разнообразия почвы, плодородия почвы и конкуренции за питательные ресурсы [39]. Возможные альтернативы – это микробные сообщества, которые помогают растению при различных видах абиотического и биотического стресса. Применение микроорганизмов в сельском хозяйстве приведет к эффективности и экологической стабильности. Таким образом, перед сельхозтоваропроизводителями и учеными стоит очень сложная задача по разработке и внедрению в схемы защиты растений препаратов на основе микроорганизмов. Полезная микрофлора ризосферы растения поддерживает растение в условиях абиотических и биотических стрессов окружающей среды [40]. В целом, связанные с растением полезные микроорганизмы повышают эффективность их роста и развития в условиях абиотического и биотического стресса.

1.2.1 Растительно-микробные взаимодействия при стрессах

Рост и выживаемость растений в неблагоприятных условиях могут усиливаться за счет применения стрессоустойчивых ростостимулирующих микроорганизмов. Различные биохимические и молекулярные механизмы используются микроорганизмами для того, чтобы повысить рост и развитие растений. Например, прививка с ростостимулирующими микроорганизмами способствует росту растений, регулируя гормональный и питательный баланс и вызывая устойчивость к фитопатогенам [41]. Ростостимулирующие микроорганизмы производят определенные метаболиты, которые уменьшают популяцию патогенов вокруг окружающих растений. Например, сидерофоры, производимые этими микроорганизмами в ризосфере, снижают доступность железа для некоторых патогенов и приводит к снижению их роста [42].

1.2.1.1 Абиотический стресс

1.2.1.1.1 Засухи и их влияние на урожайность

Засухи и их влияние на урожайность сельскохозяйственных культур признаны серьезным экологическим стрессом, который привлек внимание экологов и ученых-аграриев. Это главная проблема сельского хозяйства во всем мире, ограничивающая производительность. Она имеет самые разнообразные последствия для человеческого общества, включая экономику [43]. Засуха – стресс, который влияет на различные параметры роста и стресс-отзывчивые гены. Малое количество воды приводит к уменьшению размера растительной клетки, нарушению герметичности мембраны, производству реактивного вида кислорода и ускорению старения листьев, всё это способствует снижению урожайности [44]. Несмотря на это, во время водного дефицита растения претерпевают ряд физиологических и молекулярных изменений, таких как увеличение производства этилена, изменение содержания хлорофилла, повреждение аппарата фотосинтеза и ингибирование фотосинтеза. Кроме того, засушливый стресс приводит к накоплению свободных радикалов, которые вызывают изменение мембранной функции, конформацию белка, перекисное окисление липидов и, наконец, гибель клеток [45]. Предполагается, что частота и интенсивность засухи в будущем возрастут в связи с последствиями изменения климата.

Засухоустойчивые стрессоустойчивые микроорганизмы способны усиливать рост и развитие растений в условиях дефицита воды. Микроорганизмы эволюционировали, адаптировались и/или развивали механизм толерантности для выживания в условиях низкого количества воды. Они могут образовывать толстые стенки или входить в стадию покоя, могут накапливать осмолиты, вырабатывать экзополисахариды. Эти микроорганизмы, связанные с растениями, имеют различные механизмы для преодоления негативного воздействия засухи на растения, а также на почву. Независимо от содержания воды, они содержат питательные вещества и улучшают состояние окружающей среды для непрерывного роста растений. Потенциальный механизм борьбы с засухой включает: (1) продукцию фитогормонов (индол-3-укусная кислота, цитокинины и абсцизная кислота, (2) бактериальные экзополисахариды, (3) деаминаза, Фитогормоны, производимые растениями, играют решающую роль в росте и развитии [46]. К тому же, ростостимулирующие микроорганизмы имеют способность синтезировать гормоны растения, которые стимулируют рост растения в условиях стресса. Индол-3-укусная кислота, самый активный ауксин, который регулирует дифференцировку сосудистой ткани, дифференцировку придаточных и боковых корней, деление клеток и рост побега во время засухи [47]. Абсцизная кислота является важным регулятором роста во время засухи. Когда семена или растение привиты ростостимулирующими микроорганизмами, концентрация абсцизная кислота регулирует физиологию растений для того, чтобы не допустить усиление засухи. Например, присутствующий в ризосфере *Azospirillum brasilense*, улучшает реакцию Резуховидки Таля на засуху, в основном за счет повышения уровня абсцизной кислоты [48]. 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат непосредственный предшественник этилена во время стрессов. 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат гидролизуется с помощью бактериальной 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дизаминазы на аммиак и альфакетобутират [49]. Микроорганизмы, стимулирующие рост растения, уменьшают потерю воды в растении кукурузы под условием стресса. Эти микроорганизмы и их метаболиты снижают антиоксидантную активность, а также увеличивают производство

пролина, свободных аминокислот и сахара в растениях [50]. При недостатках воды уменьшается количество хлорофилла в растении, тем самым снижается фотосинтез. Для преодоления этого эффекта проводят внесение в прикорневую зону *Pseudomonas putida*, что позволяет снизить засухоустойчивость за счет увеличения содержания хлорофилла, увеличения длины побега и биомассы [51]. Кроме того, сочетание эндофитных и ризосферных микроорганизмов улучшает способность к стрессоустойчивости. Экзополисахариды, производимые микроорганизмами, повышают уровень выносливости некоторых растений к засухе. Три засухоустойчивых штамма бактерий *Proteus penneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Alcaligenes faecalis* внесённые в прикорневую зону маиса увеличивают количество влаги в ризосфере растения [52]. Чтобы выжить в таких засушливых условиях, бактерии обладают различными физиологическими, биохимическими и молекулярными механизмами для защиты от неблагоприятного состояния. Вещества, такие как глицин, пролин, бетаин и трегалоза, накапливаются во время засухи и помогают бактериям поддерживать проницаемость мембран, фермент для поддержания их целостности и белка в их функциональной форме.

1.2.1.1.2 Солевой стресс

Солевой стресс растений является одним из наиболее распространенных абиотических стрессов в современном сельском хозяйстве. Большинство сельскохозяйственных угодий мира сильно подвержены засолению в силу различных причин. Засоление приводит к плохой активности микроорганизмов из-за токсического действия ионов и осмотического стресса, что приводит к снижению роста и развития растений. Засоление в почве вызвано катионами, такими как Na^+ , Ca^{2+} , K^+ и анионами Cl^- , NO_3^- . Соль встречается в почве в виде ионов – это происходит из-за недостаточного выпадения осадков или выветривания почвы. Солевой стресс оказывает пагубное воздействие на все аспекты растений, такие как сельскохозяйственная продуктивность, прорастание семян, поглощение воды и питательных веществ, а также нарушает физико-химический и экологический баланс [53]. Кроме того, он также оказывает неблагоприятное воздействие на процесс конкреций, уменьшая фиксацию азота и урожайность

сельскохозяйственных культур. Ферментативная активность нитрогеназы снижается во время стресса. Засоление почвы уменьшает поступление воды в корень. Более того, высокое количество соленой воды внутри растительных клеток подавляет рост растений. Солесодержание влияет на рост растений и микроорганизмов действуя главным образом через осмотическое давление и токсичность иона. Грибы более чувствительны к более высокой концентрации соли, чем бактерии.

Накопление токсичных ионов Na^+ и анионов Cl^- и дисбаланс питательных веществ в почве оказывает серьезное влияние на рост растений и микроорганизмы. Внесение микроорганизмов в прикорневую зону растений может смягчить негативное влияние соли на различные растения. Микроорганизмы могут способствовать росту растений в условиях стресса солености через различные прямые и косвенные механизмы. Кроме того, биопленка, образованная микроорганизмами при стрессе солености, эффективна для смягчения вредных эффектов [54]. Семена салата, привитые *Azospirillum*, показали лучшую всхожесть и вегетативный рост по сравнению с контролем в условиях солёности субстрата [55]. В другом исследовании, прививка растений *Pseudomonas stutzeri* уменьшает отрицательное влияние повышенной солёности почвы [65]. В то время как некоторые микробные виды улучшают устойчивость к солёности почвы за счёт образования биопленок [56].

Грибы, связанные с растениями, играют решающую роль в устойчивости к засухе и засолению почвы. Симбиоз грибов и растений изменяет гормональную физиологию растений, тем самым повышая стрессоустойчивость к засухе и солёности почвы. Также, симбиоз улучшает эффективность фотосистемы II в условиях дефицита воды [57]. *T. harzianum* улучшает рост корня несмотря на низкое содержание воды в прикорневой зоне и задерживает реакцию растения на засуху [58]. Грибы считаются важным элементом для улучшения минерализации почвы. Они блокируют распознавание Na и Cl в растении в условиях стресса [59]. Таким образом, внесение этих микроорганизмов может служить потенциальным инструментом для снижения стресса солености в чувствительных к соли культурах.

Эффективность устойчивости к засухе и засолению может также повышаться за счет ко-инокуляции бактериальных микроорганизмов и связанных с растениями грибов.

1.2.1.1.3 Стресс, вызванный тяжелыми металлами

Продолжающаяся индустриализация, интенсивная сельскохозяйственная практика и антропогенная деятельность приводят к загрязнению почвы тяжелыми металлами. Эти тяжелые металлы оказывают серьезное воздействие на растения и здоровье человека. Для того чтобы защитить и сохранить окружающую среду от их токсического влияния, весьма необходимо извлечь эти тяжелые металлы через устойчивый и эффективный подход, поскольку большинство методов, используемых для рекультивации, являются очень дорогостоящими и вредными для структуры почвы. Фиторемедиация, использует растения и их ризосферные микроорганизмы для того, чтобы очистить почву от тяжёлых металлов. Кроме того, это экономически эффективный и устойчивый подход к удалению тяжелых металлов [60]. Микроорганизмы более чувствительны, чем другие живые организмы, и могут быть хорошим индикатором при стрессе, вызванном тяжелыми металлами [61].

1.2.1.1.4 Температурный стресс

Изменение климата привело к увеличению частоты и интенсивности температурного стресса. Как тепловой стресс (ТС), так и холодное состояние становятся значительным абиотическим стрессом для продуктивности сельскохозяйственных культур и продовольственной безопасности во всем мире. Главное влияние температурного стресса: изменение в цитоплазматической мембране, уменьшение количества воды в клетках (транспирация), повреждение деятельности фотосинтеза, действие на ферменты растения [62]. Температура может повлиять на различные компоненты клетки и клеточной мембраны. Концентрация жасмоновой кислоты увеличится во много раз в состоянии стресса. Бесчисленные виды растений акклиматизировались до низких и высоких температур. Такое переменное состояние окружающей среды вызывает многие физиологические изменения у видов растений, что позволяет им акклиматизироваться и выживать в измененном температурном режиме. Растения

используют различные механизмы для того, чтобы пережить тепловой стресс, который включает продукцию и накопление ферментов и осмолитов. Белки теплового шока (HSP20, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100) и активные виды кислорода, ферменты (аскорбатпероксидаза и каталаза) являются основными функциональными белками при тепловых стрессах [63]. Но большая часть растений не в состоянии переносить экстремальные температуры.

Существует настоятельная необходимость найти решение для растениеводства в условиях изменения климата. Один из подходов сосредоточен на использовании микроорганизмов для смягчения неблагоприятных последствий теплового и холодного стресса. Температура играет значительную роль в регулировании физиологии и метаболизма микроорганизмов при экстремальных температурах. Некоторые особенности помогают микроорганизмам в адаптации к низкой или высокой температуре. Эти микроорганизмы имеют эффективный механизм защиты и обладают специфичными белками, мембранами и нуклеиновыми кислотами, чтобы жить в таких условиях. Они имеют белки и ферменты способные работать при низких или высоких температурах. Молекулярные шапероны являются одними из самых эффективных видов белков для защиты микроорганизма от теплового стресса. Микроорганизмы, используемые в условиях теплового стресса, можно разделить на 2 группы: криофильные и мезофильные. Рост криофильных микроорганизмов проходит максимум на уровне или ниже 15°C , пока мезофильные микроорганизмы развиваются при температуре выше 15°C . Синтез трегалозы повышается во время теплового стресса и защищает микроорганизмы от изменений температуры и окислительного стресса. Накопление трегалозы в бактериях и грибах увеличивает клеточную стенку во время теплового стресса. Во время теплового стресса трегалоза, аккумулированная в микробной клетке защищает от термального удара [64]. Этот углевод играет главную роль в стабилизации протеина в клетке. Трегалоза в грибах уменьшает индуцированную денатурацию и агрегацию протеина при тепловом стрессе, следовательно, поддерживает белок в родной конформации.

Большая часть земной биосферы была успешно колонизирована микроорганизмами, устойчивыми к высоким и низким температурам. Микроорганизмы, приспособленные к низкой температуре, демонстрируют повышение ростовых качеств растений при низких температурах. *Pseudomonas cedrina*, *Brevundimonas terrae*, *Arthrobacter nicotianae* адаптированные для низких температур показывают многофункциональные качества для развития растений [65]. Ризосферные микроорганизмы, выделенные из корневого узла гороха, растущего при низких температурах, обладают эффективной способностью стимулировать растение при низких температурах [65]. Далее, Javani [66] сообщил, что криофильные бактерии, выделенные в Антарктиде, проявляют антимикробную активность. С другой стороны, внесение термотолерантных фосфатредуцирующих микробов в почву действует как многофункциональное биоудобрение [67].

1.2.1.2 Биотический стресс и здоровье растений

В природе почва и корни растений являются средой обитания для различных почвенных патогенов и полезных микроорганизмов. Экссудаты корневой системы растения и другие химические вещества растений привлекают большое количество микроорганизмов. Растительные патогены, например, бактерии, грибы, вирусы и насекомые-вредители привели к массовому снижению урожайности [67]. Общие влияния этих биотических факторов включают несбалансированную гормональную регуляцию, дисбаланс питательных веществ и физиологическое расстройство у растений. Дальнейший рост стоимости пестицидов и их вредное воздействие на почву весьма заметно. Многие растения обладают способностью изменять экспрессию генов и справляться с этими стрессами путем акклиматизации и адаптации, в то время как другие не могут. Однако непатогенные микроорганизмы показали способность подавлять многие заболевания, вызванные этими патогенами. Таким образом, использование полезных микроорганизмов в качестве средств биологического контроля рассматривается как альтернативный и устойчивый подход для замены пестицидов и химических удобрений. Естественно-связанные бактерии и грибы заселяют корневую систему и стимулируют рост и развитие растений. Эти средства биологического контроля были выбраны

благодаря эко-содружественным, эффективным и рентабельным средствам для управления заболеваниями. Они обеспечивают защиту от патогенов через активацию клетчатого компонента включая клетчатый взрыв, укрепления клеточной оболочки и накопление вторичных метаболитов.

1.2.1.2.1 Механизм биотической стрессоустойчивости

Взаимодействие растений и микроорганизмов в естественной среде обитания имеет решающее значение для правильного роста и развития. Они играют важную роль в мобилизации питательных веществ и защите от патогенов [68]. Биологический контроль за болезнями, передаваемыми через почву, для замены химических агентов, значительно способствует урожайности сельскохозяйственных культур в условиях абиотического стресса. При взаимодействии микроорганизмов и растений возникает производство различных элиситоров и происходят физиологические и биохимические изменения в растениях. Эти изменения приводят к устойчивости растений к болезням в течение нескольких месяцев. Производство реактивного вида кислорода и оксидативный взрыв важный механизм для улучшения стрессоустойчивости при биотическом стрессе [70]. Реакции механизмов защиты, активируемые микробами, включают два разных пути, индуцируют систематическое сопротивление и системное приобретенное сопротивление. Систематическое сопротивление может быть усилено непатогенными, связанными с корнем растения, микроорганизмами, тогда как системное приобретенное сопротивление включает изменение в молекулярном составе и связано с белками. Индукция и экспрессия генов как в систематическом сопротивлении, так и в системном приобретенном сопротивлении различны, что зависит от выявленного и регуляторного пути [71]. Микроорганизмы, способствующие росту растений, триггер системного приобретенного сопротивления, который включает в себя накопление белков, в то время как систематическое сопротивление опирается на пути, регулируемые жасмонатами и этиленом в условиях биотического стресса [72]. Этилен и регуляторный фактор играют важную роль в экспрессии генов белков. В зависимости от элиситора,

выделяемого непатогенными микроорганизмами, и взаимодействия этих молекул определяют индукцию сопротивления в растениях.

1.2.1.2.2 Индуцированная системная устойчивость растений при биотическом стрессе

Заражение патогенными микроорганизмами, например, бактериями, грибами, вирусами может побудить растение к развитию устойчивости к будущему нападению, называемому индуцированной системной резистентностью [73]. Индуцированная системная устойчивость, вызванная фитопатогенами, иммунизирует растения против возбудителей широкого спектра. Индуцированная системная устойчивость, провоцируемая микроорганизмами, управляет путем производства комплекса аллелопатических веществ, поддерживает определённые экотипы и производит различные виды питательных веществ. Аллелохимикаты, такие как сидераторы, антибиотики, действуют эффективно против фитопатогенов и блокируют их развитие [74].

1.2.1.2.3 Системная приобретённая устойчивость

Индуцированная системная устойчивость развивается в растении как полностью активный защитный механизм в ответ на первичную инфекцию. Растение может узнать природу патогена, основанную на молекулярной картине и ослабить его влияния путем изменения экспрессии генов и секрецией метаболитов [75]. *Arthrobacter sp.* и *Bacillus sp.* выделенные из ризосферы томата показали способность повышать потенциал фиксации фосфатов, также эти микроорганизмы индуцируют систематическое сопротивление и проявляют свойства агентов биологического контроля [76]. Некоторые бактериальные виды действуют против фунгицидов, производимых патогенными грибами. Например, *P. aeruginosa* штамм *PS1*, эффективный ростостимулирующий микроорганизм, применяется в сельском хозяйстве против фунгицидов для улучшения их воздействия. Так же в присутствии этих микроорганизмов в стрессовых условиях растение производит большее количество веществ, таких как: сидераторы, фитогормоны, цианистый водород и аммиак [77].

1.3 Роль сахаров при абиотических стрессах растений

Растения - сложные, но сидячие организмы, поэтому они часто подвергаются серьезным испытаниям. Условия окружающей среды или абиотические факторы, включая снижение доступности воды (засуха), экстремальные температуры (жара/холод/заморозки), экстремальные условия освещения, сниженная и/или чрезмерная доступность ионов в почве, а также структура/текстура почвы. Случайные и неожиданные нарушения в экологических или абиотических факторах, ниже или выше оптимального уровня считается абиотическим стрессом, который является одной из основных причин потери урожая во всем мире [78]. Предсказаны абиотические стрессы снижающий средний мировой урожай сельскохозяйственных культур на >50% и затрагивающие >90% общемирового урожая [79]. Абиотический стресс у растений имеет три основных фазы [80], включая восприятие, передачу сигналов и истощение. Восприятие — это первая фаза, которую растение переживает через различные механизмы, когда есть нарушение любого из абиотических факторов. Абиотический стресс в первую очередь вызывает ионный дисбаланс и гиперосмотический стресс в растительной клетке. Сигнальный каскад [активные формы кислорода (кальций и др.)]. Растительные клетки ощущают изменения в клетке и вызывают механизм сопротивления, ведущий к третьей фазе - истощению. Этот этап включает в себя изменение физиологических функций растительных клеток. Четвертая фаза, регенерация, включает частичную или полную нормализацию функций растительных клеток, но это возможно только при снятии напряжений. Следовательно, абиотический стресс приводит к снижению процесса фотосинтеза, торможение водного транспорта, осмотический / ионный / питательный дисбаланс, нестабильность плазматической мембраны, окислительный стресс (выброс активных форм кислорода или дисбаланс между активными формами кислорода и антиоксидантными системами растительной клетки) и другие неблагоприятные изменения растительных клеток, которые в совокупности замедляют рост и развитие растений [81].

Поэтому абиотический стресс является одной из основных проблем, сдерживающих устойчивое сельскохозяйственное производство- растениеводство в различных частях мира, и эту проблему нужно пытаться решить, чтобы застраховать продовольственную безопасность для растущего населения мира.

Для того чтобы противодействовать воздействию абиотического стресса, растения развили сложную физиологическую систему.

-биохимические и молекулярные стратегии, включая антиоксидантные системы и резистентность;

-ген (ы). Было опубликовано множество отчетов, объясняющих механизм, лежащий в основе антиоксидантных систем и генов устойчивости, также были предприняты усилия, чтобы модулировать эти системы для повышения производительности растений в условиях абиотического стресса. Ранее, сахара и углеводы стали потенциальными агентами для улучшения толерантности растений против абиотического стресса [82]. Сахар и углеводы являются двумя важными составляющими растительных клеток, и были названы в честь их основной химической формулы $[C_x(H_2O)_y]$, которая определяет их как гидраты углерода с водородом и кислородом в том же соотношении, что и в воде. Сахара — это полигидроксиальдегиды или кетоны, которые в первую очередь подразделяются на категории в зависимости от размера молекулы, который определяется степенью полимеризации, тип связи (α или не- α) и характеристики отдельных мономеров. Такая классификация делит сахара на четыре класса: моно-, ди-, олиго- и полисахариды. В растениях сахара участвуют в различных структурных, биохимических и физиологических свойствах [83]. Будучи химически разнообразными молекулами, сахара, особенно в течение последнего десятилетия изучались очень активно, в том числе их решающая роль в толерантности к абиотическим стрессам у растений.

1.3.1 Метаболизм сахаров, важных при абиотическом стрессе

Растения - автотрофные организмы. Они используют световую энергию для фиксации углекислого газа и воды через фотосинтетический механизм в хлоропласте. Этот процесс помогает растительным клеткам поддерживать два

основных пула метаболитов, которые могут превращаться друг в друга с помощью обратимых ферментативных реакции или переносчиков в соответствии с требованиями растительной клетки. Эти два основных набора состоят из следующих промежуточных продуктов: набор триозофосфата, который включает 3-фосфоглицерат и дигидроксиацетонфосфат и гексозу, пул фосфатов (глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1-фосфат и АДФ-глюкоза) [84]. Триозофосфаты действуют как основные переносчики углерода из хлоропластов в цитозоль, где они превращаются в гексозофосфаты [85]. Сахароза, будучи не восстанавливающим сахаром с ограниченной химической активностью, является основной молекулой транспорта и хранения в большинстве растений. Молекула сахарозы состоит из одной молекулы глюкозы и одной фруктозы, соединенных α (1-2) гликозидной связью [86]. Сахароза в основном синтезируется в цитозоле из триозофосфатов в две последовательные стадии, катализируемые сахарозофосфатсинтазой и сахарозофосфатфосфатазой соответственно [87]. Кроме того, сахарозу можно синтезировать путем разложения крахмала или путем обратимой реакции. И фруктозу, катализируемая ферментом сахарозосинтаза [88].

Сахарозо-фосфатсинтазная реакция является лимитирующим этапом биосинтеза сахарозы, который может быть индуцирован аллостерически с помощью глюкозо-6-фосфата и ингибируется неорганическим фосфатом. сахарозосинтаза присутствует в растительной клетке в растворимой и мембраносвязанной форме, и может как синтезировать, так и разлагать сахарозу. Сахароза может перемещаться синпластически или апопластно к клеткам флоэмы и в тонких тканях, где она может храниться в вакуолях в тонопласте или гидролизуется до глюкозы и фруктозы с помощью инвертазы [89].

Трегалоза — это дисахарид, в котором две молекулы глюкозы соединены α (1-1) гликозидной связью [90]. В растениях трегалоза синтезируется в два последовательных шага: глюкоза и глюкозо-6-фосфат реагируют в присутствии трегалозо-6-фосфатсинтазы с образованием трегалозо-6-фосфата, который дефосфорилируется до трегалозо-6-фосфата.

1.3.2 Удаление активных форм кислорода

Активные формы кислорода представляют собой высокореактивные формы кислорода и в основном включают: кислород, ион-радикал супероксид, гидроксильный радикал, и гидропероксид. Активные формы кислорода являются побочными продуктами аэробного метаболизма, и их концентрация в балансе с антиоксидантной системой растительной клетки в нормальных условиях роста [91]. Однако при абиотическом стрессе в растении увеличивается индукция активных форм кислорода в клетке, вызывая нарушение клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза и деградацию клеток. Это состояние в растительных клетках называется окислительным стрессом. Антиоксидантная система растений традиционно включает витамины С и Е, различные классы фитохимических веществ (флавоноиды, терпеноиды, каротиноиды и т. д.) и системы на основе ферментов, такие как каталаза, супероксиддисмутаза и пероксидазы. Однако сахара в растениях способны выступать в роли антиоксидантов. Вовлечение моносахаридов в качестве прямых антиоксидантов не происходит. Моносахариды с большей вероятностью влияют на антиоксидантные свойства растительной клетки косвенным образом. Моносахариды, вносят свой вклад через свои полимеры. Общие дисахариды сахароза, трегалоза, мальтоза и лактоза проявляют значительный эффект подавления свободных радикалов *in vitro* [92].

Дисахариды обладают антиоксидантной способностью, но из-за своего небольшого размера и легкости транспортировки они могут играть большую роль в контроле реактивных форм кислорода. Фруктаны стабилизируют тонопласт за счет улавливания гидроксильных радикалов, тем самым предотвращая перекисное окисление липидов мембраны [93]. Следовательно, фруктаны превращаются в радикалы фруктана, которые могут быть переработаны классическими вакулярными антиоксидантами. Также сахароза может выступать в роли антиоксиданта она реагирует с гидроксильными радикалами и образует сахарозильные радикалы, которые могут пройти четыре разные реакции. В двух реакциях сукрозильные радикалы могут превращаться в моносахаридные радикалы

и нерадикалы с кетогруппами и без них; тогда как, сукрозил радикалы могут окисляться во время третьей реакции с образованием гидратных продуктов. В четвертой реакции, сукрозильные радикалы могут рекомбинировать с образованием уникальных олигосахаридов более высокой степени полимеризации. Те же механизмы могут быть верны и для других присутствующих сахаров в растениях, но на сегодняшний день отсутствуют экспериментальные данные.

1.3.3 Сахара как осмо-протекторы

Абиотические стрессы, особенно засуха, жара и засоление, вызывают обезвоживание растительных клеток, вызывая осмотический стресс, который может последовательно приводить к нарушению гидрофильного взаимодействия, деградациии структуры биомолекул (особенно денатурация белков), коллапс органелл, и дестабилизация клеточных мембран. Солевой стресс вызывает токсичность определенных ионов, таких как Na^+ и Cl^- , что снижает потребление важных минералов, включая калий, фосфор, азот и кальций. Na^+ токсичность также нарушает соотношение Na^+/K^+ в растительной клетке, что имеет решающее значение для нормальной работы клетки. Точно так же засуха была связана с нарушением соотношения ионов K^+/H^+ в растительных клетках. Следовательно, чтобы защитить клетки от повышенного обезвоживания во время абиотического стресса необходимо повышать концентрацию осмозащитных средств или осмолитов, для поддержания тургорного давления клетки и повышения стрессоустойчивости растений.

1.3.4 Сахара как сигнальные молекулы

Сахара, помимо хранения/транспорта, структурных и энергетических молекул, также действуют как сигнальные механизмы при устойчивости растений к абиотическому стрессу [94]. Сахара и гормоны являются потенциальными кандидатами для передачи сигналов на большие расстояния у растений. Видные представители сахарных сигнальных каскадов, включая гексокиназу, которые также взаимодействуют с фитогормонами, помогая защитить растение от абиотических стрессов [94].

1.4 Современное состояние вопроса теории фитопатогенеза

Микроорганизмы повсюду. Несмотря на то, что они крошечные по размеру, они принимают участие в бесчисленных взаимодействиях с окружающей средой или их хозяевами, вызывая тем самым значительные изменения. Человеческий микробиом был популярной областью исследований в последние годы, так как есть прямая связь между профилем микробиома и здоровьем человека [95]. Так же животные и растения тоже является хозяином самых различных групп симбиотических микроорганизмов. Действуют ли они благотворно или пагубно для растения, эти симбионты постоянно участвующие в сложной межвидовой и внутривидовой передаче сигналов. Термин «симбиоз» включает все патогенные, комменсалистические или мутуалистические отношения между микроорганизмами и их хозяевами [96]. Таким образом, патогенез растений оценивается как часть этих симбиотических взаимодействий.

Этот симбиоз закреплен сложным взаимодействием между растениями и микроорганизмами через обмен многочисленными сигналами. В этой цепочке событий ризосферные микроорганизмы, которые находятся в почве, окружающей корни растений, играют ключевую роль, не только иницируя перекрестные взаимодействия за счет колонизации корней, а также за счет модуляции иммунитета хозяина [97]. Колонизация корней достигается за счет привлечения микроорганизмов корневыми экссудатами, которые включают различные молекулы простых сахаров, полисахаридов и аминокислоты, белки и фенольные соединения, витамины и гормоны [98]. Хемотаксический ответ стимулируется рецепторами с неизвестной специфичностью. Также транспорт ионов и протонов на поверхности корня создает электрические токи, которые могут притягивать подвижные зооспоры. Однако относительное влияние хемотаксиса и электротаксиса в формировании микробиома растений до сих пор не ясен [99]. Помимо почвенной микрофлоры, микроорганизмы филлосферы также привлекаются экссудатами стеблей и листьев, содержащие летучие органические соединения или гормоны [100].

Хотя и не так много, как в ризосфере, микроорганизмы также могут присутствовать в растении. Такие органы, как плоды, семена, цветы и нектар [101].

По образу жизни фитопатогены делятся на три группы. Первая группа, биотрофы, усваивают необходимые метаболиты из живых клеток; таким образом они не убивают своих хозяев быстро. Вторая группа, некротрофы, — это сапротрофы, которые быстро убивают своих хозяев, а затем получают питательные вещества из мертвых клеток-хозяев. Последняя группа, гемибиотрофы, проявляет биотрофные характеристики на начальных стадиях заражения, затем переходят к некротрофам на более поздних стадиях [102]. Фитопатогены встречаются в разных группах жизни, например, бактерии, грибы, вирусы и нематоды [103]. Хотя некоторые фитопатогенные виды такие как *Pseudomonas syringae* [104], *Erwinia amylovora* [105], или *Magnaporthe oryzae* [106] считаются «модельными организмами» поскольку они были очень хорошо изучены на протяжении многих лет, подходы генетики и определение сигнальных события между этими симбионтами и их хозяевами в последние годы показывают, что существуют сложные механизмы фитопатогенеза, чем то, что известно сегодня. Патогены растений опустошают посевы по всему миру, что обходится большими экономическими потерями для всей сельскохозяйственной и пищевой промышленности. Поражающий растения риса гриб *Magnaporthe grisea* ответственен за потерю 10–30% всего собранного риса во всем мире, этого, по оценкам, более чем достаточно для кормления примерно 60 миллионов людей [107]. Ясно, что человечество все еще не может эффективно бороться с этими вредителями. Использование различных химических препаратов может быть эффективным на краткосрочной основе, но помимо пагубного воздействия на окружающую среду и здоровье человека, эти препараты создают значительное влияние на сложившийся биоценоз микроорганизмов, открывая путь для появления резистентных штаммов или их быстрое замещение другими патогенами.

Понимание лежащих в основе способов действия на фитопатогенез имеют решающее значение для преодоления сложившихся проблем.

В узкой зоне контакта между частицами почвы и корнями, ризосфера представляет собой первую среду обитания под влиянием растений, с которой сталкиваются почвенные микроорганизмы [108,109]. В пределах этой зоны растительно-почвенного взаимодействия ризосфера — это динамичный и густонаселенный район почвы со сложным набором межвидовых коммуникации и пищевых сетевых-взаимодействий, которые оказывают существенное влияние на поток и преобразование углерода. Ризосфера была описана [110] и включает три зоны: эндоризосферу, как части коры и эндодермы, где микроорганизмы и минеральные ионы пребывают в апопластическом пространстве растительной клетки; ризоплан, как средняя зона рядом с эпидермальными клетками и слизистой оболочки корня; и экторизосфера, внешняя зона, которая простирается от ризоплана в насыпной грунт [111]. Важно не рассматривать ризосферу как зону установленного размера или формы, но скорее, как градиент химических, биологических и физических свойств вдоль корня [112]. Ризосфера имеет сильное влияние на метаболизм растения посредством выделения углекислого газа и ассимиляции первичных продуктов фотосинтеза как массив корневых экзометаболитов (в основном из ризоплана и экторизосферы). Корневые экссудаты способствуют взаимодействию ризосферы, выступая в качестве источника энергии микроорганизмов и действующие как химические аттрактанты и репелленты [113,114]. Они служат связующими молекулами для инициирования биологических и физиологических взаимодействий между микробиоценозом почвы и корнями растений, влияя на химические и физические свойства почвы и почвенного микробного сообщества, ингибирование роста конкурирующих растений, способствуя выгодным симбиозам, например, с помощью азотфиксирующих бактерий, микоризы и эпифитов, и предотвращения атак патогенных бактерий, грибов и насекомых [115].

Ризосфера имеет первостепенное значение для обслуживания экосистем, таких как круговорот углерода и воды, улавливание питательных веществ, поглощение и хранение углерода [117].

1.4.1 Фитопатогенез грибов и оомицетов

Грибы и оомицеты - одноклеточные или многоклеточные эукариотические гетеротрофные организмы, образующие нитчатые структуры, образованные гифами за исключением дрожжей, размножающихся почкованием. Гифы обычно имеют диаметр 1-2 мкм, но у некоторых грибов могут достигать более 100 мкм. Клетки гиф содержат одну, две или несколько ядер, часто разделены перегородками. До 1990-х оомицеты считались настоящими грибами, но на основании анализа генома они теперь классифицируются как *Chromista*. Патогенные оомицеты по-прежнему рассматриваются как грибы, потому что у них много общих свойств, включая их нитчатый рост и способность вызывать инфекционные заболевания. Стенки грибных клеток содержат хитин, α - и β -глюканы и глико-белки, а у оомицетов есть целлюлоза и глюканы, но отсутствует хитин. Некоторые грибы и оомицеты важны для промышленного производства ферментов, хлеба, сыра, алкоголя и органических кислот. Как производители антибиотиков они могут иметь важное медицинское применение. С другой стороны, многие грибы и оомицеты могут вызывать заболевания людей, животных и растений. Около 150 000 видов грибов сейчас описаны, что составляет около 10% всех грибов, которые, по оценкам, присутствуют на Земле [118]. Наиболее важные грибные патогены растений относятся к Аскомицетам, продуцирующие половые споры (аскоспоры) в мешковидные структуры (аски) и бесполое споры (конидии), базидиомицеты, продуцирующие половые споры (базидиоспоры) на базидии, дикариотическом вегетативном мицелии и бесполое споры, оомицеты, продуцирующие половые споры (ооспоры) и бесполое споры (спорангии). которые могут прорасти напрямую или производить зооспоры [119]. Патогенные грибы проникают в растения через естественные отверстия (например, устьица) или проникают непосредственно через произведенный штифт аппрессорием на клетке-хозяине. Многие грибы производят гаустории в клетках растений - специализированные органы питания для извлечения питательных веществ. Внеклеточные патогены растут как эпифиты на внешней стороне растений или в апопластическом пространстве между ячейками без образования гаусторий.

Аскомитовые грибы гаплоидны по большей части своей жизни и производят гаплоидные споры. Во время половой стадии гаплоидные гифы аскомицетов могут сливаться с образованием дикариона внутри аскогенной гифы, где ядра вскоре сливаются, образуя зиготу, которая быстро делится мейотически, чтобы произвести восемь гаплоидных аскоспор на аск. Оомицеты диплоидны большую часть своей жизни, и их жизненный цикл очень похож на жизненный цикл водорослей. Во время половой стадии оомицеты производят гаметангии, в которых происходит мейоз, с последующим оплодотворением и образованием диплоидной зиготы, яйцеклетки, которая производит спорангий, который прямо или косвенно размножается, производя зооспоры. Базидиомицеты являются дикариотами большую часть своей жизни. Во время половой стадии в базидии парные ядра сливаются и образуют зиготу, которая быстро мейотически делится с образованием четырех гаплоидных базидиоспор [120]. У большинства грибов бесполой цикл повторяется несколько раз в течение сезона роста и наносит наибольший вред растениям, тогда как половой цикл обычно происходит только один раз в год в конце вегетационного периода, когда растения-хозяева стареют и питательные вещества становятся ограниченными.

1.4.1.1 Характеристика грибов и оомицетов – фитопатогенов растений

Эти организмы могут быть облигатно биотрофными, биотрофными, гемибиотрофными или некротрофными возбудителями. Биотрофные патогены размножаются в живых клетках-хозяевах. Некоторые биотрофы не могут быть культивированы на синтетических средах и называются облигатными биотрофными патогенами ложная мучнистая роса и мучнистая роса. Однако многие биотрофные патогены растут на растениях-хозяевах в естественных условиях, но все еще могут быть прокультивированы на синтетических средах, такие как патоген томатов *Cladosporium fulvum* [121]. Гемибиотрофные патогены начинают поражение растения как биотроф, но позже в период роста они могут жить как сапрофиты на ткани умершего хозяина. Защитный ответ, который очень эффективен против облигатных биотрофных и биотрофных патогенов, гиперчувствительный ответ, гибель нескольких растительных клеток в очаге

заражения. Напротив, некротрофные грибковые патогены убивают ткань хозяина до того, как извлекут питательные вещества, и процесс гибели нескольких растительных клеток не эффективен против них. Многие грибы живут на растениях в виде эпифитов из них некоторые превратились в патогенные микроорганизмы. Обычно они попадают в растения через устьица и процветают в апопластическом пространстве, окружающем клетки, не создавая поражения растения. Большинство внеклеточных патогенов развиваются медленно и имеют длительный латентный период, поскольку апопласт часто содержит антимикробные соединения и антимикробные ферменты, и беден питательными веществами. Внутриклеточный патоген часто производит гаустории.

1.4.1.2 Стратегии атаки грибковых и оомицетных инфекций, механизмы защиты растения

Стратегии заражения, применяемые грибковыми патогенами, зависят от того, где они развиваются в своих растениях-хозяевах. Клеточная стенка является основным препятствием для патогенов растений, которые содержат физические и химические барьеры, такие как восковая кутикула, (одревесневшие) клеточные стенки и антимикробные метаболиты, и белки [122]. Секвенирование многих грибковых геномов показало, что патогенные грибы содержат много различных классов ферментов, разрушающих клеточную стенку. Экспресс-активность этих генов активируется во время заражения растений некротрофными грибами [123]. Биотрофные патогены часто содержат похожее число генов, кодирующих ферменты, разрушающие клеточную стенку, как некротрофы, но они часто слабо экспрессируются этими патогенами или только в определенных местах и фазах инфекции. Некротрофные грибы также часто производят вторичные метаболиты, токсичные для растений, тем самым облегчая их некротрофический образ жизни, в то время как эти метаболиты часто отсутствуют у (облигатных) биотрофных возбудителей. Например, мучнистая роса практически не содержит генов, кодирующих вторичные метаболиты [124] и у патогена листьев томата *C. fulvum* эти гены, подавляются во время инфекции [125]. Помимо производства ферментов, которые активируют болезнетворные микроорганизмы для разрушения клеточных

стенок растений и для извлечения высвободившихся моно/олигосахаридов, грибам также необходимо защитить себя от противогрибковых белков, которые присутствуют в растениях. Защищать клеточные стенки и апопласт путем детоксикации ферментов, таких как томатиназа, продуцируемых *Cladosporium fulvum*, который выводит токсины токсичного сапонины, α -томатина, возникающего при высокой концентрации фитопатогена в томате [126]. Растения выработали сложные стратегии защиты, чтобы распознавать патогены и защищаться от грибковых патогенов. Все растения могут распознавать связанные с патогенами молекулярные паттерны, такие как хитин из грибов, рецепторами распознавания образов, которые опосредуют запускаемый иммунный ответ, который защищает растения от потенциальных патогенов [127, 128]. Паттерны являются внеклеточными белковые молекулы, содержащие рецептороподобные трансмембранные белки с сигнальным доменом цитоплазматической киназы. Они опосредуют базальную структурную и химическую активность, запускаемую защитными реакциями растений, включая отложение каллозы, накопление реактивного кислорода, утолщение клеточной стенки и накопление патогенезных белков, включая хитиназы, протеазы и глюканазы.

Хотя у растений развита базальная защита против микроорганизмов, патогены нашли способы преодолеть базальные защитные реакции. Патогены могут подавлять иммунитет, секретировав различные типы эффекторов, которые нацелены на различные компоненты иммунного ответа растения [129]. Подавляя иммунный ответ, они вызывают чувствительность, управляемую эффектором. Различные типы эффекторов были описаны у различных патогенных грибов [130]. Они манипулируют защитой хозяина и физиологией хозяина, чтобы способствовать вирулентности различными способами. Например, внутренние функции двух эффекторов *Cladosporium fulvum*. *C. fulvum* секретировав эффектор белка Avr2 который ингибирует цистеиновые протеазы растений, включая Rcr3 [131]. Ингибирование белка Avr2 в томатах привело к повышенной восприимчивости к различным грибковым патогенам, включая *Botrytis cinerea* и *Verticillium dahliae* [132]. *C. fulvum* также секретировав богатый цистеином белок

Avr4, который связывается с хитином, который защищает стенки клеток грибов от хитиназ растений, обеспечивая защитную роль во время инфекции [44]. Кроме того, отключение гена, отвечающего за синтез *Avr4* *C. fulvum* снижает вирулентность растений томата [133]. Способность бороться с хитиназами растений важна для вирулентности большинства патогенных грибов растений, потому что хитин является основным компонентом клеточных стенок грибов. Гомологи *Avr4* были идентифицированы у нескольких дотидеомицетов, включая *Mycosphaerella fijiensis* и *Dothistroma septosporum* [134].

В свою очередь, растения выработали изощренные способы распознавать эффекторы и реагировать на них. В дополнение к белкам, которые распознают наличие патогенов, у растений развились иммунные рецепторы, распознающие эффекторы. Манипуляции эффекторами приводит к иммунному ответу растений [135]. Коэволюция между хозяевами и их патогенами вызвали «гонку вооружений», которая привела к разработке множества новых эффекторов и соответствующие белки резистентности, которые описываются концепцией генов.

1.4.1.3 Факторы специфичности растения-хозяина у фитопатогенных грибов

Большинство видов грибов, патогенных для растений, имеют узкий круг хозяев-растений. Коллективный круг хозяев некоторых видов грибов, таких как *F. oxysporum*, могут быть очень большими, однако отдельные штаммы часто ограничиваются заражением одного или только нескольких видов растений [136]. В зависимости от диапазона хозяев, штаммы в пределах таких видов грибов обычно классифицируются на разные патотипы. Кроме того, грибковые виды иногда делят на разные расы в зависимости от конкретного сорта растений, которые они могут заразить. Это явление, можно назвать «специфичностью сорта-хозяина». Например, *F. oxysporum* подразделяется на более чем 100 патотипов на основе специфичности вида-хозяина, в том числе штамм, заражающий томаты *F. oxysporum forma specialis (f. sp.) lycopersici*, тогда как сам *F. oxysporum forma specialis (f. sp.) lycopersici* является суб-разделены на три расы в зависимости от специфичности сорта-хозяина [137]. Молекулярная основа специфичности сорта-

хозяина была широко изучена на многих фитопатогенных грибах, в то время как молекулярная основа видовой специфичности хозяев менее изучена [137]. Термин "хост специфичность» включает в себя как специфичность вида хозяина, так и сорт хозяина. Защищаясь от фитопатогенных грибов, растения развили два слоя иммунитета. Первый слой иммунитета повторно-спонгирует патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, общие для многих микроорганизмов, в том числе не патогенных, и эта защитная система называется иммунитетом, запускаемым патоген-ассоциированными молекулярными паттернами. В ответ на срабатывание защитной системой, патогены выделяют молекулы, называемые эффекторами, для облегчения колонизации. Эти эффекторы обычно представляют собой секретируемые белки, но также могут быть метаболитами. Некоторые эффекторы нацелены на восприимчивость растительных белков. Второй слой иммунитета содержит белки устойчивости растений, которые прямо или косвенно распознают продуцируемые патогенами эффекторы, что приводит к запуску иммунитета эффекторов у растений [138]. Среди белков устойчивости растений большинство из них являются нуклеотид связывающими белками богатыми лейцином [139]. Чтобы избежать распознавания эффекторов растительных белков устойчивости растений, патогены могут подвергаться утрате или мутации отвечающих за эффекторы гены [139]. В результате патогены и растения постоянно развиваются происходит «гонка вооружений». Большинство эффекторных генов расположены в регионах, богатых повторами. Изохоры формируются с помощью точечной мутации, индуцированной повторами воздействуя на повторяющиеся элементы мутациями $G \rightarrow A$ и $C \rightarrow T$, процесс инактивирует дублированные последовательности [139]. Эта «гонка вооружений» между патогенами и растениями приводит к относительно быстрой эволюции эффекторов, R- и S-белков [139]. В целом эффекторы способствуют вирулентности и являются, следовательно, факторами вирулентности. Эффекторы, которые распознаются белками R (также) называемые факторами авирулентности [139]. Эти факторы авирулентности и вирулентности, определяющие устойчивость и восприимчивость растений, соответственно, считаются хозяевами. Факторов специфичности и были

идентифицированы у многих фитопатогенных грибов [138,139]. Факторы вирулентности, известны как белковые токсины, поэтому они в дальнейшем именуемые белковыми токсинами, специфичными для хозяина. В добавление к белкам секретлируемыми фитопатогенными грибами, которые могут определять специфичность хозяина, вторичные метаболиты также могут действовать как детерминанты специфичности хозяина, такие как селективные к хозяину токсины *Alternaria alternate* и *Verticillium sp.* [139]. Суммируя всё это факторы специфичности хозяина в фитопатогенных грибах объединяют в себе белки авирулентности, белковые токсины, специфичные для хозяина и вторичные метаболиты. И белки, и вторичные метаболиты могут определять особенности специфичности хозяина в отношении фитопатогенных грибов. Идентификация факторов видовой специфичности хозяина может потребовать дополнительных усилий, в зависимости от вида фитопатогенного гриба.

1.5 Биологическая защита растений

Вредители и болезни растений оказывают пагубное воздействие на производство сельскохозяйственных культур. Эффективное управление фитопатогенами большая проблема для аграриев, и до недавнего времени для борьбы с болезнями растений широко использовались опасные и токсичные химические пестициды. Однако неизбирательное использование химических пестицидов за последние несколько десятилетий серьезно повлияло на окружающую среду и здоровье человека, изменив методы борьбы с вредителями в сторону экологически чистых и устойчивых подходов. В настоящее время, в связи с растущей осведомленностью о пользе органически выращенных продуктов для здоровья, биологический контроль является предпочтительным вариантом борьбы с болезнями растений путем применения биопестицидов, которые обеспечивают долгосрочную борьбу с вредителями после появления в полевых условиях. Кроме того, биопестициды по своей природе специфичны для хозяина, поэтому действуют только против целевого патогена. Таким образом, этот устойчивый и экологичный подход идеально подходит для интеграции с большинством других

мер защиты растений, используемых в комплексной программе борьбы с болезнями растений.

Органическое земледелие — это производство продуктов питания и клетчатки без использования каких-либо синтетических химических удобрений, пестицидов, гербицидов или генетически модифицированных организмов. Акцент делается главным образом на применении природных противомикробных органических веществ в качестве инструментов для устойчивой продуктивности и борьбы с вредителями, болезнями и сорняками. Несмотря на то, что методы органического земледелия подвержены вспышкам различных заболеваний, следовательно, помимо применения ранних профилактических мер, резко возрастает спрос на нехимические пестициды, либо применение микроорганизмов-антагонистов (т.е. агентов биологического контроля).

Биологический контроль над болезнями растений может быть точно определен как любое условие или практика, при которых выживание, вирулентность или активность патогена снижается с помощью любого живого организма, в результате чего происходит снижение частоты заболевания, вызванного патогеном.

Микроорганизмы, присутствующие в ризосфере растений, и фитопатогены подвергаются взаимодействию, которое может быть, как синергетическим, так и антагонистическим [171]. Различные свободно живущие почвенные и ризосферные микробы были идентифицированы и коммерциализированы как потенциальные антагонисты для борьбы с семенными и почвенными фитопатогенами. Биоконтроль патогенов растений основывается на двух подходах, а именно: управлении резидентной популяцией организмов и внедрении специфического организма для снижения заболеваемости [172]. Множество организмов повышают уровень и постоянство контроля за счет множества механизмов действия и, наконец, обеспечивают лучшую стабильность в широком диапазоне условий окружающей среды [173].

1.5.1 Механизмы, используемые агентами биологического контроля для борьбы с болезнями растений

Биоконтрольная активность проявляется либо непосредственно через противодействие почвенным патогенам, либо опосредованно, вызывая у растений реакцию системной резистентности. Различные механизмы, используемые агентами биологического контроля, были перечислены ниже.

-Антибиотикоз. Процесс определяется как - «взаимодействие» с участием низкомолекулярного соединения или антибиотика, продуцируемого агентом биоконтроля, оказывающим прямое влияние на рост патогена растений [174]. Способ действия антибиотиков варьируется в зависимости от их биохимической природы, которая в первую очередь действует как метаболические ингибиторы или блокирует пути синтеза белка (трансляции) [175]. Примерами некоторых мощных антибиотиков являются бацилломицин D [176], производимый *Bacillus subtilis* AU195, глиотоксин, производимый *T. virens* [177], Итурин А, производимый *B. subtilis* QST713 [178], 2,4-диактилфлороглюцинол, производимый *Pseudomonas fluorescence* F133 [179], и так далее. Известно, что несколько штаммов биоконтроля продуцируют множество антибиотиков, которые могут подавлять один или более патогенов, тем самым повышая эффективность биоконтроля.

Микопаразитизм является наиболее важной формой антагонизма, включающей прямой физический контакт с мицелием-хозяином [180]. Она включает тропический рост мицелия гриба-агента биоконтроля в направлении патогена-мишени с последующим интенсивным свертыванием и секрецией различных гидролитических ферментов, приводящих к растворению клеточной стенки патогена или мембраны [180]. Микопаразитизм можно классифицировать как четырехэтапный процесс. Первый шаг включает в себя хемотропный рост мицелия антагонистических грибов по отношению к фитопатогенным грибам с последующим распознаванием. Третий и четвертый этапы включают прямое прикрепление и деградацию клеточной стенки фитопатогенного гриба с последующим проникновением в клетку гриба-хозяина. Это один из основных механизмов, используемых *Trichoderma sp.* для уничтожения фитопатогенных

грибов [181]. *Trichoderma harzianum* проявляет огромную микопаразитарную активность в отношении *Rhizoctonia solani* [182]. Несколько микопаразитов могут атаковать один грибковый патоген, например, *Acremonium alternatum*, *Acrodontium crateriforme*, *Ampelomyces quisqualis* и *Gliocladium virens* — это несколько грибов, способных паразитировать на патогене мучнистой росы [183, 184].

-Конкуренция. Почва и поверхности живых растений создают среду с ограниченным количеством питательных веществ для почвенных микробов, что приводит к острой конкуренции между местным населением за основные питательные вещества и пространство [185]. Конкуренция рассматривается как косвенное взаимодействие между патогеном и средством биоконтроля, при котором патогены уничтожаются путем истощения источника пищи и исключения из ниши [186]. Из-за ограниченной доступности микроэлементов, таких как железо и марганец, агенты биоконтроля разработали уникальную транспортную систему для солюбилизации и хелатирования этих микроэлементов, главным образом железа, так называемых сидерофоров [187].

-Индукцированная устойчивость растений-хозяев. Индукция местной и системной резистентности у растений-хозяев является косвенным механизмом агентов биоконтроля для защиты растений от вторжения патогенов [188]. Салициловая кислота и связанный с патогенезом ген (NPR1) является ключевым фактором системной приобретенной резистентности. Определенные штаммы *Trichoderma* проникают в ткани корней и вызывают цепочку биохимических и морфологических изменений, вызывающих защитные реакции у хозяина [189]. Инокуляция *T. harzianum* в ризосферную зону винограда обеспечивает контроль над *Botrytis cinerea* в листьях [190]. *Trichoderma spp.* выделяет различные сигнальные молекулы в зоне взаимодействия, что приводит к индукции резистентности у растений, среди которых значительную роль играют белки с ферментативной или иной активностью, такие как ксиланаза, целлюлазы и другие белки [191].

Органическое земледелие делает упор на интеграцию естественных стратегий борьбы с вредителями, а не просто на использование токсичных

химических пестицидов. Среди этих естественных стратегий борьбы с вредителями техника биоконтроля является важным подходом в устойчивом сельском хозяйстве. В качестве потенциальной альтернативы опасным химическим пестицидам во всем мире приобрели популярность микроорганизмы, важные для сельского хозяйства. Недавние достижения в исследованиях оказали значительное влияние на применение средств биоконтроля. Применение различных стратегий подбора штаммов приводит к повышенной антагонистической активностью против широкого спектра фитопатогенов.

1.5.2 Скрининг потенциальных агентов биологического контроля

На протяжении многих лет многие бактериальные изоляты оценивались как потенциальные агенты биоконтроля против почвенных грибковых фитопатогенов. Однако немногие из них были в конечном итоге успешными после оценки в полевых испытаниях. Одной из основных причин этой неудачи является отсутствие надлежащих процедур скрининга для отбора наиболее подходящих микроорганизмов для борьбы с болезнями в различных почвенных средах [192]. По этой причине исследование скрининга агентов биологического контроля имеет будущее, которое характеризуется множеством технических и концептуальных проблем.

Почвенные грибковые и оомицетные патогены растений являются важными факторами, определяющими динамику популяций растений в естественной среде и в сельскохозяйственных условиях [193]. Примеры экономически важных почвенных грибных патогенов растений и оомицетов включают *F. spp.*, *Gaeumannomyces graminis*, *Verticillium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Pythium spp.* и *Rhizoctonia solani*. Несмотря на низкую начальную плотность инокулята в почве, эти патогены могут вызывать полное уничтожение растений, а иногда и полную потерю урожая [194].

Термин “биологический контроль” и его сокращенный синоним “биоконтроль” использовались в различных областях биологии, но в патологии растений этот термин применяется для использования микробных антагонистов (агент биологического контроля) для подавления заболеваний. Однако различные

определения биологического контроля, предлагаемые в научной литературе, иногда вызывали путаницу и споры; например, этот термин использовался для определения культурных практик, выполняемых производителями, таких как использование севооборотов и посадка устойчивых к болезням сортов. В самом узком смысле биологический контроль относится к подавлению одного патогена (или вредителя) одним антагонистом в одной системе возделывания. Результатом применения агентов биологического контроля является снижение частоты и тяжести заболеваний [195].

Существующие процедуры скрининга могут игнорировать влияние биотических и абиотических факторов в ризосфере. Например, двойная культура с грибковыми патогенами на агаровых чашках часто использовалась в качестве метода скрининга [196]. Однако метод может оказаться неподходящим, поскольку он исключает факторы, взаимодействующие с хозяином-антагонистом-патогеном, и он не может выбрать агенты биоконтроля, которые обеспечивают контроль над заболеванием с помощью других механизмов, таких как колонизация корней, индукция системной резистентности и/или конкуренция за нишу [197]. Независимо от этого, следует учитывать, что любой метод скрининга является избирательным; следовательно, следует ожидать, что будет обнаружена только часть антагонистической микробиоты.

Тесты на целом растении были наиболее убедительной стратегией [198], но другие тесты (*in vitro* или на отдельных листьях) также указывали на альтернативные механизмы действия, которые могли бы сотрудничать [199]. Таким образом, можно сделать вывод, что методы скрининга следует использовать с осторожностью, если необходимо получить кандидатов с многофакторными или опосредованными растениями механизмами контроля. Стратегия скрининга может быть разработана для оценки потенциала бактерий, ассоциированных с растениями.

Ценным фоном для любого подхода к скринингу является глубокое знание этиологии и жизненного цикла возбудителя, подлежащего контролю; в частности, важно иметь знания о переносе инокулята, выживаемости, критическом пороговом

уровне инокулята, процессе заражения и климатических условиях, благоприятных для вспышки и развития заболевания. Эти аспекты должны быть отражены в стратегии биологического контроля, времени и месте применения и, таким образом, первоначально при выборе подходящего метода скрининга. Однако чаще исследователи сосредотачивались на способе действия антагониста в довольно искусственных средах, которые едва ли напоминают полевую ситуацию [199]. Таким образом, поиск изолятов или штаммов микроорганизмов с антагонистическими свойствами часто выполняется с использованием чисто лабораторных методов. Поскольку большинство из этих методов имеют важные недостатки, как описано выше, их следует использовать с большой осторожностью.

Идентификация микроорганизмов биоконтроля, основанная исключительно на их эффективности на лабораторных средах, обычно смещает выбор в пользу организмов, функционирующих с помощью антибиотикоза или гиперпаразитарности, эти тесты не учитывают организмы, которые действуют путем конкуренции или индуцированной устойчивости растений-хозяев. Скрининг на антагонистов в горшках, содержащих тестируемые растения, и патоген, через болезнь, подлежащий контролю, в субстрате, более похожем на почву, чем агар, увеличивает шансы отбора агентов биологического контроля, обладающих более широким спектром желательных свойств биоконтроля. Однако довольно однородные условия окружающей среды, в которых проводятся тесты на горшках, по сравнению с большинством полевых ситуаций, обычно приводят к переоценке антагонистических штаммов. В любом случае для подбора агентов биологического контроля не стоит ограничиваться лабораторными методами подбора агентов биологического контроля.

Заключение по обзору литературы

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что взаимодействие растения и микроорганизмов достаточно многообразно и сложно. Через корневую систему растение секретирует в окружающую среду экссудаты - органические соединения – сахара, продукты фотосинтеза, а также продукты основных метаболических путей метаболизма сахаров – кислоты цикла Кребса, аминокислоты, причем преимущественно аминокислоты участвующие в процессах трансаминирования в качестве донора аминогрупп. Количество секретируемых органических экссудатов, а также их состав, зависят, как от самого растения, так от фазы его развития и от условий выращивания и может достигать нескольких десятков процентов от сухой массы растения. Секреция экссудатов происходит всегда, пока растение растет и осуществляет процесс фотосинтеза. Концентрация экссудатов в прикорневой зоне в «идеальных» условиях, когда нет процесса их биодegradации или иного способа их отвода из прикорневой зоны, может достигать сотен миллиграмм на литр водной составляющей почвенного субстрата. В реальных условиях концентрация экссудатов в прикорневой зоне растения определяется одновременно совокупностью процессов - скоростью секреции и «отвода» их из прикорневой зоны. Фактически микробная биота формируется и существует за счет выделений корневых экссудатов. Безусловно микробная биота потребляет и другие органические соединения – высокомолекулярные (остатки отмершей корневой системы растений, остатки самой растительности), но при наличии в среде сахаров и других легко метаболизируемых соединений, наблюдается эффект диауксии - последовательное потребление субстрата микроорганизмами, также потребляются высокомолекулярные субстраты после полного метаболизма секретируемых экссудатов. Формирование микробной биоты — это сложный процесс, в котором микроорганизмы взаимодействуют не только с растением, но и между собой, но самое главное, общее количество биоты увеличивается в прикорневой зоне растения за счет метаболизма экссудатов.

В формировании микробной прикорневой биоты растения принимают участие различные группы микроорганизмов, оказавшиеся по тем или иным

причинам в прикорневой зоне, там, где могут присутствовать экссудаты растения. Важным, является то, что, фитопатогенность для большинства микроорганизмов не является величиной постоянной на протяжении развития микроорганизма.

Также из анализа отечественной и зарубежной литературы стало понятно влияние и роль различных сахаров особенно в составе экссудатов на стрессоустойчивость растений к различным абиотическим и биотическим стрессам.

Подводя итог анализа литературы, была поставлена задача изучения влияния корневой экссудации на фитопатогенез грибов по отношению к растению. Понимание механизмов фитопатогенеза, а также исследование возможного управления процессом фитопатогенеза, применимого в процессе выращивания растений.

ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

В работе использовались следующие штаммы микроорганизмов, предоставленные коллекцией микроорганизмов кафедры Биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева:

-*F. oxysporum* штамм *F2106* - царство *Fungi*; отдел *Ascomycota*; класс *Sordariomycetes*; порядок *Hypocreales*. Штамм был выделен с поверхности корней огурца (с характерными признаками фузариозного увядания), выращенных 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».

Культурально-морфологические и физико-биохимические признаки: после 72 часов роста на среде Чапека при 28°C колонии штамма *F. oxysporum* F2106 имеют диаметр 40-50 мм, образует одно концентрическое кольцо, на поверхности которой заметно интенсивное спороношение. Окраска мицелия белого цвета с дискретными светло-оранжевыми стромами с расположенными на них конидиеносцами. Макроконидии веретеновидные, слегка изогнутые, заостренные на конце, разделены 2-3 перегородками. Микроконидии образуются в мицелии, часто в ложных головках, одноклеточные хламидоспоры обильные, интеркалярные и терминальные, гладкие, неокрашенные рисунок 1.

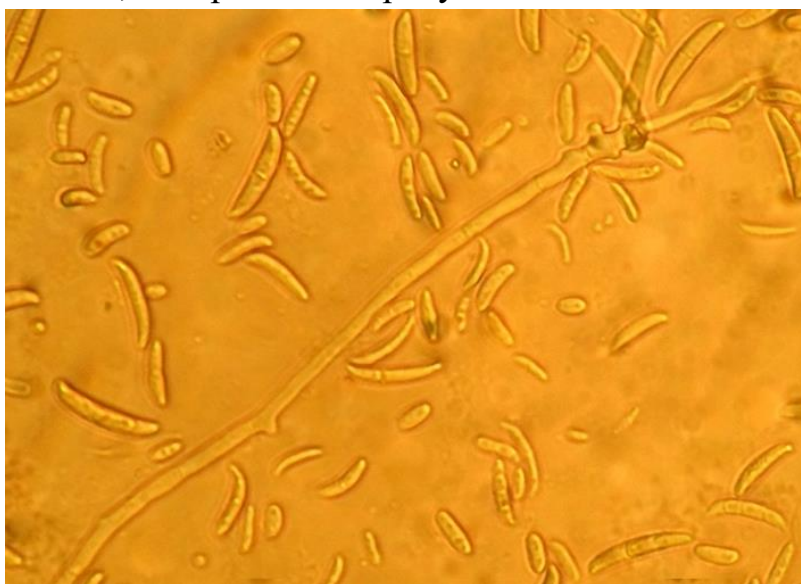


Рисунок 1 - Препарата «раздавленная» капля *F. oxysporum* F2106 (увеличение 400x)

Физиолого-биохимические признаки: Штамм является строгим аэробом, сапротрофом.

Для роста оптимальной является температура 27°C, при этом штамм может расти в диапазоне температур от 14°C до 35°C. Оптимальные значения pH среды находятся в пределах 5,8-7,2.

В качестве источника углерода и энергии утилизирует глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, арабинозу, мальтозу, сахарозу, целлобиозу, трегалозу, крахмал, целлюлозу.

В качестве источника азота *F. oxysporum* F2106 может использовать нитраты, соли аммония, органический азот в виде аминокислот и пептидов.

Размножение микроорганизма осуществляли несколькими способами. При поверхностном способе конидии и мицелий штамма вносили на поверхность скошенной агаризованной среды в пробирки, далее биомассу распределяли микробиологической петлей по поверхности агаризованной среды, и пробирки инкубировали в термостате при 28°C. Пробирки с выросшей культурой хранили при +4°C. Пересев на свежую питательную среду осуществлялся каждые три месяца.

-Trichoderma viride штамм F2001 (ВКПМ F-1532) – царство *Fungi*; отдел *Ascomycota*; класс *Sordariomycetes*; подкласс *Hypocreomycetidae*, порядок *Hypocreales*. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером F-1532. Штамм был выделен из почвы Судогодского района, Владимирской области. Видовая принадлежность культуры была определена на основании результатов секвенирования ITS региона в Национальном биоресурсном центре ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт».

Культурально-морфологические и физико-биохимические признаки: после 72 часов роста на агаризованной среде Чапека при 28°C колонии штамма *T. viride* F2001 (ВКПМ F-1532) колонии гриба с белой мицелиальной пленкой, с возрастом становятся волосистыми из-за образования воздушных гиф. Внешний вид колоний на ранних стадиях развития - белые, позднее образуется спороношение зелёного или жёлто-зелёного цвета. При культивировании при 28°C в отсутствии света,

конидии формируются через 35-45 часов. Диффузия пигмента в агар не происходит, у старых колоний присутствует слабый специфический запах. Парные ответвления формируются ниже верхушки конидиеносца и располагаются под углом 90° по отношению к основной оси. Мицелий образован гладкими, сильно ветвистыми, бесцветными гифами диаметром 1,5-12 мкм. Конидиеносцы очень ветвистые, собраны в компактные или рыхлые подушечки, с боковыми веточками - одиночными или в группах по 2-3, которые увеличиваются в длину по мере удаления от вершины конидиеносца и несут более мелкие боковые веточки, супротивные или неправильно расположенные. Конидии диаметром 3,6-4,5 мкм или 4-4,8 на 3,5-4 мкм, шаровидные или коротко-яйцевые, слегка шероховатые

Рисунок 2.

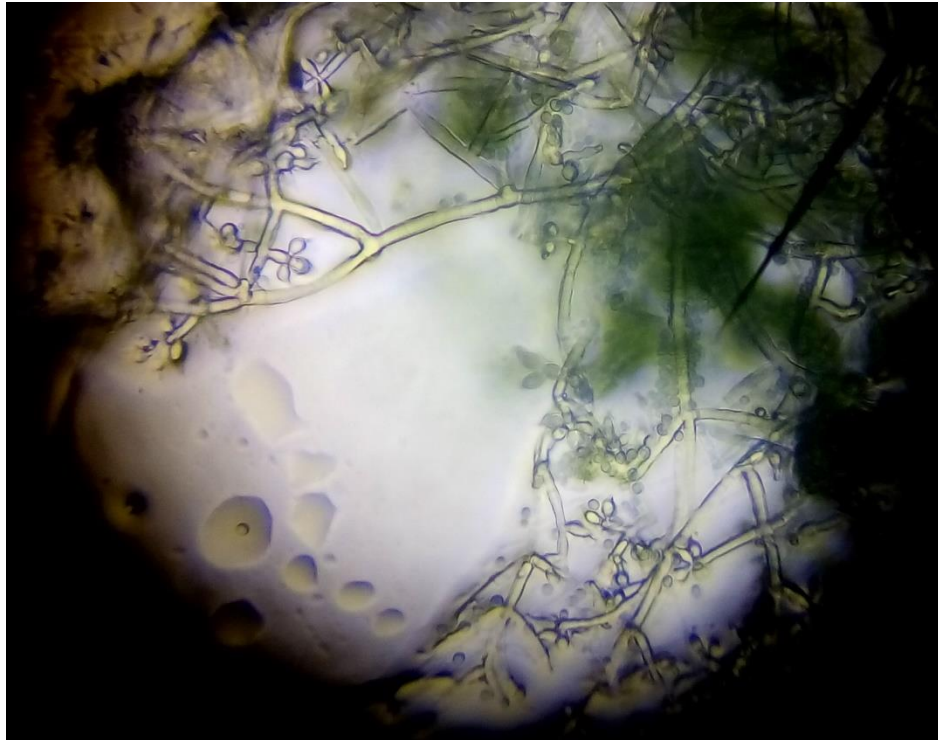


Рисунок 2 – Микроскопия препарата «раздавленная» капля *T. viride* F2001 (VKIM F-1532) (увеличение 400x)

Физиолого-биохимические признаки: Штамм является строгим аэробом, сапротрофом.

Для роста оптимальной является температура 28°C , при этом штамм может расти в диапазоне температур от 12°C до 36°C . Оптимальные значения pH среды находятся в пределах 5,2-7,2.

В качестве источника углерода и энергии утилизирует глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, арабинозу, мальтозу, сахарозу, целлобиозу, трегалозу, крахмал, целлюлозу, эскулин, салицин, гликоген, гентобиозу.

В качестве источника азота *T. viride* F2001 (ВКПМ F-1532) может использовать нитраты, соли аммония, органический азот в виде аминокислот и пептидов.

Размножение микроорганизма осуществляли несколькими способами. При поверхностном способе конидии и мицелий штамма вносили на поверхность скошенной агаризованной среды в пробирки, далее биомассу распределяли микробиологической петлей по поверхности агаризованной среды, и пробирки инкубировали в термостате при 28°C. Пробирки с выросшей культурой хранили при +4°C. Пересев на свежую питательную среду осуществлялся каждые три месяца.

Так же использовались семена огурца гибрида F₁ Атлет. Гибрид огурца среднего срока созревания, выведенный в 1999 году селекционерами агрофирмы Гавриш (г. Москва). Является одним из самых популярных гибридов в тепличных хозяйствах России и стран СНГ. В 2002 году сорт был включен в госреестр растений РФ для выращивания в защищенном грунте в продленном обороте. Допущен к использованию в Центральном, Центрально-черноземном, Северо-Кавказском, Волго-Вятском, Северном и Северо-Западном регионах России. Авторы гибрида: С.Ф. Гавриш, В.В. Шевелев, А.Е. Портянкин, А.В. Шамшина, Г.П. Додонов.

2.2 Питательные среды для культивирования и поддержки микроорганизмов

В качестве основы питательной среды для глубинного культивирования штаммов использовали жидкие среды следующего состава:

-Среда Чапека (г/л водопроводной воды) [162]. Глюкоза - 30, дрожжевой экстракт (Диа-м) - 5, пептон (Диа-м)- 5, KNO₃ - 2,5, KH₂PO₄ - 1, MgSO₄*7H₂O - 0,5, NaCl - 10.

-Минеральная среда (раствор Хогланда) (г/л водопроводной воды) [163].
Ca(NO₃)₂ - 0.6963, KNO₃ - 0.5407, NH₄NO₃ - 0.0492, K₂SO₄ - 0.1269, KH₂PO₄ - 0.17,
Mg(NO₃)₂ - 0.2223, MnSO₄ - 0.0017, ZnSO₄ - 0.0015, CuSO₄ - 0.0003, H₃BO₃ - 0.0028.
Данная среда используется для приготовления раствора для полива огурца на тепличном комбинате «Сейм-Агро» при выращивании растений в минеральной вате.

-Голодный агар: использовали минеральную среду с добавлением в неё микробиологического агара в концентрации 17 г/л.

-Агаризованная среда, содержащая экссудаты огурца: применяли минеральную среду с добавлением в неё микробиологического агара в концентрации 17 г/л. После стерилизации вносили в среду экссудаты (модель экссудатов) огурца.

В качестве основы питательной среды для поверхностного культивирования штаммов использовали твердые питательные среды, для этого к жидким питательным средам до стерилизации добавляли агар 17 г/л.

2.3 Методы стерилизации

Стерилизация посуды производили в сухожаровом шкафу. Метод используется для стерилизации стеклянной посуды – пипетки, чашки Петри, пробирки, шпатели, завернутые в бумажные листы. Стерилизация продолжается в течение 3х часов при температуре 140°C.

Стерилизацию в автоклаве применяли для питательных сред. Способ основан на прогревание насыщенным паром при давлении 1 ати в течении 30 минут.

Стерилизацию поверхности семян огурца гибрида F₁ Атлет проводили путём выдерживания семян в 95% растворе этилового спирта в течении 2 минут с последующим трёхкратным промыванием в стерильной водопроводной воде объемом 100 мл. [140]. После стерилизации поверхности семян оценивали энергию прорастания и всхожесть семян согласно ГОСТ 12038-84. Данные показатели у стерилизованных семян не отличались от показателей не стерилизованных семян.

2.4 Определение концентрации грибов при глубинном культивировании

Концентрацию грибов при глубинном культивировании оценивали методом определения сухого веса биомассы микроорганизмов состоящего из трех последовательных операций: доведения веса центрифужных пробирок (бюксов) или фильтров до постоянного значения, отделения клеток микроорганизмов культуральной жидкости и определения веса полученной высушенной биомассы [162].

2.5 Микроскопирование методом раздавленной капли

Микроскопирование методом раздавленной капли осуществлялся по стандартной методике [162] с использованием микроскопа ZEISS Primo Star (Германия).

2.6 Периодическое глубинное культивирование *T. viride* F2001 и *F. oxysporum* F2106 в условиях качалочного эксперимента

В коническую колбу Эрленмейера объемом 250 мл вносили 100 мл питательной среды. Колбу закрывали ватно-марлевой пробкой и стерилизовали в автоклаве при 1 ати в течении 30 минут. Для переноса инокулята с плотной питательной среды в конические колбы с жидкой питательной средой готовили, смыв биомассы гриба (конидий и мицелия). Для этого в асептических условиях в пробирку с, выросшей на скошенной агаризованной среде колонией гриба, наливали стерильный физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия) проводили смыв споровомицелиальной массы с поверхности агаризованной среды. Полученную суспензию в объёме 1 мл с помощью стерильной стеклянной пипетки переносили в колбы с жидкой питательной средой. Колбы устанавливали в термостатированный шейкер и перемешивали со скоростью 200 об/мин при температуре 28°C в течении 96 часов с отбором проб на протяжении культивирования.

2.7 Метод определения фитотоксичности растворов

Фитотоксичность бесклеточной культуральной жидкости исследуемых штаммов определяли методом подсчёта энергии прорастания семян огурца по методике, описанной в ГОСТ 12038-84 [142]. Стерильные семена огурца гибрида

F₁ Атлет раскладывали на двух слоях фильтровальной бумаги в стерильные чашки Петри. Культуральную жидкость, исследуемых штаммов, фильтровали с помощью мембраны с размером пор 0,22 мкм и далее увлажняли фильтровальную бумагу 2,7-3 мл фильтрата. Семена проращивали в влажных камерах при температуре 28°C в течении 3 суток. И определяли энергию прорастания семян. В качестве контроля использовали увлажнение влажных камер стерильной водой.

2.8 Метод стерильного выращивания огурца

Семена огурца выращивали в стерильных условиях в пробирках объемом 60 мл. В пробирки объемом 60 мл вносили 30 мл минерального раствора. В пробирки помещали скрученную спиралью фильтровальную бумагу длиной 1 см. и шириной 35 см., так чтобы спираль из фильтровальной бумаги касалась поверхности минерального раствора. Далее пробирки закрывали ватно-марлевыми пробками. Стерилизовали пробирки в автоклаве при 1 ати в течении 30 мин. Далее в стерильных условиях вносили стерильные семена огурца гибрида F₁ Атлет в пробирку пинцетом. Помещали семена между слоями фильтровальной бумаги. Пробирки закрывали ватномарлевой пробкой и помещали в растильную камеру. Растения проращивали в течении 14 суток при температуре 25-27°C и освещенности 1000 люмен 12 часов в сутки. По достижению проростка огурца ватно-марлевой пробки в стерильных условиях открывали пробирки и обкладывали стебель растения огурца кусочком стерильной ваты и продолжали проращивать в тех же условиях. Стерильность минерального раствора для проращивания оценивали высевом на агаризованные питательные среды. Для этого отбирали пробу объемом 1 мл из пробирки и капали на поверхность агаризованной питательной среды. Далее распределяли пробу по поверхности агаризованной питательной среды шпателем Дригальского. Чашки Петри помещали в термостат и инкубировали чашки Петри в течении 3 суток при температуре 28°C.

2.9 Метод определение концентрации редуцирующих веществ

Данная методика является модификацией метода Miller [116]. Степень расщепления биополимера определяли, используя колориметрический метод с 3,5-

динитросалициловой кислотой (ДНСК). Освобождение редуцирующих сахаров выражали в мкМ глюкозы на 1 мг препарата за 1 час инкубации.

Смесь цветного раствора готовили следующим образом: 10 г ДНСК растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды (не содержащей CO_2), затем добавляли 15 г гидроксида натрия и около 250 мл дистиллированной воды, после полного растворения добавляли 300 г К-Натартрата и доводили объем до 1 литра. После полного растворения при наличии осадка раствор фильтровали и хранили в склянке темного цвета. Раствор имеет $\text{pH}=10$, и хранится в течение 1 года.

В пробирке 1 мл цветного раствора добавляли 0,5 мл опытной пробы. В контрольные пробы вместо опытной пробы добавляли 0,5 мл дистиллированной воды. Затем все пробирки помещали на водяную баню и термостатировали при 100°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали, перемещая пробы в емкость с холодной водой. После охлаждения в пробирки добавляли по 2,5 мл дистиллированной воды и перемешивали. Оптическую плотность проб определяли на спектрофотометре при длине волны 546 нм.

Количество редуцирующих сахаров рассчитывали с использованием калибровочной кривой.

2.10 Метод определения целлюлолитической активности

В пробирки помещали опытную пробу объемом 1,0 мл и заливали по 3,0 мл ацетатного буферного раствора ($\text{pH}=5,0$) и ставили в термостат на встряхиватель (140 об. /мин.) при 37°C на 10 мин. Затем в рабочие пробирки добавляли навеску фильтровальной бумаги (100мг), свернутую гармошкой, и выдерживали в термостате 60 минут при постоянном встряхивании. Затем из каждой пробирки отбирали по 0,5 мл раствора и переносили в пробирки с предварительно налитыми туда 1,0 мл цветного раствора и по методу 2.9 (Определение количества редуцирующих сахаров) определяют количество редуцирующих сахаров. Параллельно основному опыту в каждом случае проводили контрольные пробы: 1) опытная проба, с добавлением буферного раствора вместо субстрата; 2) субстрат без опытной пробы;

Целлюлолитическую активность рассчитывали по формуле:

$$ЦА = \frac{(Доп - Дк)}{(Кп \times t)}, \text{ (мМ глюкозы/мл} \cdot \text{мин)}$$

где Доп - оптическая плотность опытной пробы;

Дк - оптическая плотность контрольной пробы;

$Kп = 0,0485 \text{ опт. Ед}_{546\text{нм}} \cdot \text{мл/мМ глюкозы}$, (коэффициент пересчета от оптической плотности раствора к мкМ глюкозы в мл раствора).

t - время инкубации в минутах.

2.11 Метод определения протеолитической активности по казеину

Данная методика является модификацией метода Kunitz M. et. al. [144].

В качестве субстрата использовали 2% раствор казеина по Гаммерстену в 1/15 М растворе К-На фосфатного буфера, рН 8,0. Субстрат перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения при комнатной температуре. Раствор казеина хранили при температуре $5 \div 7^\circ\text{C}$ не более 10 дней в темноте. Перед анализом рН раствора казеина доводили на рН-метре до рН 8,0 (либо до необходимого значения) концентрированным раствором гидроксида натрия.

К заданному объему 1/15М фосфатного буфера (рН=8,0) добавляли 2,0 мл 2% раствора казеина по Гаммерстену, помещали в водяной термостат при 37°C на 10 минут. Затем быстро приливают пробу до суммарного объема 4,0 мл. Реакцию останавливали через 25-30 минут (точное время отмечали по секундомеру), приливая 4 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Через 15 мин раствор фильтровали через средне фильтрующий бумажный фильтр («Синяя полоса»). Оптическую плотность фильтрата определяли на спектрофотометре при 280 нм. В качестве контроля использовали пробы, в которых была изменена последовательность добавления реактивов: к раствору фосфатного буфера (в соотношении аналогичном опытным пробам) добавляли 2,0 мл раствора казеина, выдерживали при 37°C параллельно опытным пробам, затем 4 мл 10% раствора ТХУ и затем раствор фермента, далее аналогично опытным. Спектрофотометр настраивали по раствору, составленному из равных частей фосфатного буфера и 10% раствора ТХУ. Протеолитическую активность (ПА) рассчитывали по формуле*:

$$ПА = ((Доп - Дк) \times \sum(V \times V_k)) / (g \times K \times T \times V_{\Phi} \times t), \text{ ПЕ/мг}$$

где Доп - оптическая плотность опытной пробы;

Дк - оптическая плотность контрольной пробы;

$\sum V = (V_{\text{ф}} + V_{\text{фб}} + V_{\text{каз}} + V_{\text{ТХУ}})$ - сумма объемов растворов: фермента, фосфатного буфера, ($V_{\text{ф}} + V_{\text{фб}} = 2,0$ мл), казеина, ТХУ, мл;

V_k - объем колбы, в которой растворяли навеску фермента массой g, мг;

K_T - тирозиновый коэффициент = 1,20 опт. Ед 280нм мл/мкМ тирозина;

t - время инкубации в минутах.

*За единицу протеолитической активности (ПЕ) принимают количество фермента, которое за 1 мин при 37°C катализирует переход в неосаждаемое 5% ТХУ состояние такого количества казеина, которое содержит 1 мкМоль тирозина.

2.12 Метод определения концентрации экссудатов

Для определения концентрации экссудатов применяли метод титриметрического определения ХПК [145]. Метод основан на окислении органических веществ избытком $K_2Cr_2O_7$ в растворе H_2SO_4 при нагревании в присутствии катализатора – $AgSO_4$. Остаток бихромата калия находили титрованием соли Мора в присутствии индикатора N-фенилантрахилоновой кислоты. Окраска изменялась с красно-фиолетовой до синевато-зеленой. По разности определяли количество бихромата калия, которое израсходовалось на окисление органических веществ в пробе. Рассчитывали величину ХПК в мгО/л по формуле:

$$X = \frac{8,0 \cdot (V_1 - V_2) \cdot M \cdot 1000}{V},$$

где V_1 - объём раствора соли Мора, израсходованный на титрование холостого опыта, см³;

V_2 - объём раствора соли Мора, израсходованный на титрование пробы воды, см³;

M - молярная концентрация раствора соли Мора, моль/дм³ КВЭ;

V - объём аликвоты пробы воды, взятый для выполнения, см³;

8,0 - масса миллимоля КВЭ кислорода, мг/ммоль.

Также значение ХПК в концентрацию глюкозы, для этого использовали калибровочный график.

Калибровочный график строили следующим образом: приготовили растворы глюкозы с концентрациями 0, 24, 50, 100 мг/л, далее определили ХПК полученных растворов согласно методике, описанной ранее. Строили график зависимости показателя ХПК растворов от концентрации глюкозы.

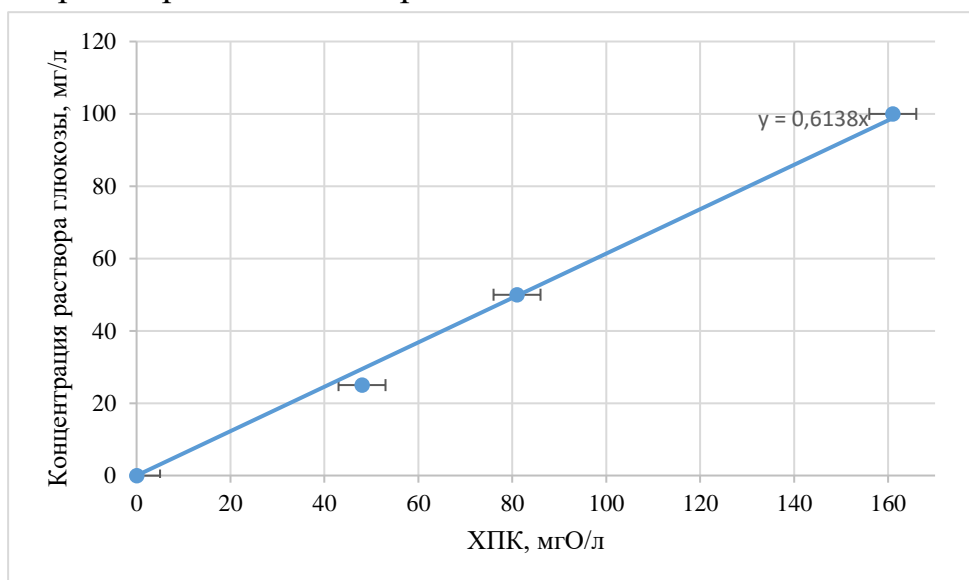


Рисунок - 3. Калибровочный график зависимости значений ХПК от концентрации глюкозы.

2.13 Анализ состава экссудатов огурца

Состав экссудатов определяли с помощью метода ВЭЖХ. Высокоэффективная жидкостная хроматография проводилась для определения содержания органических кислот и сахаров. Осуществлялась 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 проводилась 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. Сахара определяли на колонке Zorbax Carbohydrate Analysis 4.6x150 мм, предколонка NH₂ Guard Cartridges 4.6 x 12.5 мм, Agilent детектор RID, элюент бидистиллированная вода, температура колонки и детектора 60 градусов °С.

2.14 Метод встречных колоний

По дну чашки Петри проводили черту, разделяющую чашку на две равные части. Заливали агаризованную среду по 20 мл на чашку. В центр одной половины на расстоянии 2 см от черты поместили, засеяв исследуемый гриб, на таком же расстоянии в центр другой – гриб. В контроле грибы культивируются изолированно друг от друга. Учет результатов эксперимента проводили ежедневно, измеряя радиус колонии грибов в направлении, перпендикулярном черте, делящей чашку на две равные половины. На 5-е и 10-е сутки рассчитывали показатель ингибирования (Р) грибов:

$$P = ((K-A) \times 100)/K,$$

где Р – показатель ингибирования, %,

К – рост гриба в контроле, мм,

А – рост гриба в опыте, мм.

В качестве показателя «рост гриба» использовали радиус колонии гриба в направлении, перпендикулярном черте, делящей чашку на две равные половины.

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 – патогенгриб не угнетен.

Значком «+» рядом с буквой указывали нарастание гриба на колонию другого гриба, а значком «++» – отмечали появление на колонии гриба очагов спороношения другого гриба.

На 10-е сутки определяли тип взаимоотношений грибов, а также оценивали в баллах степень нарастания гриба на колонию другого гриба:

0 – нет нарастания,

1 – гриб занимает до 25 % площади другого гриба;

2 – гриб занимает 25-50 % площади другого гриба;

3 – гриб занимает 51-75 % площади другого гриба;

4 – гриб занимает 76-100 % площади другого гриба;

2.16 Определение абсолютно сухого веса растений (АСВ растений)

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

2.17 Обработка результатов экспериментов

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 подтверждается их воспроизводимостью и корреляцией экспериментальных данных, полученных с применением независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экссудаты представляют собой высокомолекулярные и низкомолекулярные вторичные метаболиты растений, выделяемые в результате корневого давления и/или взаимодействия растений и микробов и оказывающие прямое влияние на экологию ризосферы [146]. Растения используют различные механизмы транспорта для экспорта и секретируют соединения в ризосферу [147]. Причины и следствия секреции обусловлены поддержанием развития растений при взаимодействии с физико-химическими и биологическими факторами в ризосфере [148]. Как правило, экссудаты могут выделяться из корней растений путем пассивного или активного механизмов транспорта. Корни растений секретируют 5%-21% от их фотосинтетически фиксированного углерода в качестве растворимых сахаров, органических кислот, аминокислот или вторичных метаболитов, которые используются микробными сообществами в ризосфере [149]. Экссудаты были разделены на два класса [150]: низкомолекулярные соединения, такие как аминокислоты, органические кислоты, сахара, фенольные соединения и другие вторичных метаболиты, а также соединения с высокой молекулярной массой, такие как полисахариды и белки [151]. Качественный и количественный состав экссудатов определяется сортом, видом, стадией развития растения, а также различными факторами окружающей среды, в том числе типом почвы, pH, температурой и наличием микроорганизмов [152].

При подборе микроорганизмов для использования их в качестве агентов биологического контроля исследователи изучают их развитие и взаимодействие с другими микроорганизмами на стандартных питательных средах [115]. Однако, в прикорневой зоне концентрация питательных веществ существенно отличается от состава стандартных питательных сред. Существующие методы анализа взаимодействия микроорганизмов не позволяют оценивать взаимодействие различных микроорганизмов на фоне экссудатов растения. Для того, чтобы всецело оценить все параметры и поведение микроорганизмов в прикорневой зоне, необходимо разрабатывать метод изучения взаимодействия микроорганизмов на фоне экссудации растений.

Разработка этого таких методов позволит нам оценивать взаимодействие фитопатогенных микроорганизмов с другими микроорганизмами в наиболее схожих с натуральными условиями.

Для создания метода на первом этапе необходимо исследовать:

- как происходит секреция экссудатов растений;
- количественный и качественный состав экссудатов растений в прикорневой зоне;
- способны ли грибы метаболизировать экссудаты растений;
- каков будет характер взаимодействия грибов при метаболизме экссудатов растений.

Таким образом задачей первого этапа исследования было изучение секреции экссудатов растения.

3.1 Исследование экссудации растений огурца

Растения используют различные механизмы транспорта для экспорта и секретируют различные соединения в ризосферу. Как правило, экссудаты могут секретироваться из корней растений через пассивный или активный механизмы [149]. Большинство низкомолекулярных органических соединений освобождаются из растений пассивным транспортом [153]. Малые полярные и незаряженные молекулы транспортируются путем прямого пассивной диффузии, процесс, который зависит от проницаемости мембран, полярности соединений, и цитозольной pH [154]. Клетки корневой системы секретируют другие соединения, такие как вторичные метаболиты, полисахариды и белки, с помощью различных мембраносвязанных белков [154]. Для изучения процессов экссудации были проведены следующие исследования по изучению процесса секреции экссудатов огурцом гибрида F₁ Атлет.

3.1.1 Изучение секреции экссудатов и влияния экссудатов на растение

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 «Сейм-Агро». 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, потраченного 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

С увеличением времени после высадки растений в субстрат показатель ХПК в поливном и дренажном растворе увеличивался. На 30 сутки измерений показатель ХПК в дренажном растворе достигал 568±10 мгО/л, что соответствует 348 мг/л в пересчёте на глюкозу, согласно калибровочному графику, представленному в разделе «Материалы и методы». В поливном растворе также наблюдалось увеличение показателя ХПК.

В итоге, можно отметить следующие, увеличение концентрации органических веществ со временем, скорее всего связано с выделением экссудатов растений. Наличие органических веществ в дренажном растворе связано с

секрецией экссудатов растений. Наличие органических веществ в поливном растворе, скорее всего связано, с тем, что в поливной раствор добавляют часть дренажного раствора для экономии воды. Таким образом с увеличением времени вегетации растений количество органических веществ в прикорневой зоне увеличивается.

Однако помимо выделения корневой системой растений экссудатов в данной системе присутствуют различные микроорганизмы, которые развиваются, метаболизируя экссудаты растений. 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 анализ 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 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), огурцы гибрида F_1 Атлет в стерильных условиях, 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 с накоплением АСВ растений. Коэффициент рассчитывали по формуле: K (коэффициент экссудации) = ((средний АСВ растения/концентрация органических веществ (ХПК))/время выращивания) * 100000.

Для накопления экссудатов корневой системы пробирки с 30 мл. минерального раствора Хогланда и рулоном фильтровальной бумаги предварительно подвергали стерилизации в автоклаве при 1 АТИ в течении 30 минут, далее вносили на рулоны в пробирки стерильные семена огурца гибрида F_1

Атлет ватно-марливые пробки. После чего проращивали в стерильных условиях растения в растительной камере при температуре 28°C в течении 14 суток. Стерильность подтверждали высевам на агаризованные питательны среды минерального раствора, в котором происходило проращивание. Каждые 48 часов отбирали пробу из минерального раствора и измеряли показатель ХПК. Опыт проводился в 50 кратной повторности. Для оценки накопления зеленой массы растений одновременно с отбором проб проводили измерение абсолютно сухой массы растений. Для этого доставали часть растений из пробирок и высушивали между слоями фильтровальной бумаги до абсолютно сухого веса в сухожаровом шкафу при температуре 120°C в течении 3-4 часов до постоянного веса. Наносили на график (рисунок 4А) АСВ проростков.

Результат, проведенного исследования представлен на рисунке 4.

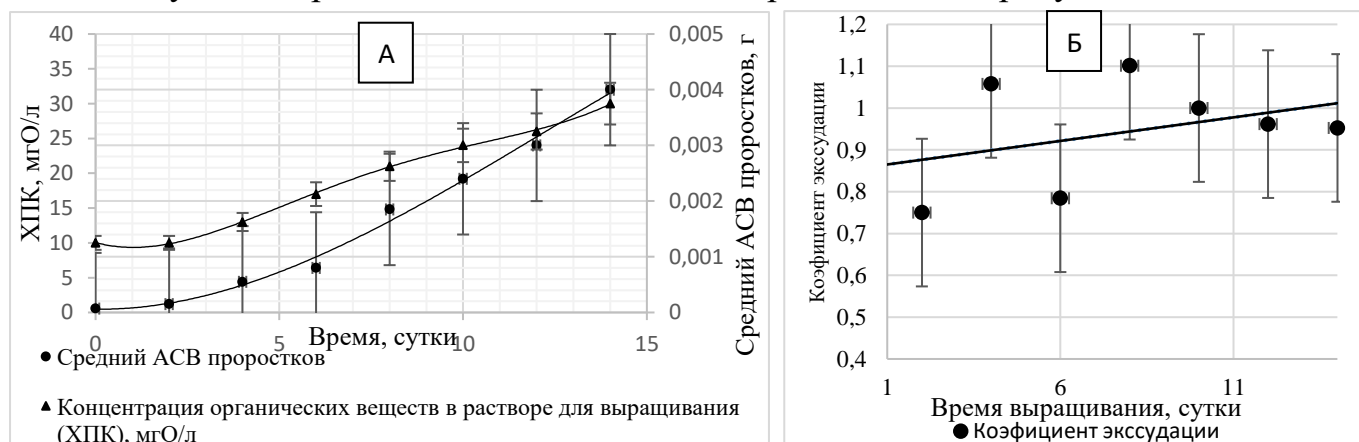


Рисунок 4 - Влияние эксудатов на растительные характеристики огурца гибрида F₁ Атлет, где А – Концентрация органических веществ (ХПК) в растворе на начальном этапе развития огурца в зависимости от времени вегетации при стерильном выращивании, Б - коэффициент эксудации огурца гибрида F₁ Атлет при выращивании в стерильных условиях

Из рисунка 4А можно отметить, что растения способны развиваться в стерильных условиях. При развитии растений происходило накопление органических веществ в минеральном растворе.

В результате анализа, полученных данных, становится понятно, что с увеличением массы растений концентрация органических веществ в прикорневой зоне возрастает, что говорит о секреции эксудатов в минеральный раствор для выращивания.

Согласно литературным данным [155] высокая концентрация экссудатов в прикорневой зоне замедляет развитие растения. Для того чтобы это проверить, был поставлен следующий эксперимент.

Для оценки влияния экссудатов огурца на ростовые характеристики растений вносили раствор экссудатов, полученных в ходе стерильного выращивания огурцов в течении 14 суток, в чашки Петри с 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 5.

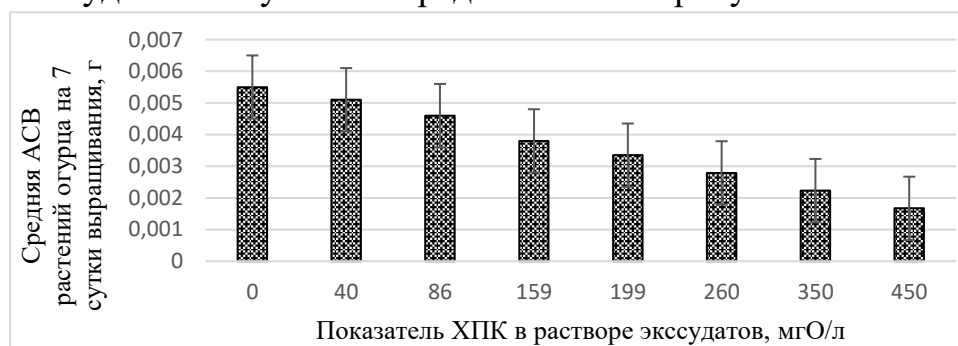


Рисунок 5 – Влияние раствора экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет на накопление АСВ растения при выращивании на влажных камерах.

Как можно отметить при проращивании огурца гибрида F₁ Атлет в влажных камерах на стерильном минеральном растворе без добавления экссудатов корневой системы к 7 суткам проростки достигли 0,005±0,001 г. средней АСВ растений. При добавлении в стерильный минеральный раствор экссудатов в концентрации 450 мгО/л наблюдалось снижение показателя средней АСВ растений на 70% и составляло 0,00167±0,001 г. Также необходимо отметить, что при увеличении концентрации экссудатов в минеральном растворе для проращивания растений показатель средней АСВ растений снижался, при этом пропорционально.

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.

Для дальнейшего исследования необходимо понять, что входит в состав экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет.

Следующим этапом исследования является изучение метаболизма экссудатов растений микроорганизмами. Однако, в связи с тем, что исследования направленные на изучение развития микроорганизмов и их взаимодействия при метаболизме экссудатов требуют стерильного накопления экссудатов растений, а при стерильном накоплении они негативно влияют на развитие растения, как было показано нами ранее. Возникла задача разработки модельного раствора экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет. Концентрация органических веществ (экссудатов) была определена нами ранее в этапах изучения концентрации экссудатов в прикорневой зоне огурца гибрида F₁ Атлет. Для составления модельного раствора необходимо исследовать какие основные компоненты входят в состав экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет. Для этого проводили следующее исследование по анализу состава экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет.

3.1.2 Анализ состава и количества экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет при выращивании растений.

Из литературных данных [150, 151] следует, что состав экссудатов различных растений достаточно многообразен. Состав экссудатов может меняться по мере развития растения [92]. На качественный состав экссудатов может влиять огромное количество абиотических и биотических факторов [88]. Однако, возможно выделить основные группы веществ, из которых состоят экссудаты растений огурца – сахара, органические кислоты, белки и пептиды и т.д. [150] Для изучения состава экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет было проведено следующее исследование.

Накопление экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет проводили, проращивая растения огурца в стерильных условиях в течении 14 суток по методу, описанному ранее. Далее концентрировали в 50 раз, полученные растворы экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет, с помощью роторно-пленочного испарителя при температуре 35-42 градуса. Полученные растворы анализировали с помощью метода ВЭЖХ. Для сравнения с помощью метода ВЭЖХ проводили анализ дренажного и поливного раствора из ТК «Сейм-агро» на разных этапах развития

растений огурца гибрида F₁ Атлет. Для этого отбирали пробы дренажа, пропускали через фильтрующую мембрану с размером пор 0,22 мкм. Далее пробы замораживали для предотвращения окисления при температуре - 25°C. Перед анализом пробы размораживали.

Анализы растворов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Осуществлялась 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 термостатируемой колонке. Анализ пиков проводили 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. Полученные хроматограммы сравнивали и анализировали. Статистическую обработку результатов, полученных в опытах, проводили с использованием стандартного пакета программы Microsoft Excel и программы Prism 7, а также в соответствии требованиями стандартов на использованные в работе методы исследования. На рисунке 6 представлена среднестатистическое количество сахаров и органических кислот в растворе экссудатов корневой системы растений при выращивании огурца гибрида F₁ Атлет в течении 14 суток в стерильных и не стерильных условиях.

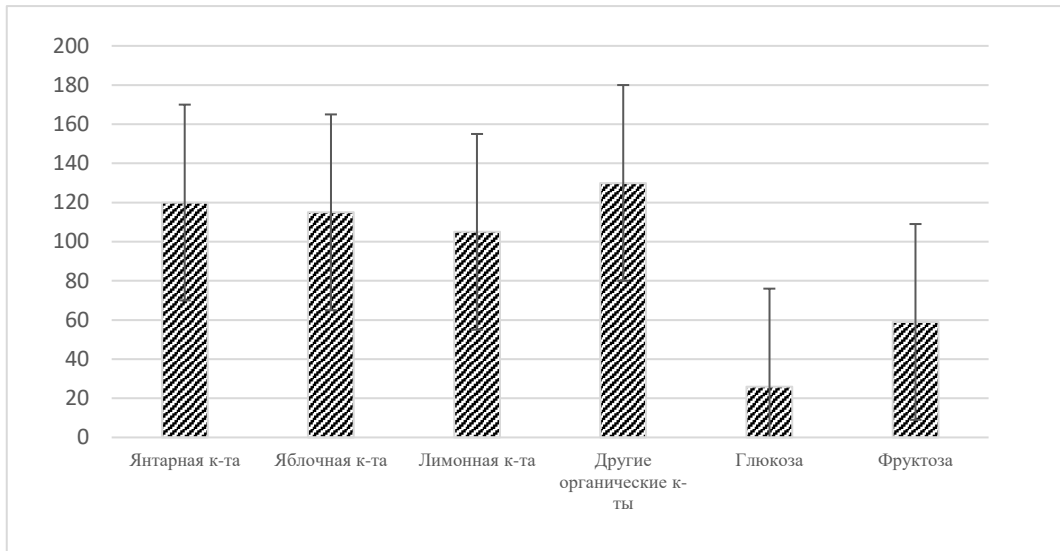


Рисунок 6. Основные компоненты экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет, выращенного в течении 14 суток в стерильных и не стерильных условиях

Из диаграммы (рисунок 6) можно отметить, что основную часть компонентов составляют органические кислоты - янтарная, яблочная и лимонная. Основные сахара — это фруктоза и глюкоза. Эти органические кислоты и сахара составляют 45-60% от общего количества компонентов экссудатов растений огурца.

На рисунке 7 показано накопление основных органических кислот при выращивании огурца гибрида F₁ Атлет во времени.

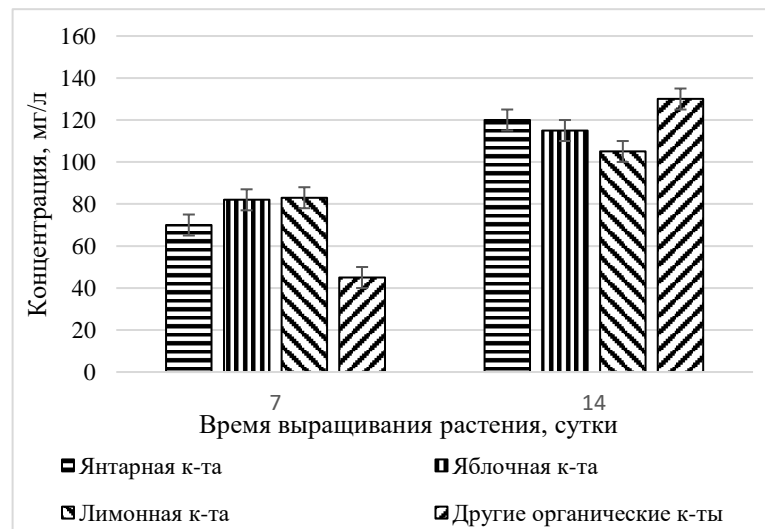


Рисунок 7. Соотношение основных компонентов экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет

Из рисунков 6 и 7 можно отметить, что на начальном этапе развития растения янтарная кислота является основным компонентом экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет, её концентрация достигает 120 мг/л к 14 суткам выращивания растений.

В ходе исследования определено, что с увеличением времени выращивания и нарастания зеленой массы увеличивается количество секретируемых экссудатов. Можно предположить, что корневые экссудаты, выделяемые растениями, тормозят развитие, а при больших концентрациях могут полностью подавить развитие растения. В реальных условиях корневая система не находится в стерильных условиях. Корневая система большинства растений погружена в почву, в которой соответственно проживают различные группы микроорганизмов. В защищенном грунте наиболее распространено выращивание растений по малообъемной технологии, когда растение выращивается в минераловатном субстрате, в котором подводятся все необходимые питательные вещества. Отличительной особенностью минераловатного субстрата является то, что он свободен от каких-либо микроорганизмов. Но как только растение попадает в эту экосистему оно выделяет огромное количество органических соединений и происходит заселение микроорганизмов через воздух, воды, человеческий фактор, таким образом, происходит формирование биоценоза, который включает в себя как патогенные, так и непатогенные микроорганизмы. Предположительно экссудаты растений метаболизируются микроорганизмами ризосферы. Согласно литературным данным, экссудаты могут влиять на формирование биоценоза прикорневой зоны растения [40]. И формирование биоценоза зависит от концентрации и состава экссудатов растений, вида и типа растения. В связи с этим важно понимать способны ли грибы метаболизировать экссудаты растений огурца гибрида F₁ Атлет. Необходимо исследовать отличается ли развитие и свойства микроорганизмов при метаболизме экссудатов растений от свойств, проявляемых на стандартных питательных средах.

Основную часть органических кислот, входящих в экссудаты огурца, составляют янтарная, яблочная и лимонные кислоты.

3.1.3 Оценка модельного раствора экссудатов в качестве основной среды для изучения развития и взаимодействия грибов.

В прикорневой зоне растения на протяжении вегетации идёт накопление органических веществ – экссудатов, при этом в прикорневой зоне происходит

развитие различных микроорганизмов [2]. Микроорганизмы метаболизируют экссудаты, тем самым потребляя компоненты экссудатов [72]. Концентрация экссудатов в прикорневой зоне зависит не только от метаболизма микроорганизмов, а также от стадии развития растения, возникающих абиотических и биотических стрессов [62].

Для проверки соответствия, выбранной модельного раствора экссудатов необходимо понять при какой концентрации экссудатов происходит развитие и взаимодействие микроорганизмов в прикорневой зоне в реальных условиях. Для подбора концентрации модельного раствора экссудатов необходимо провести исследование по определению уровня концентраций органических веществ в прикорневой зоне огурца гибрида F₁ Атлет. Далее проводили следующее исследование.

Растения проращивали в минераловатном субстрате по технологии, используемой на ТК «Сейм Агро». При вегетации растений отбирали пробы дренажного раствора при различном времени после высаживания растений для определения концентрации органических веществ. Для экспериментов отбирали пробы дренажного раствора на разных участках тепличного комбината. Оценку уровня органических веществ проводили с помощью определения показателя ХПК в пробах раствора дренажа. Результаты определения концентрации органических веществ в дренажном растворе вносили в таблицу. Для оценки концентрации микроорганизмов в прикорневой зоне растения отбирали пробы минераловатного субстрата и определяли в них концентрацию микроорганизмов с помощью последовательных разведений по Коху. Один грамм субстрата с влажностью 55-60% (влажность субстрата в ходе эксперимента не изменялась) помещали в стерильный физиологический раствор. Далее проводили разведения и высевали определенное количество суспензии на агаризованные питательные среды для определения концентрации микроорганизмов в образцах минераловатного субстрата. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатель ХПК дренажного раствора при выращивании огурца гибрида F₁ Атлет в минераловатном субстрате по технологии «Сейм Агро».

Время после высадки растений в минераловатный субстрат, сутки	Высота вегетативной части растения, см	Показатель ХПК для дренажного раствора, мгО/л	Концентрация микроорганизмов в прикорневой зоне в минераловатном субстрате, КОЕ/г
2	2±1,5	30±50	Бактерии - 150 КОЕ/г Грибы - 0 КОЕ/г
5	4±2	46±50	Бактерии - 340 КОЕ/г Грибы - 10 КОЕ/г
10	9±3,5	213±50	Бактерии - 10 ³ КОЕ/г Грибы - 10 ² КОЕ/г
14	14±6	340±50	Бактерии - 4*10 ⁵ КОЕ/г Грибы - 10 ³ КОЕ/г
18	18±8	406±50	Бактерии 7*10 ⁶ КОЕ/г Грибы 1,2*10 ⁴ КОЕ/г
26	29±10	346±50	Бактерии 6*10 ⁷ КОЕ/г Грибы 7*10 ⁵ КОЕ/г
34	42±12	654±70	Бактерии 7,6*10 ⁷ КОЕ/г Грибы 2*10 ⁵ КОЕ/г
36	59±15	795±70	Бактерии 2*10 ⁷ КОЕ/г Грибы 6*10 ⁵ КОЕ/г
43	75±15	679±70	Бактерии 4,6*10 ⁷ КОЕ/г Грибы 4,2*10 ⁵ КОЕ/г
52	86±17	596±70	Бактерии 7*10 ⁷ КОЕ/г Грибы 6*10 ⁵ КОЕ/г
56	108±20	515±70	Бактерии 9*10 ⁸ КОЕ/г Грибы 8*10 ⁵ КОЕ/г
62	146±30	360±70	Бактерии 4,6*10 ⁸ КОЕ/г Грибы 2,4*10 ⁵ КОЕ/г

Из таблицы можно отметить, что на начальном этапе развития растений концентрация органических веществ в прикорневой зоне возрастает. По прошествии 14 суток после высадки растений показатель ХПК в дренажном растворе уже достигает 340±50. Однако при дальнейшей вегетации растений показатель ХПК находится в пределах 400-800 мгО/л. Концентрация микроорганизмов в прикорневой зоне возрастает при секреции органических

веществ в прикорневую зону. Общая концентрация бактерий достигает 10^8 КОЕ/г субстрата, а грибов до 10^5 КОЕ/г субстрата.

Данное исследование может свидетельствовать, о том, что растения в ходе своего развития секретируют экссудаты. Микроорганизмы в прикорневой зоне растения метаболизируют экссудаты и по мере увеличения концентрации микроорганизмов концентрация органических веществ в прикорневой зоне снижается. Стоит отметить, концентрация (показатель ХПК) органических веществ в прикорневой зоне стабилизируется в пределах от 400 до 800 мгО/л. Концентрация микроорганизмов с начала вегетации растений постепенно возрастает и стабилизируется для бактерий и грибов до 10^8 КОЕ/г и 10^5 КОЕ/г субстрата соответственно. Так может происходить из-за наличия диффузионных ограничений, недостатков для микроорганизмов питательных веществ и т.д. Таким образом становится очевидно, что развитие и взаимодействие микроорганизмов в прикорневой зоне проходит при концентрации органических веществ в диапазоне от 400 до 800 мгО/л (ХПК). В связи с вышеизложенным допустимым будет использование концентрации модельного раствора 500 мгО/л (ХПК). В результате исследований был разработан модельный раствор экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет. Для дальнейших исследований на основе результатов ВЭЖХ и анализа общего количества органических веществ (ХПК) была предложена модель раствора экссудатов, включающая 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. Подбор данной концентрации проводился в ходе исследований по оценки концентрации экссудатов в прикорневой зоне огурца гибрида F₁ Атлет в пунктах 3.1.1-3.1.3. Дальнейшие исследования проводились на средах содержащие модель экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет. После изучения и анализа состава и концентрации экссудатов в прикорневой зоне необходимо понять, способны ли грибы развиваться при таких концентрациях и

метаболизировать экссудаты растения. Необходимо провести исследование - подходит ли модельная среда экссудатов для оценки развития и взаимодействия грибов. Для этого сравнивали, как грибы рода *Fusarium* и *Trichoderma* развиваются на модельной среде экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет по сравнению с развитием на реальных экссудатах растений. И изучить схожесть модельного раствора экссудатов с экссудатами огурца гибрида F₁ Атлет.

3.1.4 Сравнение модельного раствора экссудатов с экссудатами корневой системы растений огурца гибрида F₁ Атлет

Питательная среда для развития микроорганизмов играет существенную роль. От компонентов, входящих в состав питательной среды, зависит как микроорганизм будет синтезировать различные метаболиты, скорость его развития, какие особенности строения клеток будут возникать при метаболизме тех или иных веществ. Для того, чтобы оценить отличается ли скорость роста, макро- и микроморфология микроорганизмов при метаболизме модельного раствора экссудатов от метаболизма экссудатов растения огурца гибрида F₁ Атлет был поставлен следующий эксперимент. В качестве объектов исследования использовали почвенный фитопатоген *F. oxysporum* F2106 и распространенный агент биологического контроля *T. viride* F2001.

Стерильные экссудаты огурца получали согласно методу, описанному ранее. Определяли в растворе экссудатов концентрацию органических веществ (ХПК). Готовили модельный раствор экссудатов и стерилизовали его с помощью мембраны 0,22 мкм. Отдельно стерилизовали раствор агара в автоклаве при 1 АТИ в течении 30 мин. Далее смешивали полученные растворы, так чтобы концентрация экссудатов была 500 мгО/л (ХПК). Полученный раствор экссудатов с концентрацией и добавлением агара заливали в чашки Петри по 20 мл. Приготовление чашек Петри с агаризованной средой на основе модельного раствора экссудатов готовили путем смешивания компонентов минерального раствора Хогланда с компонентами, входящими в состав модели экссудатов, добавляли агар и воду. Далее стерилизовали раствор и разливали в чашки Петри по 20 мл. на чашку. Для проведения исследования микроорганизмы сеяли в центр

чашки Петри на агаризованные среды отдельно. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 28°C. Далее наблюдали за развитием грибов в течении 7 суток. Измеряли диаметр колоний. Оценивали и сравнивали макро и микроморфологию исследуемых микроорганизмов при развитии на агаризованных средах с экссудатами огурца гибрида F₁ Атлет и агаризованным модельным раствором экссудатов. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Сравнение ростовых характеристик *F. oxysporum* и *T. viride* при развитии на агаризованных средах с экссудатами огурца гибрида F₁ Атлет и модельным раствором экссудатов

Микроорганизм	Питательная среда	Средняя радиальная скорость роста, мм/ч	Морфологические характеристики
<i>T. viride</i>	Экссудаты огурца гибрида F ₁ Атлет 500 мгО/л (ХПК)	0,8931±0,0005	Мицелий бесцветный, стелющийся, паутинистый спороношение начинается из центра колонии на 3 сутки. Хламидоспоры отсутствуют. Гифы бесцветные, гладкие.
	Модельный раствор экссудатов 500 мгО/л	0,9031±0,0005	Мицелий бесцветный, стелющийся, паутинистый спороношение начинается из центра колонии на 3 сутки. Хламидоспоры отсутствуют. Гифы бесцветные, гладкие
<i>F. oxysporum</i>	Экссудаты огурца гибрида F ₁ Атлет 500 мгО/л (ХПК)	0,9623±0,0005	Колония хлопьевидная, с воздушным мицелием, обратная сторона кремовая, гифы септированные, бесцветные. Хламидоспоры присутствуют
	Модельный раствор экссудатов 500 мгО/л	0,9701±0,0005	Колония хлопьевидная, с воздушным мицелием, обратная сторона кремовая, гифы септированные, бесцветные. Хламидоспоры присутствуют

При сравнении развития *T. viride* и *F. oxysporum* на экссудатах растений и на модельном растворе экссудатов скорость их поверхностного радиального роста соизмерима. Различия в макро- и микроморфологии не наблюдалось. Стоит отметить, что радиальная скорость роста колоний *F. oxysporum* в среднем больше,

чем у *T. viride* на 8 %. Колонии *F. oxysporum* и *T. viride* во всех случаях развивались равномерно, и на 4 сутки достигли края чашки Петри.

В результате исследования доказано, что использование модельного раствора экссудатов возможно для изучения развития и взаимодействия *F. oxysporum* и *T. viride*. Показано, что при сравнительном культивировании данных микроорганизмов на агаризованной среде с экссудатами огурца гибрида F₁ Атлет и среде в состав которой входит разработанный модельный раствор экссудатов наблюдается схожее развитие колоний. Морфология колоний и клеток была схожа, как в случае культивирования *T. viride*, так и при культивировании *F. oxysporum*.

На основе проведенных исследований по качественному и количественному составу экссудатов огурца гибрида F₁ Атлет, а также проведение исследований по сравнительному культивированию на модельном растворе экссудатов и на экссудатах огурца гибрида F₁ Атлет показало, что использование модельного раствора экссудатов оправдано для изучения развития и взаимодействия микроорганизмов. Дальнейшие исследования проводили на модельном растворе экссудатов корневой системы.

3.2 Изучение развитие микроорганизмов на экссудатах корневой системы огурца.

Многие продукты (экссудаты) секреции (особенно органические кислоты, сахара и аминокислоты) теоретически являются легкодоступными источниками питания для микроорганизмов. Таким образом, вокруг корней возникает специфическая микрофлора, которая меняется по градиенту концентраций метаболитов, диффундирующих из корней. Исходя из этого, было принято решение исследовать метаболизм экссудатов корневой системы двумя микроорганизмами, способных по-разному воздействовать на растение. Один из них *F. oxysporum* - фитопатоген, вызывающий фузариозное увядание, другой, *T. viride*, проявляющий антагонистические свойства по отношению к фитопатогенам, в том числе за счёт выделения биологически активных веществ.

3.2.1 Изучение развитие микроорганизмов на экссудатах огурца при поверхностном культивировании

Поскольку в реальных условиях ризосферные микроорганизмы развиваются поверхностно на границе раздела фаз, возникла потребность в изучении их роста на агаризованных средах, содержащих экссудаты в качестве единственного источника питания.

В исследовании в качестве экссудатов корневой системы использовали модель экссудатов созданную, нами ранее на основе проведенных исследований. Для анализа концентрации органических веществ применяли метод титриметрического определения ХПК. Различные растворы модели экссудатов с добавлением агара в концентрации 18 г/л стерилизовали автоклавированием при 1 АТИ в течении 30 минут и вносили в стерильные чашки Петри. Растворы готовили таким образом, чтобы концентрация (ХПК) модели экссудатов в среде составляла: 1200 мгО/л, 500 мгО/л, 250 мгО/л, 180 мгО/л, 120 мгО/л. Данные концентрации были выбраны исходя из результатов анализа концентрации экссудатов дренажной воды тепличного комбината «Сейм-Агро». Концентрация модельного раствора экссудатов (ХПК) варьировался от 100 до 1200 мгО/л, в зависимости от места отбора. Далее проводили посев спор *F. oxysporum* и *T. viride* методом штриха. В качестве контроля высевали споры микромицетов на поверхность агаризованной среды Чапека, а также на голодный агар. Для сравнения проводили посев на агаризованную среду в состав которой входила глюкоза в концентрации 500 мг/л. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 28°C на 7 суток. После чего оценивали рост микроорганизмов на разных концентрациях модельного раствора экссудатов в процентах по сравнению с контролем, учитывая такие параметры, как

ширина штриха и плотность колоний на 7 сутки. Результаты представлены на рисунке № 8-11.

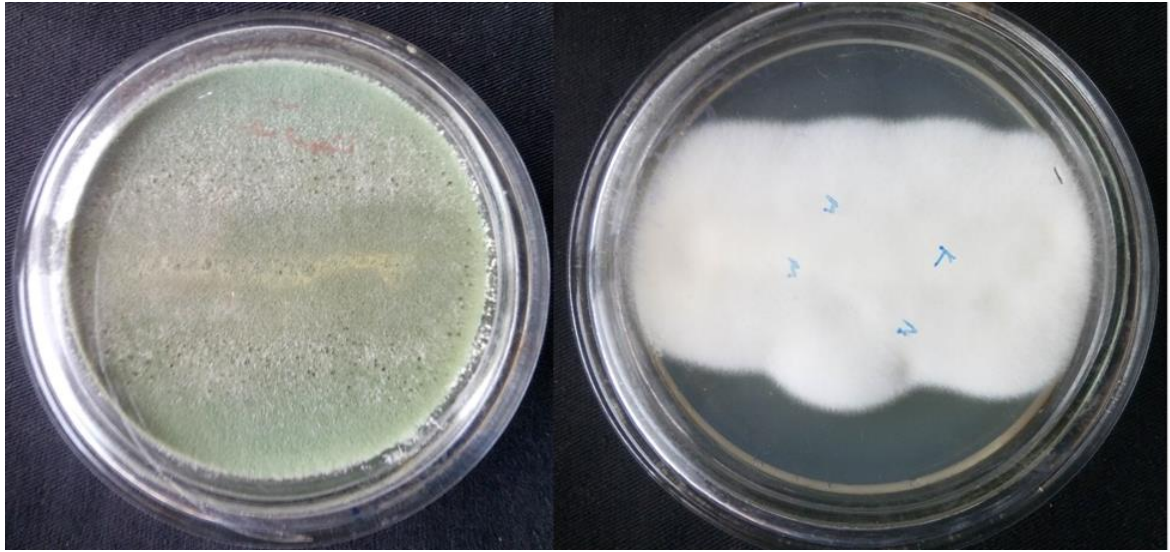


Рисунок 8. Развитие *T.viride*(слева) и *F.oxysporum* (справа) на агаризованной среде Чапека на 7 сутки

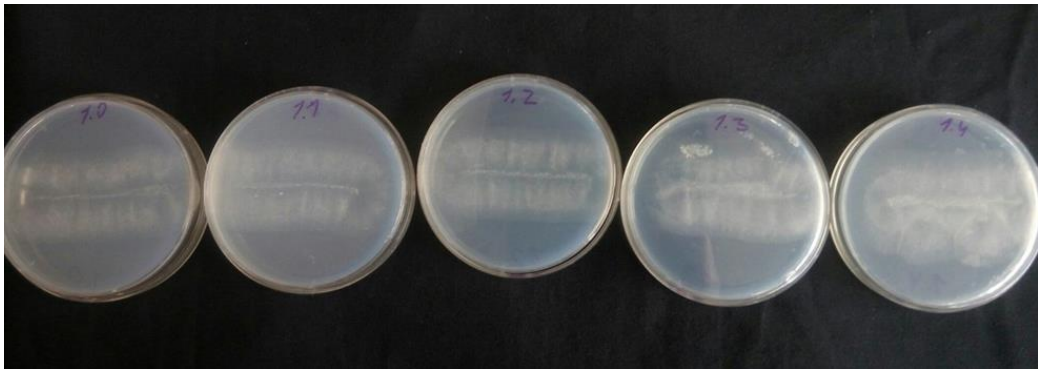


Рисунок 9. Развитие колоний *Fusarium oxysporum* на среде, содержащей модельный раствор экссудатов на 7 сутки.

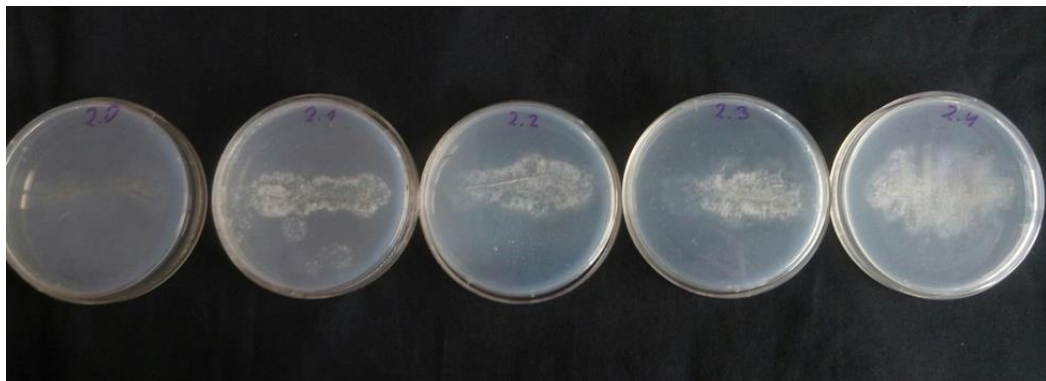


Рисунок 10. Развитие колоний *Trichoderma viride* на среде, содержащей модельный раствор экссудатов на 7 сутки.

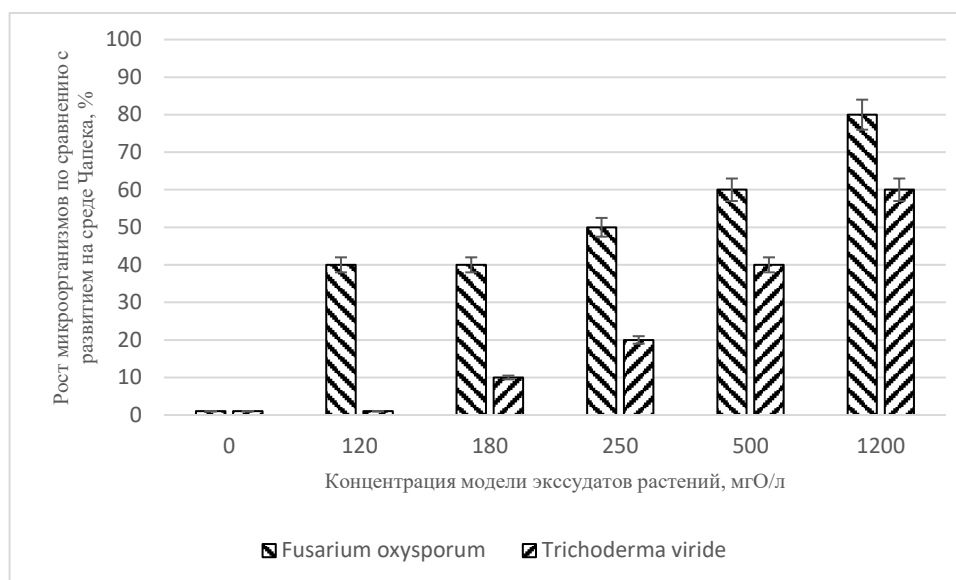


Рисунок 11. Сравнение развития *Fusarium oxysporum* и *Trichoderma viride* на средах, содержащих модельный раствор экссудатов огурца, по отношению к стандартной питательной

Как видно из диаграммы (рисунок 11), рост *T. viride* и *F. oxysporum* снижен на средах, содержащих модель экссудатов огурца в концентрации 1200 мгО/л на, соответственно, 40% и 20% по сравнению с контролем. Также видно, что при культивировании на средах, содержащих модель экссудатов, рост *F. oxysporum* и *T. viride* морфологически изменяется, наблюдается малая плотность колоний микроорганизмов по сравнению с ростом на среде Чапека, что вероятно обусловлено низкой концентрацией питательных веществ. При развитии на модельной среде экссудатов наблюдается большее образование хламидоспор, чем при развитии на агаризованной среде Чапека. При развитии на агаризованной среде с концентрацией глюкозы 500 мг/л наблюдался более активный рост, плотность колонии была больше, чем при развитии на модельном составе экссудатов, и меньше, чем на стандартной среде Чапека. Также из диаграммы можно подчеркнуть, что *F. oxysporum* проявляет рост на средах, содержащих модель экссудатов огурца в концентрации органических веществ (ХПК) 120 мгО/л, в то время как *T. viride* на этой же концентрации не развивается. К тому же было показано, что во всех концентрациях модели экссудатов в среде *F. oxysporum* проявляет лучшие ростовые характеристики, нежели *T. viride*.

В результате исследования можно отметить, что исследуемые микроорганизмы способны метаболизировать модельный раствор экссудатов

огурца. При развитии на модели экссудатов корневой системы их макроморфологические характеристики отличаются от характеристик, проявляемых на стандартных питательных средах. Важно отметить, что при метаболизме модели экссудатов растения огурца радиальная скорость разрастания колонии значительно меньше, чем при метаболизме компонентов стандартной питательной среды и при метаболизме глюкозы как единственного источника углерода.

T. viride и *F. oxysporum* при развитии на модельном растворе экссудатов значительно отличается по макро- и микроморфологии от развития на стандартных питательных средах. При использовании в сельском хозяйстве агентов биологического контроля, таких как *T. viride*, используются их свойства антагонизма по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, таким как *F. oxysporum*. Ещё одним важным свойством, которое используется при биологической защите растений, это конкуренция агентов биологического контроля за субстрат с фитопатогенными микроорганизмами. Выбор и проверка свойств агентов биологического контроля в большинстве исследований проходит с применением стандартных питательных сред. В результате наших исследований становится очевидно, что при развитии микроорганизмов на экссудатах корневой системы растений их характеристики и свойства отличаются, от характеристик и свойств при развитии на стандартных питательных средах. Следовательно, изучение характеристик и свойств, а также проявление антагонистических свойств различных микроорганизмов необходимо проводить на экссудатах (модели экссудатов). Следующим этапом исследования была оценка развития и проявление антагонистических свойств *F. oxysporum* и *T. viride* при метаболизме модели экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет.

3.2.2 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, на среду в состав которой входил минеральный раствор (раствор Хогланда) и составленный модельный раствор экссудатов огурца в концентрации 500 мгО/л (ХПК), в качестве контроля микроорганизмы сеяли на голодный агар (ранее было показано, что развитие микроорганизмов возможно на данной среде на следовых концентрациях питательных компонентов, входящих в состав минерального раствора Хогланда). Культивирование проводили в термостате при температуре 28°C. В течении эксперимента оценивали ростовые характеристики грибов, такие как плотность колонии, скорость радиального роста. Для описания внешнего вида колонии грибов использовали шкалу (раздел 2), описанную в разделе материалы и методы. На

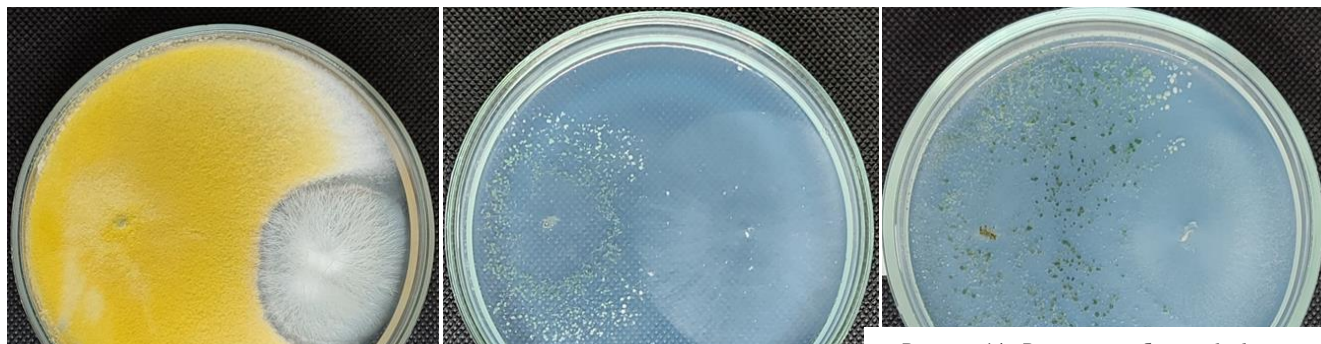


Рисунок 12 - Развитие грибов *Trichoderma viride* F2001 и *Fusarium oxysporum* F2106 при совместном развитии на среде Чапека

Рисунок 13 - Развитие грибов *Trichoderma viride* F2001 и *Fusarium oxysporum* F2106 при совместном развитии на голодном агаре

Рисунок 14 - Развитие грибов *Trichoderma viride* F2001 и *Fusarium oxysporum* F2106 при совместном развитии на среде, моделирующей экссудаты

рисунках 12-14 представлены результаты исследования. Также оценивали радиальную скорость колоний, плотность колоний и антагонистическую активность грибов по отношению к друг другу, результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. 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	1,13	0,46
Плотность колонии	среда Чапека	высокая	высокая
	голодный агар	низкая	низкая
	среда, моделирующая экссудаты	средняя	низкая
Антагонистическая активность грибов рода <i>Trichoderma</i> по отношению к грибу рода <i>F.</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	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 совместном его культивировании с *T. viride* F2001 на питательных средах, содержащих модельный раствор экссудатов растений, повышается по сравнению с скоростью роста на стандартной питательной среде. Анализ антагонистической активности показал, что при развитии грибов на среде,

моделирующей экссудаты растения, *T. viride* проявляет более яркую антагонистическую активность, которая выражается в появлении очагов спороношения *T. viride* на колонии *F. oxysporum*, 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 корневой системы была очень мала, в следствии чего *T. viride* начинала 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 при культивировании на голодном агаре.

Дальнейшее исследование направлено на понимание развития спорных форм *F. oxysporum* и *T. viride* при метаболизме модельного раствора экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет

3.2.3 Изучение развития спорных форм *F. oxysporum* и *T. viride* при метаболизме модельного раствора экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет

Известно, что грибы образуют споры, особенно выносливые и вездесущие структуры размножения, которые также часто являются инфекционными агентами заболеваний растений [157]. Споры могут выживать тысячи лет, замерзая в вечной мерзлоте. Их устойчивость к высоким уровням УФ, высыхания, давления, тепла и холода позволяет выживать спорам в самых суровых условиях [158]. Споры распространяются через факторы окружающей среды. Ветер, вода позволяют спорам быть распространенным повсеместно в окружающей среде. Споры нарушают состояние покоя и начинают после воздействия благоприятных условий. Прорастание — это механизм, который превращает спору из спящего биологического организма в вегетативно растущий и способный к половому или бесполому размножению [159]. В реальных системах споры попадают в прикорневую зону из окружающей среды. В прикорневой зоне растения единственным источником питания являются экссудаты. К сожалению,

информация о сложных сигналах, участвующих в регуляции прорастания, особенно у грибов, остается недостаточной. Для расшифровки механизма прорастания спор, при метаболизме экссудатов растения было проведено следующее исследование.

Для анализа развития спор *T. viride* и *F. oxysporum* микроорганизмы выращивали на питательной среде Чапека и на модели экссудатов растения, разработанной в ходе исследования, методом «слайдов», описанным в разделе материалы и методы .

Состав среды влияет на развитие микроорганизмов. Питательная среда Чапека является богатой, так как имеет все необходимые вещества для того чтобы микроорганизмы могли развиваться, но так как в реальных условиях развитие микроорганизмов происходит на поверхности семян или в ризосфере было также необходимо изучить развитие *F. oxysporum* и *T. viride* на среде, содержащей модель экссудатов огурца. Метод «слайдов» позволяет изучить развитие и взаимодействие данных микроорганизмов на ранних стадиях.

Агаризованную питательную среду, содержащую модельный раствор экссудатов огурца, готовили аналогичным образом, как описано ранее. Концентрацию модели экссудатов использовали 500 мгО/л (ХПК). В экспериментах в которых исследовали развитие микроорганизмов методом «слайдов», на стерильное стекло с агаризованной питательной средой наносились (в виде суспензий) споры, концентрацией 10^7 КОЕ/мл

Получившиеся препараты, микроскопировали сразу, определяя начальные размеры спор с помощью окуляр-микрометра, после чего препараты помещали в чашку Петри на ватный диск, смоченный водой, и помещали в термостат при температуре 28°C. Микроскопирование проводили каждый час в течении 18 часов. Результаты развития *T.viride* и *F. oxysporum* представлены на рисунках 15-19.

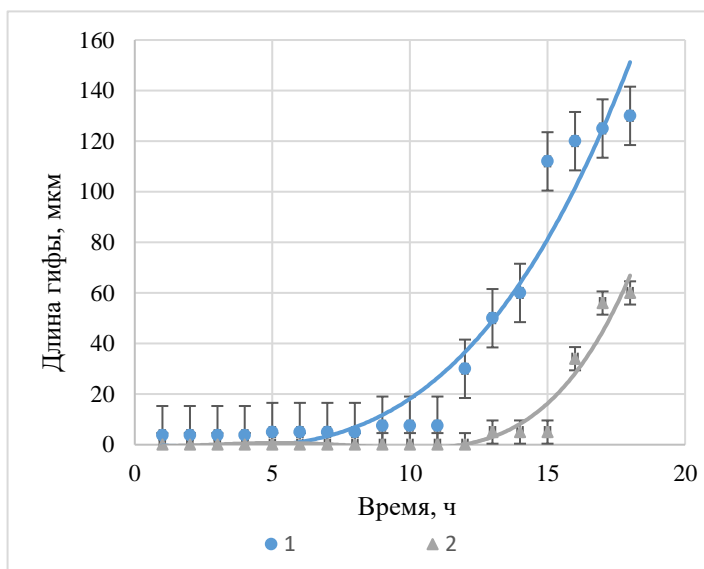
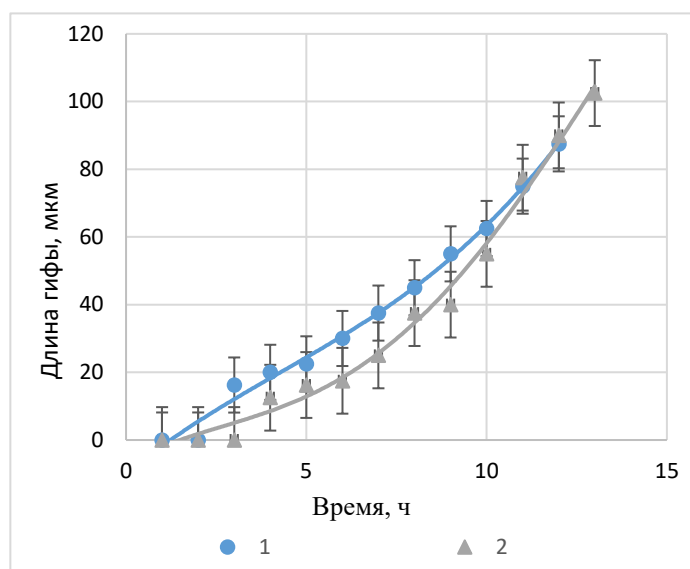


Рисунок 15 - Средняя длина гиф *F.oxysporum* при культивировании на питательной среде Чапека(1), и на среде содержащей модель эксудатов (2).

Рисунок 16 - Средняя длина гиф *T.viride* при культивировании на питательной среде Чапека(1), и на среде содержащей модель эксудатов (2).

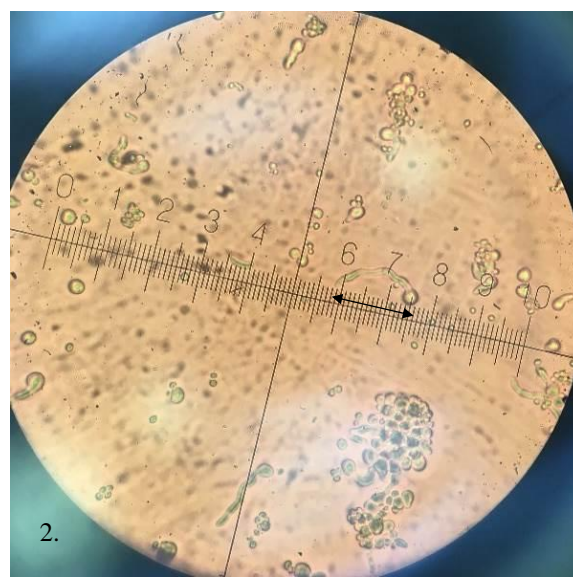
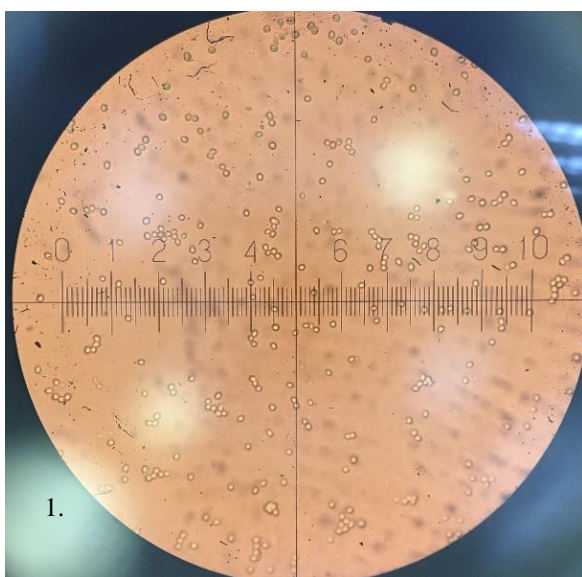


Рисунок 17. Препарат «раздавленная» капля гриба *T.viride* на 1 (1) и на 12 (2) часу, на питательной среде Чапека.

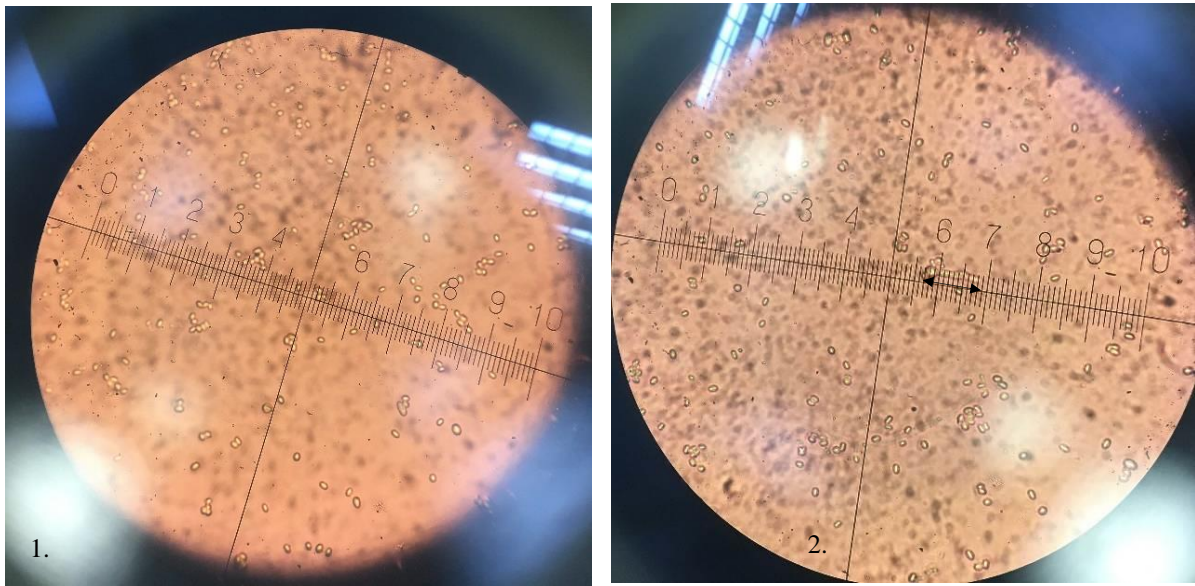


Рисунок 18. Препарат «раздавленная» капля гриба *T. viride* на 1(1) и на 13(2) часу, на модели экссудатов.

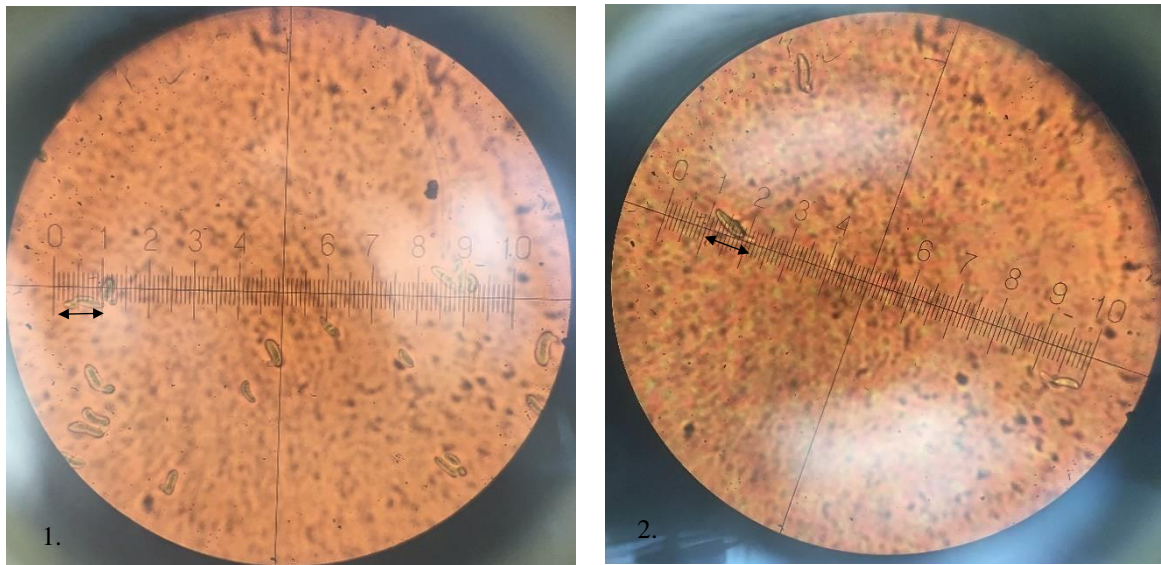


Рисунок 19 - Препарат «раздавленная» капля гриба *F. oxysporum* на третьем часу, на питательной среде Чапека (1) и на модели экссудатов (2).

Из рисунка 15, видно то, что, рост *F. oxysporum* начинается на третьем часу, также, как и на модели экссудатов, то есть, нет различия между временем прорастания *F. oxysporum* на питательной среде Чапека и на модели экссудатов.

Прорастания *T. viride* (рисунок 16), при культивировании на среде Чапека начинается на 12 часу, а при культивировании на среде, содержащей модель

экссудатов, наблюдается значительно позднее на 15 часу. Также видно из рисунков 17-19, что микромарфологические свойства грибов *T. viride* и *F. oxysporum* отличаются, наблюдаются более утончённые гифы по сравнению с гифами, при развитии на среде Чапека.

Морфологические изменения, а также увеличенное время прорастания спор *T. viride* связано с изменением состава и концентрацией питательных компонентов питательной среды, что соотносится с результатами исследований, проведенными ранее. В то время как среда Чапека богата источником углерода и различными макро- и микроэлементами, среда, содержащая модель экссудатов, содержит в себе меньшую концентрацию питательных веществ. Однако в природных условиях единственным источником питательных веществ являются экссудаты растений, следовательно, изучение свойств и развития спорных форм, изучаемых культур следует проводить на средах с моделью экссудатов.

В результате исследования поверхностного культивирования грибов стало очевидно, что развитие, макро- и микроморфология при метаболизме модели экссудатов растения значительно отличается от свойств, исследуемых микроорганизмов при развитии на стандартных питательных средах.

Помимо важности изучения свойств микроорганизмов прикорневой зоны, при метаболизме экссудатов растений, важно понимать синтезируют ли грибы токсичные для растения метаболиты, при метаболизме экссудатов (модели экссудатов) и при метаболизме компонентов стандартных питательных сред. Для изучения фитотоксичных свойств была проведена следующая серия экспериментов.

3.2.4 Изучение динамики роста и секреции токсинов *F. oxysporum* и *T. viride* на стандартных питательных средах и средах, моделирующих экссудаты огурца, при глубинном культивировании

Для изучения первоначальной реакции грибов на компоненты питательных сред, синтеза токсичных для растения веществ, была поставлена задача исследовать рост грибов на среде Чапека и оценить фитотоксичность фильтрата полученной культуральной жидкости. Такое исследование требуется для оценки

фитотоксичности исследуемых штаммов. 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 модельный раствор экссудатов растений огурца гибрида F₁ Атлет. Для проведения исследования использовали модель экссудатов, описанную ранее в концентрации 500 мгО/л (ХПК).

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 спормицелиальной массы со скошенной агаризованной среды. Глубинное культивирование проводили при на ротационной качалке при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и перемешивании 130 об./мин на протяжении 168 ч. Концентрацию микроорганизмов определяли методом измерения АСБ грибов. Для оценки токсичности штаммов использовали бесклеточную культуральную жидкость. Для этого культуральную жидкость пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и полученный фильтрат, после чего вносили фильтрат в чашки Петри «влажные камеры», после чего выкладывали семена огурца гибрида F₁ Атлет. Чашки Петри с семенами термостатировали на протяжении 3 суток при температуре 25°C , после чего определяли энергию прорастания семян. Контролем являлась стерильная водопроводная вода. Кривые роста грибов на стандартной среде и среде, содержащей модель экссудатов, а также динамика образования фитотоксичных веществ представлена на рисунке 20-23.

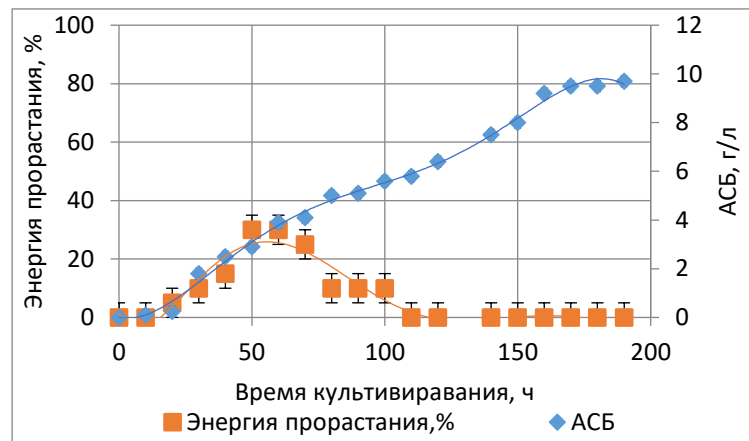


Рисунок 20 -. Динамика изменения концентрации мицелия *Fusarium oxysporum* и энергии прорастания семян, обработанных культуральной жидкостью *Fusarium oxysporum*, полученной на разных этапах культивирования на среде Чапека

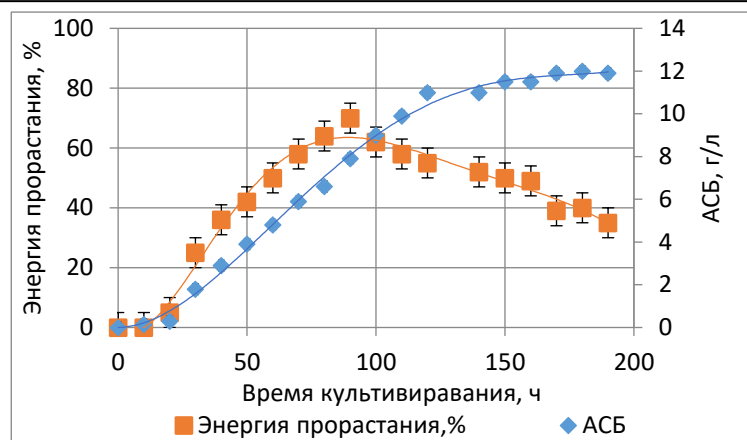


Рисунок 21 - Динамика изменения концентрации мицелия *Trichoderma viride* и энергии прорастания семян, обработанных культуральной жидкостью *Trichoderma viride*, полученной на разных этапах культивирования на среде Чапека

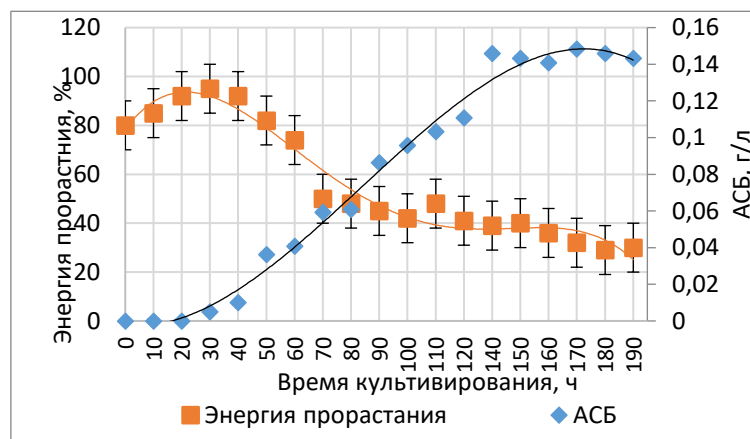


Рисунок 22 - Динамика изменения энергии прорастания семян, обработанных культуральной жидкостью *Fusarium oxysporum*, полученной на разных этапах культивирования на среде, содержащей модельный раствор экссудатов растения

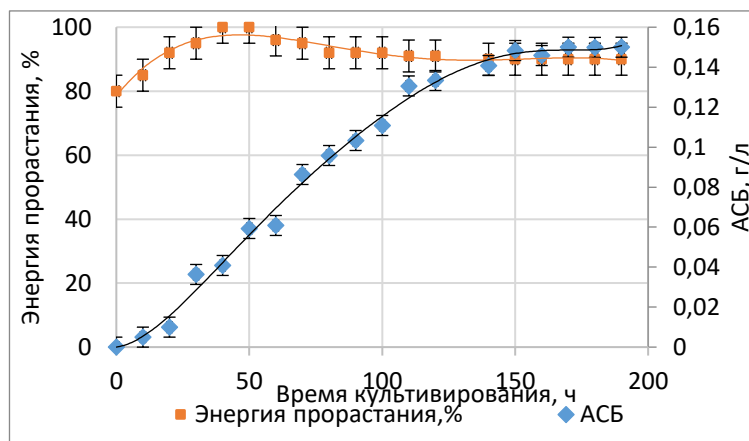


Рисунок 23 - Динамика изменения энергии прорастания семян, обработанных, безклеточной культуральной жидкостью *Trichoderma viride* F2001, полученной на разных этапах культивирования на среде, содержащей модельный раствор экссудатов растения

Кривая роста, представленная на рисунках 20 и 21, у обоих микроорганизмов имеет классический вид S-образной кривой. У *F. oxysporum* лаг-фаза длилась около 11 часов, а накопление биомассы в стационарной фазе достигло значения 9.6 г/л. У *T. viride* лаг-фаза длилась около 7 часов, а накопление биомассы в стационарной фазе достигло значения 12 г/л.

Энергия прорастания семян, обработанных стерильной средой Чапека, составляла 0%, что подтверждает догадки о присутствии ингибирующих веществ в среде.

При культивировании *F. oxysporum* сохранялись низкие показатели прорастания семян: на протяжении лаг-фазы и фазы ускоренного роста; однако на 20 часе культивирования фитотоксичность культуральной жидкости резко снижается, затем на 50 часу снова возрастает, в итоге энергия прорастания семян, обработанных 90-часовой и более поздними культуральными жидкостями, снова стала равна 0%.

Однако, при культивировании *T. viride* сохранялись нулевые показатели прорастания семян: на протяжении лаг-фазы и фазы ускоренного роста; на 10 часе культивирования фитотоксичность культуральной жидкости постепенно снижается, затем на 90 часу снова постепенно возрастает, в итоге при выходе на стационарную фазу развития энергия прорастания семян достигает 35%, что говорит о фитотоксичном эффекте культуральной жидкости.

Можно предположить, что изначально высокая концентрация в среде питательных веществ, ингибирующая прорастание семян, с возрастанием количества биомассы и к началу фазы ускоренного роста уменьшается за счёт потребления микроорганизмом токсичных для семян веществ. Дальнейшее снижение энергии прорастания, то есть возрастания фитотоксичности, в случае *F. oxysporum* предположительно связано с началом секреции токсинов. При том, что фитотоксичность начинает возрастать на середине фазы логарифмического роста, можно предположить, что в число выделяемых соединений входят и низкомолекулярные токсины, среди которых, к примеру, монилиформин, фузаревая кислота, зеараленон и т.д. С дальнейшим возрастанием фитотоксичности, возможно, связаны токсичные соединения белковой и пептидной природы. В любом случае, результаты опыта показывают, что процесс синтеза токсичных веществ коррелирует с фазами развитием гриба.

Схожая ситуация возникает при культивировании *T. viride*, однако возрастание фитотоксичности происходит позднее в стадии замедленного роста. Это может быть обусловлено накоплением в культуральной жидкости фитотоксичных метаболитов. Но, уровень токсичности этих веществ значительно ниже, чем у веществ, секретиремых при культивировании *F. oxysporum*.

Таким образом в данном этапе исследования показано, что при культивировании микроорганизмов на стандартной питательной среде в культуральной жидкости накапливаются метаболиты способные влиять на энергию прорастания семян, необходимо отметить, что при культивировании *F. oxysporum* уровень фитотоксичности культуральной жидкости был значительно выше, чем при культивировании *T. viride*.

Кривая роста, представленная на рисунке 22, *F. oxysporum*, как и в случае культивирования на среде Чапека (рисунок 20), представляет собой S-образную кривую. Однако в случае среды, содержащей модельный раствор экссудатов, лаг-фаза длилась дольше, около 21 часа, а накопление биомассы в стационарной фазе было на порядок меньше - около 0,14 г/л. Кривая роста, представленная на рисунке 23, *T. viride*, как и в случае культивирования на среде Чапека, представляет собой

S-образную кривую. Однако в случае среды, содержащей модельный раствор экссудатов лаг-фаза почти отсутствовала, а накопление биомассы в стационарной фазе было на порядок меньше - около 0,15 г/л.

В данном случае показатель энергии прорастания ни одной временной точки культивирования *F. oxysporum* не достигли 0%, что свидетельствует о значительно меньшей токсичности культуральной жидкости. Среда, содержащая модельный раствор экссудатов растения, является слаботоксичной для семян (показатель энергии прорастания семян, обработанных средой, содержащей экссудаты растения, был 80%), скорее всего аминокислоты и карбоновые кислоты, входящие в состав экссудатов, являются метаболитами растения и не влияют при таких концентрациях на показатель энергии прорастания. Негативное влияние фильтрата культуральной жидкости на прорастание семян начинает сказываться лишь к 40 часу культивирования, ближе к границе между окончанием фазы ускоренного роста и началом экспоненциальной фазы – энергия прорастания семян, обработанных культуральной жидкостью, начинает снижаться после 40 часа культивирования; возможно, это также можно объяснить тем, что *F. oxysporum* начинает секретировать токсичные вещества. Особенностью полученной кривой является то, что она более симметрична с кривой роста, нежели в случае при культивировании на среде Чапека. После установления стационарной фазы показатель энергии прорастания семян и, соответственно, фитотоксичность исследуемых растворов, находится приблизительно на одном уровне, не опускаясь ниже. Возможно, выделение токсинов на данном этапе культивирования гриба либо сильно замедляется, либо прекращается вовсе. Таких выводов нельзя сделать о токсичности культуральной жидкости, полученной в результате культивирования на среде Чапека: возможно, на стационарной фазе фитопатоген секретировал всё больше токсинов, но из-за достаточно высокой их концентрации (и других ингибиторов) на более ранних этапах культивирования, семена не прорастали.

В отличии от *F. oxysporum*, при культивировании *T. viride* уровень фитотоксичности значительно меньше. Энергия прорастания начинает снижаться на 50 часу культивирования до уровня энергии прорастания в 90% и далее остаётся

неизменной. Это может свидетельствовать о частичном отсутствии фитотоксичности метаболитов.

Было показано, что при развитии микроорганизмов в стационарных условиях есть различия в их характеристиках и свойствах при культивировании на стандартных питательных средах и средах в основе которых модельный раствор экссудатов огурца. В реальных условиях микроорганизмы прикорневой зоны развиваются и взаимодействуют при непрерывной секреции экссудатов растений. Следовательно, дальнейшие исследования развития и взаимодействия микроорганизмов необходимо проводить при непрерывном подводе компонентов питания.

3.3 Экспериментальное моделирование взаимодействий грибов и растений в ризосфере

3.3.1 Культивирование с непрерывной подачей компонентов питания

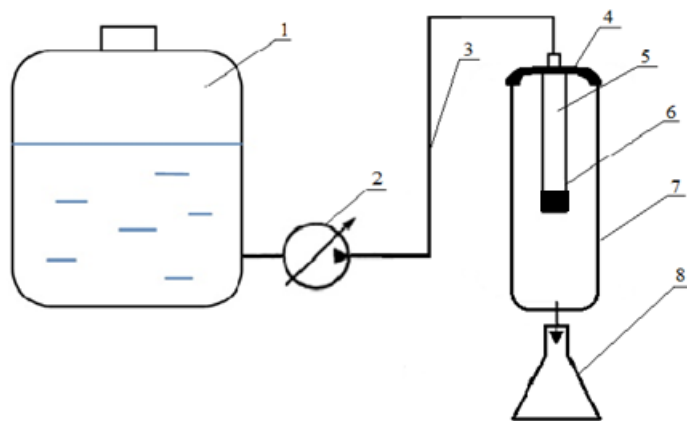
Исследования, проведенные ранее, показали, что при метаболизме экссудатов (модели экссудатов) растений характеристики и свойства грибов отличаются от характеристик и свойств при метаболизме компонентов стандартных питательных сред. В реальных условиях микроорганизмы прикорневой зоны растений развиваются и взаимодействуют при непрерывном подводе компонентов питания – экссудатов растений. Для всестороннего понимания механизмов развития и взаимодействия микроорганизмов прикорневой зоны следует проводить исследования при непрерывном подводе компонентов питания. Для этого была разработана и создана модельная установка для культивирования микроорганизмов с непрерывной подачей модельного раствора экссудатов огурца, моделирующая секрецию растением экссудатов.

3.3.1.1 Описание установки для поверхностного культивирования с непрерывной подачей компонентов питания

Для всестороннего понимания механизмов развития и взаимодействия микроорганизмов прикорневой зоны следует проводить исследования при непрерывном подводе компонентов питания. Для этого была разработана и создана модельная установка для культивирования микроорганизмов с непрерывной подачей модельного раствора экссудатов растений. В качестве

углеродосодержащего субстрата для культивирования была использован раствор, моделирующий экссудаты огурца с концентрацией 500 мгО/л (ХПК). Объем питательной среды, рассчитывали на 7-10 дней непрерывного культивирования, расход питательного раствора задавали перистальтическим насосом (2.7 мл/ч). Данный расход соответствовал 0,4 мл/см²/ч поверхности мембраны. В основе установки находился керамический фильтрующий модуль, покрытый целлюлозной мембраной (фильтровальная бумага Whatman тип 1, толщина 0,16 мм, ранее было показано, что микроорганизмы способны метаболизировать данную бумагу в качестве единственного источника углерода), через который с заданной скоростью подавался стерильный питательный раствор (модель экссудатов). Питательный раствор, проходя через керамический блок и целлюлозную мембрану попадал в емкость для отбора проб. Емкость менялась по мере накопления в ней раствора каждые 4 часа. Данная система имитирует корневую систему живого растения. Принципиальная схема установки представлена на рисунке 24.

Рисунок 24 - Установка для непрерывного поверхностного культивирования микроорганизмов: 1-емкость с питательным раствором, 2-перистальтический насос, 3-



силиконовый шланг, 4-ватная пробка, 5-керамическая трубка, покрытая целлюлозным носителем, 6- поверхность для культивирования м/о, 7-корпус реактора, 8-емкость для отбора проб.

В состав установки входил стеклянный корпус реактора, который обеспечивал стерильность. Ватная пробка сверху на корпусе реактора, необходима для свободного воздухообмена. Внутри корпуса реактора помещалась керамическая трубка с фиксированным размером пор, Площадь поверхности мембраны 7 см². С низу трубка была закрыта резиновой пробкой, сверху трубка

соединялась со штуцером, через который подавался питательный раствор. На поверхность трубки наносили мембрану из целлюлозы. Внизу реактора был штуцер для отбора проб. Реактор подключали к силиконовому шлангу и с помощью перистальтического насоса подавали питательный раствор внутрь керамической мембраны. Питательная среда, на которой проводилось культивирование, подавалась внутрь мембраны фильтровалось через нее и сливалась в приемную емкость. Обеспечение растущих микроорганизмов компонентами питания происходило как за счет диффузии компонентов по градиенту концентрации, так и за счет частичной фильтрации. Аэрация осуществлялась за счет диффузии воздуха через ватную пробку.

Грибы в виде суспензии спор с концентрацией 10^9 КОЕ/мл. равномерно 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 активность проб.

Предполагается, что условия, созданные в данной установке, моделируют рост микроорганизма в ризосфере живого растения. Микроорганизмы развиваются на поверхности керамической трубки и целлюлозной мембраны, имитирующей корень живого растения. Через поверхность мембраны непрерывно подводятся растворимые компоненты питания, аналогичные тем, что выделяет корень живого растения.

3.3.1.2. Исследование роста *F. oxysporum* при поверхностном культивировании с непрерывной подачей компонентов питания

Задачей данного исследования было изучить характер роста штамма *F. oxysporum* в условиях непрерывного культивирования на поверхности.

Культивирование проводили в установке (рисунок 25) Засев спор микроорганизма производили с помощью стерильного шприца. Для этого наносили суспензию спор *F. oxysporum* на поверхность целлюлозного носителя в объеме 500 мкл, равномерно распределяя по площади. Исследование проводили в течении 7

суток при температуре 27°C. Для оценки физиологических параметров каждые сутки из приемной емкости отбирали пробы раствора и определяли количество остаточных органических веществ (ХПК) с помощью титриметрического метода, также оценивали протеолитическую и целлюлолитическую активность в пробах, выходящих из реактора.



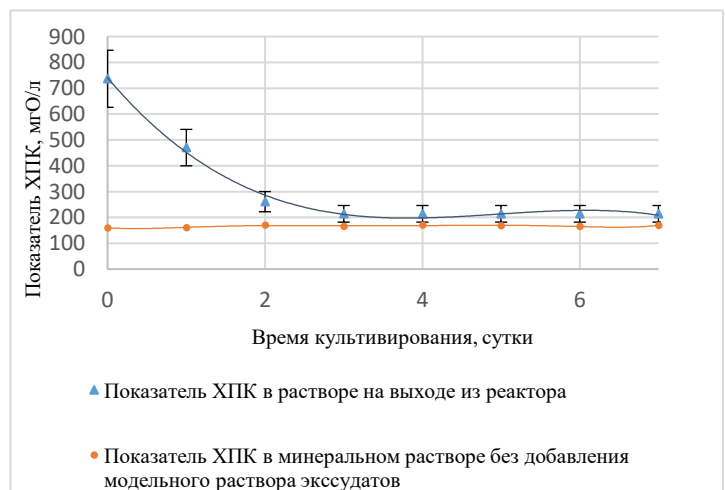
Рисунок 25 - Установка для непрерывного поверхностного культивирования микроорганизмов

На третьи сутки культивирования над поверхностью носителя стали видны волоски мицелия *F. oxysporum*. На седьмые сутки культивирования гриб разросся по всей поверхности носителя и образовал рельефные колонии, возвышающиеся над поверхностью мембраны рисунок 26.

На рисунке 27 представлен график зависимости остаточной концентрации питательных веществ в пробе, во времени.



Рисунок 26 – мицелий *Fusarium oxysporum* на поверхности целлюлозной мембраны, 7 сутки культивирования



Как видно из рисунка 27, концентрация субстрата (ХПК) на выходе из реактора, снижается, достигая стационарного состояния на уровне 200 мгО/л к 2-3 суткам культивирования, что соответствует появлению мицелия на поверхности целлюлозного носителя. Далее концентрация стабилизировалась на постоянном уровне несмотря на непрерывный подвод компонентов с питательным раствором и оставалась в неизменной концентрации в ходе всего эксперимента, при этом на поверхности целлюлозного носителя наблюдалось развитие клеток и к 7 суткам проведения исследований вся поверхность целлюлозного носителя была покрыта мицелием. Так как, в реакторе был использован целлюлолитический носитель было решено оценить уровень целлюлолитической и протеолитической активности в растворе, выходящем из реактора. В связи с этим одновременно с наблюдением за развитием и анализом показателя ХПК в растворе, выходящем из установки, анализировали целлюлолитическую и протеолитическую активность в пробах, для этого пробы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,22µм. Анализ целлюлолитической и протеолитической активности проводили согласно методике, описанной в разделе материалы и методы. На рисунке 28 представлен график зависимости целлюлолитической и протеолитической активности в выходящем из реактора растворе от времени.



Рисунок 28. Изменение целлюлолитической и протеолитической активности в выходящем растворе при поверхностном культивировании *F. oxysporum* с непрерывной подачей компонентов питания.

На графике (рисунок 28) видно, что целлюлолитическая активность в пробе постепенно возрастает и на 4 сутки достигает своего стационарного значения 0,16 глюкозы/мл*мин.

Протеолитическая активность в пробах с прохождением увеличивается на протяжении всего опыта увеличивается и колеблется в пределах 0,014 ед. ПЕ.

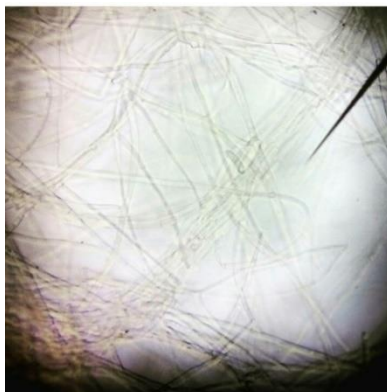
После завершения опыта носитель в стерильных условиях извлекали из стеклянной колонки и отбирали пробы для микроскопирования. Готовили препарат "раздавленная капля" и микроскопировали в световом поле при общем увеличении в 400 раз. Результат представлен на рисунке 29.

Рисунок 29 - Препарат «раздавленная капля» с поверхности целлюлозного носителя.

На препарате видны гифы *F. oxysporum* средней толщины, септированные, с включениями. Спор не большое количество. Присутствуют хламидоспоры, присутствуют как микро, так и макроконидии. Физиологическое состояние культуры отличается от соответствующего состояния, определенного нами ранее для мицелия, развивающегося на агаризованной среде Чапека.

Анализ, полученных результатов позволяет отметить, что к 3 суткам развития гриба концентрация органических веществ (ХПК) в растворе, выходящем из реактора, стала минимальной. Далее после 3-х суток наблюдается возрастание целлюлолитической активности, что может быть связано с индукцией целлюлолитических ферментов.

В результате исследований становится очевидно, что синтез целлюлолитических ферментов начинается при минимальных концентрациях



субстрата свободных компонентов питания.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что штамм *F. oxysporum* способен расти на поверхности с непрерывной подачей питательных веществ, в условиях модельной установки. Рост микромицета осуществляется за счет метаболизма органических компонентов питательной среды и на определенном этапе, при достижении минимальных значений концентрации органических веществ в растворе, начинает происходить метаболизм целлюлозы, что подтверждается повышением целлюлолитической активности в пробах, выходящих из реактора.

В заключении данного исследования показано, что при развитии *F. oxysporum* в данной системе при концентрации органических веществ (ХПК) в выходящем растворе на уровне 200 мгО/л при постоянном подводе компонентов питания происходит индукция целлюлолитических ферментов.

3.3.1.3. Исследование роста *T. viride* при поверхностном культивировании с непрерывной подачей компонентов питания

Задачей данного этапа исследования было изучить характер роста штамма *T. viride* в условиях непрерывного культивирования на поверхности при непрерывном подводе компонентов питания.

Культивирование проводили в установке, описанной ранее. Засев спор микроорганизма производили с помощью стерильного шприца. Для этого наносили суспензию спор *T. viride* на поверхность целлюлозного носителя в объеме 500 мкл, равномерно распределяя по площади. Исследование проводили в течении 7 суток при температуре 27°C. Для оценки физиологических параметров каждые сутки из приемной емкости отбирали пробы раствора и определяли количество остаточных органических веществ (ХПК) с помощью титриметрического метода, оценивали уровень протеолитической и целлюлолитической активности в пробах, выходящих из реактора.

На вторые сутки культивирования появились первые точечные заспоровавшиеся колонии *T. viride*. К четвертым суткам колонии разрослись и образовали пленку. На седьмые сутки эта пленка занимала практически всю поверхность носителя.

На рисунке 30 представлен график зависимости остаточной концентрации питательных веществ в пробах, во времени.

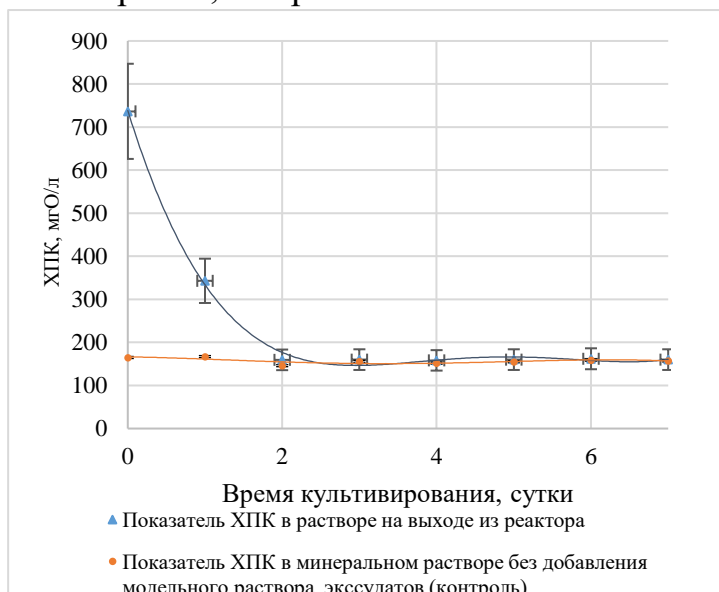
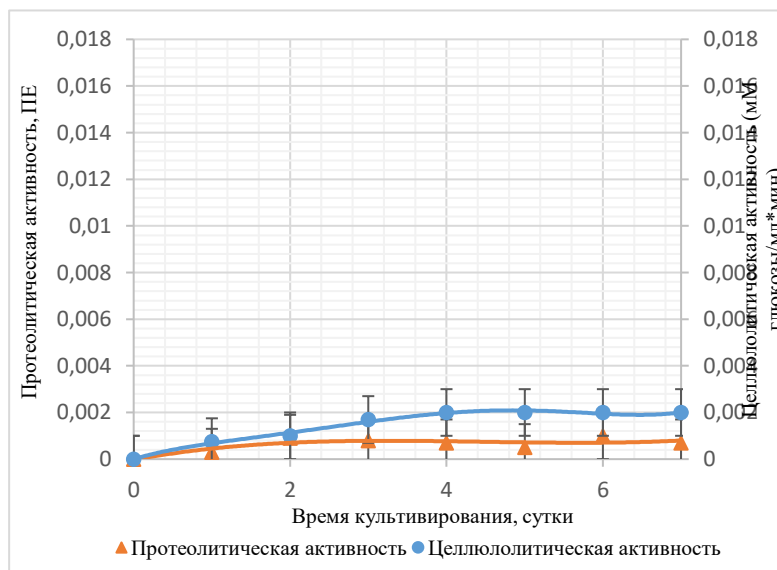


Рисунок 30 - Изменение концентрации органических веществ в растворе на выходе из реактора при поверхностном культивировании *T. viride* с непрерывной подачей компонентов питания

Концентрация питательных веществ (ХПК) на выходе из реактора снижается до определенной отметки и остается в пределах 160 мгО/л до конца эксперимента, что соответствует контрольному варианту определения, в котором отсутствовал модельный раствор эксудатов.

Так же в пробах измеряли уровень целлюлолитической и протеолитической активности. Для этого ежедневно отбирали пробы, фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Далее в пробе определяли уровень целлюлолитической и протеолитической активности, согласно методике, описанной в разделе материалы



и методы. Полученный график зависимости целлюлолитической и протеолитической активности от времени представлен на рисунке 31.

Рисунок 31 - Изменение целлюлолитической и протеолитической активности при поверхностном культивировании *T. viride* с непрерывной подачей компонентов питания

Целлюлолитическая активность возрастает с течением времени на протяжении всего эксперимента. Однако остается значительно ниже значения, которого достигла целлюлолитическая активность в эксперименте с *F. oxysporum*.

На протяжении эксперимента протеолитическая активность оставалась практически стационарной и колебалась в пределах 0,0005-0,0010 ед. ПЕ.

На 7 сутки культивирования опыт останавливали. Носитель, с разросшимся на нем с микроорганизмом, в стерильных условиях извлекался из стеклянной колонки и отбирались пробы для микроскопирования. Препараты "раздавленная капля" микроскопировали в световом поле микроскопа при общем увеличении 400. Фото полученного препарата представлено на рисунке 32.



Рисунок 32 - Препарат «раздавленная капля с поверхности целлюлозного носителя при развитии *T. viride* в разработанной системе при непрерывном подводе компонентов питания на 7 сутки культивирования.

При микроскопировании отмечалось большое количество характерно окрашенных спор. Мицелий средней толщины, без включений, много конидиеносцев. Физиологическое состояние культуры в пределах нормы.

Анализ, полученных результатов позволяет сказать, что к 2 суткам развития концентрация органических веществ в растворе, выходящем из реактора, стала минимальной. Далее после 2-х суток наблюдается возрастание целлюлолитической активности в дренажном растворе, что может быть связано с индукцией целлюлолитических ферментов.

В результате исследований становится очевидно, что синтез целлюлолитических ферментов начинается при минимальных концентрациях субстрата свободных компонентов питания.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что штамм *T. viride* способен расти на поверхности с непрерывной подачей питательных веществ, в условиях модельной установки. Рост микромицета осуществляется за счет метаболизма органических компонентов питательной среды и на определенном этапе, при достижении минимальных значений концентрации органических веществ в растворе, начинает происходить метаболизм целлюлозы за счет синтеза целлюлолитических ферментов.

В заключении данного исследования показано, что при развитии *T. viride* в данной системе при концентрации органических веществ (ХПК) в выходящем растворе на уровне 140 мгО/л при постоянном подводе компонентов питания происходит индукция целлюлолитических ферментов. Однако уровень целлюлолитической активности ($0,002 \pm 0,001$ мМ глюкозы/мл*мин) значительно меньше, чем при культивировании *F. oxysporum* ($0,016 \pm 0,001$ мМ глюкозы/мл*мин) в данной системе.

В результате исследования 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).

T. viride агент биологического контроля. А её свойства конкуренции за субстрат используется в системе биологической защиты растений. И *T. viride*, и *F. oxysporum* способны сорбироваться и колонизировать поверхность корневой системы. А их взаимодействие в реальных условиях в прикорневой зоне растений происходит при непрерывном подводе компонентов питания – экссудатов растения. Дальнейшим этапом исследования было изучение совместного развития в модельной системе при подводе компонентов питательной системы в описанной ранее установке.

3.3.1.4 Исследование роста *T. viride* с подсевом *F. oxysporum* при поверхностном культивировании с непрерывной подачей компонентов питания

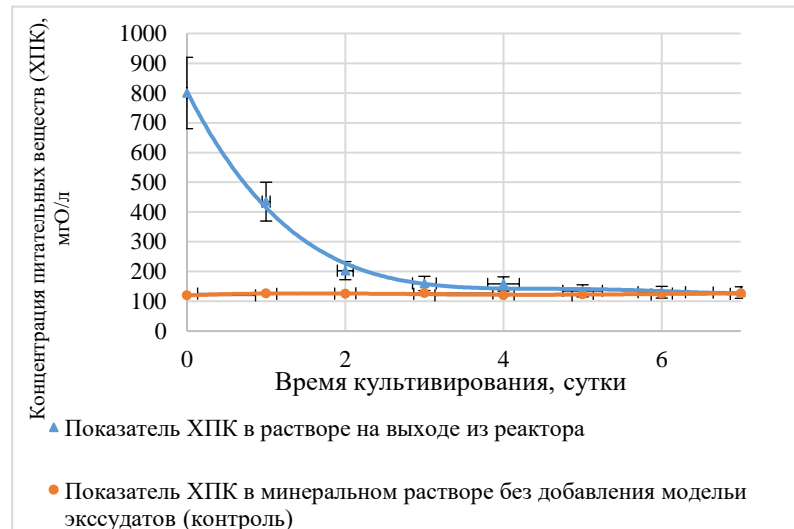
Задачей этого исследования было изучить взаимодействие штаммов *T. viride* и *F. oxysporum* при культивировании на поверхности с непрерывным подводом питательной среды. При том была смоделирована ситуация, при которой в прикорневой зоне изначально присутствовал грибок *T. viride* и на определенном этапе в прикорневую зону попал грибок *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.

Исследование проводили в условиях разработанной нами установки. Эксперимент проводили при 27°C в течении 7 суток. Ежедневно на выходе из реактора отбирали пробы для проведения анализов по определению, в выходящем из системы растворе, концентрации органических веществ (ХПК), целлюлолитической и протеолитической активности. После запуска установки и отбора нулевой пробы, на мембрану наносили 500 мкл. суспензии спор (10^9

КОЕ/мл) *T. viride*, равномерно распределяя по поверхности целлюлозного носителя. На вторые сутки культивирования, после прорастания спор *T. viride* и образования на поверхности целлюлозного носителя видимого мицелия, на носитель наносили 500 мкл. суспензии спор (10^9 КОЕ/мл) штамма *F. oxysporum*.

На третьи сутки культивирования на носителе появились заспоровавшиеся точечные колонии *T. viride* темно зеленого цвета. С течением времени они разрастались и к концу культивирования они занимали больше двух третей поверхности носителя, однако не образовывали "пленки". Рост *F. oxysporum* на поверхности носителя замечен не был.

В пробах, выходящих из реактора, оценивали остаточную концентрацию питательных веществ, с помощью определения уровня ХПК. Полученный график



зависимости остаточных концентраций (ХПК), в выходящем из реактора растворе от времени отбора проб показан на рисунке 33

Рисунок 33 - Изменение ХПК при поверхностном культивировании *T. viride* с подсевом *F. oxysporum* при непрерывной подаче компонентов питания.

Концентрация питательных веществ (ХПК) снижалась в первые сутки культивирования и затем на 2 сутки достигала своего минимального значения примерно 120 мгО/л.

Затем в пробах, выходящих из реактора, определяли уровень целлюлолитической и протеолитической активности. Раствор перед анализом профильтровывали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. На рисунке 34 показан график зависимости целлюлолитической и протеолитической активности в пробах в зависимости от времени культивирования.

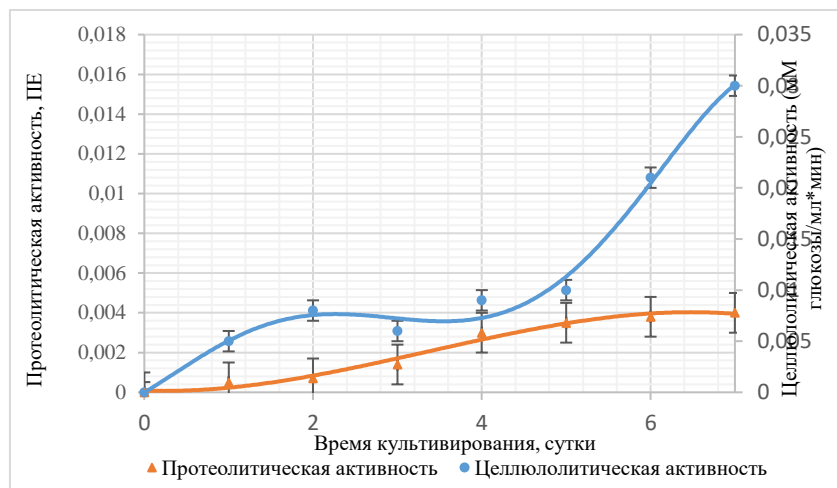


Рисунок 34 - Изменение целлюлолитической и протеолитической активности при поверхностном культивировании *T. viride* с подсевом *F. oxysporum* с непрерывной подачей компонентов питания.

Целлюлолитическая активность в пробах, на выходе из реактора, в первые сутки возрастает, затем после подсева второго микроорганизма наблюдается спад активности до значения 0,006 ммМ глюкозы/мл*мин и временный стационар. Начиная с 4 суток целлюлолитическая активность в пробах продолжает свой рост до окончания эксперимента.

Первые двое суток протеолитическая активность в пробах находилась на уровне 0,0005 ед.ПЕ. Однако после подсева штамма *F.* в установку протеолитическая активность в пробах начала интенсивно увеличиваться, и эта тенденция сохранялась до окончания опыта.

Наличие целлюлолитической активности в пробах, выходящих из реактора, говорит о том, что микроорганизмы метаболизируют целлюлозу. Примечательно, что при совместном культивировании целлюлолитическая активность значительно выше, чем при культивировании микромицетов по отдельности. Спад и стационар

уровня ферментативной активности может быть объяснен антагонистическим воздействием выбранных культур друг на друга.

При культивировании микроорганизмов отдельно ни у одного из выбранных штаммов протеолитическая активность в пробах, выходящих из реактора, не достигала столь высоких значений. На основе анализа литературных данных [161] нам известно, что ферментативные системы *T. viride* способны разрушать клеточные стенки других микромицетов. Наблюдаемое изменение протеолитической активности можно связать с тем, что в присутствии антагонистического штамма *Trichoderma* интенсифицировала индукцию протеолитических ферментов, для борьбы с другим микроорганизмом.

Также по окончании культивирования анализировали наличие микромицетов на поверхности целлюлозной мембраны, для этого делали отпечаток целлюлозной мембраны на поверхность агаризованной среды и споромицелиальную массу отделяли иглой от целлюлозного носителя и помещали на поверхность агаризованной питательной среды и выращивали в микроорганизмы в термостатируемых условиях. Результаты представлены на рисунке 35.

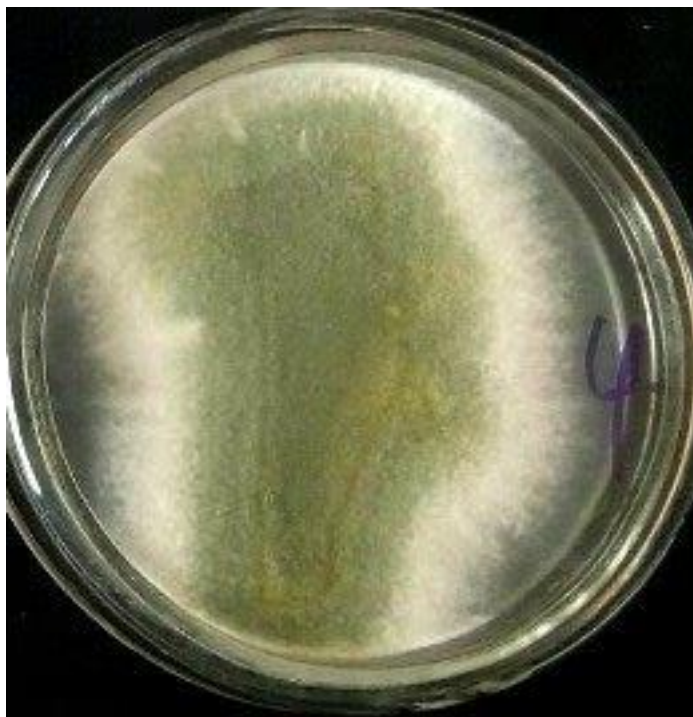


Рисунок 35 – Высев микроорганизмов с поверхности целлюлозного носителя на агаризованную среду Чапек.

На агаризованной среде при высеве микроорганизмов с поверхности целлюлозного носителя проросли только колонии *T. viride*. Колонии гриба разрастались от центра чашки. На третьи сутки культура частично заспоривалась. Колоний *F. oxysporum* не было обнаружено, даже в начальный период культивирования.

Для того, чтобы оценить состояние и наличие спор *F. oxysporum* на поверхности носителя с носителя были отобраны пробы для микроскопирования.



Рисунок 36 - Препарат «раздавленная капля» с поверхности целлюлозного носителя.

Для этого иглой отщипывали часть целлюлозного носителя и микроскопировали. Препараты "раздавленная капля" микроскопировали в световом поле микроскопа при общем увеличении 400. Фото препарата представлено на рисунке 36.

На препаратах присутствовало большое количество мицелия и спор *T. viride*. Были обнаружены макроконидии *F. oxysporum*, однако гифы и микроконидии этого штамма на препаратах отсутствовали.

Суммируя полученные данные: отсутствие визуально заметного роста *F.* на носителе, резкое возрастание активности экзоцеллюлярных ферментов в культуральной жидкости, после подсева фитопатогенного гриба, а также данные, полученные при изучении носителя после окончания культивирования - можно утверждать, что *T. viride* подавила рост *Fusarium*.

Результаты эксперимента показали, что при совместном культивировании выбранных штаммов на поверхности с непрерывным подводом питательной среды *T. viride* полностью подавляет рост *F. oxysporum*. Клетки и споры фитопатогенного гриба, скорее всего, были повреждены под действием ферментативных систем *T. viride*. Установлен антагонистический характер взаимодействия *T. viride* подавила рост *F. oxysporum*.

Таким образом, установка, разработанная в ходе исследований, даёт возможность исследовать взаимодействие микроорганизмов, приближенных к реальным условиям при непрерывной секреции экссудатов (модели экссудатов) растения. Так как усиление 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 экссудатов (модели экссудатов) на фитопатогенность грибов.

3.4 Исследование снижения биотических стрессовых воздействий с помощью внесения модели экссудатов при выращивании огурца (*Cucumis sativus*)

Биотический стресс является основным препятствием для урожайности, качества продуктов питания и глобальной продовольственной безопасности. Определяющей целью сельскохозяйственной биотехнологии являются методы борьбы с заболеваниями. Установлено, что факторами передачи возбудителей заболевания являются зараженные семена и почва. Поражение растения фитопатогеном складывается из нескольких этапов. Сначала микроорганизм попадает в прикорневую зону, начинает сорбироваться, питаться выделяющимися экссудатами и колонизировать окружающую его зону. Наличие стрессовой ситуации для растения приводит к подавлению фотосинтетической активности, и микроорганизму перестает хватать элементов питания. Микроорганизм начинает выделять токсины и поражать корень. При сильном развитии болезни растения погибают. Важно предотвратить атаку фитопатогена на растение в случае стрессовой ситуации. Поэтому на следующем этапе исследований мы провели

серию экспериментов, в которой изучали воздействие *F. oxysporum* на растение в присутствии модельной системы экссудатов, которая была показана на основе разработок, проведенных ранее.

Задачей настоящего эксперимента является изучение способов снижения фитопатогенных свойств *F. oxysporum*, с помощью внесения модельного раствора экссудатов при выращивании растений.

Для проведения исследования были предварительно в нестерильных условиях выращены огурцы до появления 2 настоящих листьев. Таким образом был смоделирован 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 37). 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 экссудатов в концентрации органических веществ (ХПК) 500 мгО/л подавался 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 37). 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 28оС в течение 3 суток до

образования видимых колоний. Результаты исследования представлены на рисунках 35 и 36.

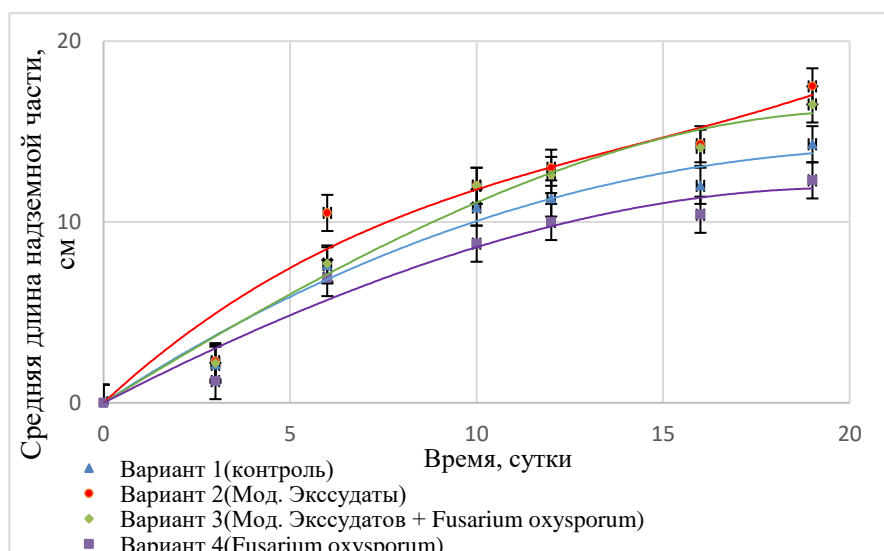


Рисунок 36 - Часть стебля на агаризованной питательной среде (внутренняя часть вариант 4)

Из рисунка 35А и 35Б можно отметить, что внутри корневой системы *F. oxysporum* в варианте 3 не был обнаружен, однако в варианте 4 (рисунок 35В) внутри корневой системы *F. oxysporum* обнаружился. После подсева в прикорневую зону *F. oxysporum* (вариант 4) наблюдается спад развития растения (рисунок 36). Колонии гриба разрастались от центра чашки, где были размещены стебли. Также колонии расположены равномерно по всей длине стебля огурца. Последующее микропирование колоний подтвердило, что по всей длине корневой системы были обнаружены исходные клетки *F. oxysporum*. Таким



Рисунок 35 – 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)

образом, можно говорить о том, что клетки *F. oxysporum*, внесенные в прикорневую зону, при его прорастании достигли корневой системы, по всей видимости

колонируя 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.

Таким образом, была поставлена задача подтвердить, что при взаимодействии растения с *F. oxysporum* при избытке экссудатов в прикорневой системе. Результатом послужило то, что *F. oxysporum* не проявляет фитопатогенных свойств в присутствии модели экссудатов. Данным экспериментом мы показали, вариант развития ситуации, когда в прикорневой зоне присутствует избыточное количество экссудатов. Следующим этапом работы было исследовать метаболизм экссудатов (модели экссудатов) растений огурца этим микроорганизмом в качестве единственного источника питания.

3.4.1 Моделирование снижения биотических стрессовых воздействий с помощью дополнительного внесения модельного раствора экссудатов

В основу разрабатываемого метода культивирования микроорганизмов в объеме гидрогеля при подводе модельной системы экссудатов была положена работа, выполненная нами ранее, когда культивирование микроорганизмов осуществлялось на минерало-ватном субстрате. Во время стрессовых воздействий, для снижения уровня фитопатогенности *F. oxysporum*, возможно введение модельного раствора экссудатов в прикорневую зону. Остается вопрос в характере распределения микроорганизмов в области экссудации растения. Предположим, что создается градиент концентраций, и развитие микроорганизма сосредотачивается на фоне этого градиента.

Задачей данного эксперимента являлось выяснение характера роста *F. oxysporum* при избытке экссудатов в прикорневой зоне.

В разрабатываемой системе минераловатный субстрат был заменен полностью инертным по отношению к микроорганизмам материалом - гидрогелем, которой был помещен в стеклянные матрасы. Концентрация (ХПК) модельного раствора экссудатов для проведения процессов выбиралась в большем количестве к той, которая образуется в прикорневой зоне огурца и составляла 500 мгО/л.

Объем модельного раствора рассчитывали на 7 дней и вносили стерильным шприцом внутрь трубки. Через стенки трубочки за счет диффузии подводились

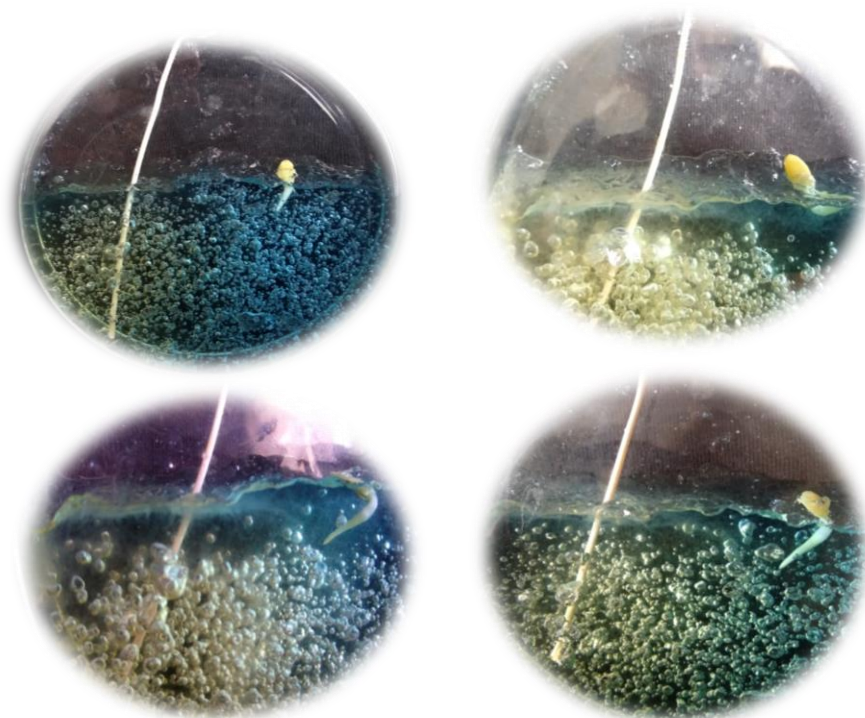


Рисунок 37. Развитие *F. oxysporum* на гидрогеле в сторону модели экссудатов на 1, 2, 3, 5 сутки.

модельный раствор экссудатов. Семена огурца стерилизовали и стерильно вносили в гидрогель на 2-3 см ниже поверхности гидрогеля. Тем самым мы моделируем условия нахождения в системе органических веществ как в виде экссудатов растения, так и в виде модели экссудатов. Гидрогель инокулировали суспензией спор *F. oxysporum* стерильным шприцом на расстоянии 1 см от ростков огурца. Для наглядности исследования в гидрогель так же внесли кислотно-основный индикатор бромимоловый синий в концентрации 0,01 %. Результаты исследования представлены на рисунке 37

Из рисунка 37, можно отметить, что мицелий гриба разрастался от центра гидрогеля в сторону трубки. Также зафиксировано изменение pH среды от щелочной к кислой визуальной сменой цвета от синего к желтому.

Таким образом, растущий микроорганизм потреблял компоненты питания по градиенту концентрации. Результатом послужило то, что *F. oxysporum* не проявляет фитопатогенных свойств в присутствии модели экссудатов. Эти данные убедительно свидетельствуют о важности корневых экссудатов в защите ризосферы от патогенных микроорганизмов.

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, которыми 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 увеличение 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 мгО/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; 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Badri D. V. et al. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Т. 288. – №. 7. – С. 4502-4512.
2. Bais H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Т. 57. – С. 233-266.
3. Badri D. V., Vivanco J. M. Regulation and function of root exudates // *Plant, Cell & Environment*. – 2009. – Т. 32. – №. 6. – С. 666-681.
4. Weston L. A., Ryan P. R., Watt M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere // *Journal of experimental botany*. – 2012. – Т. 63. – №. 9. – С. 3445-3454.
5. Loyola-Vargas V. M. et al. Effect of transporters on the secretion of phytochemicals by the roots of *Arabidopsis thaliana* // *Planta*. – 2007. – Т. 225. – №. 2. – С. 301-310.
6. Badri D. V. et al. An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota // *Plant Physiology*. – 2009. – Т. 151. – №. 4. – С. 2006-2017.
7. Broeckling C. D. et al. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity // *Applied and environmental microbiology*. – 2008. – Т. 74. – №. 3. – С. 738-744.
8. Doornbos R. F., van Loon L. C., Bakker P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2012. – Т. 32. – №. 1. – С. 227-243.
9. Mercado-Blanco J., Bakker P. A. H. M. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2007. – Т. 92. – №. 4. – С. 367-389.
10. Raaijmakers J. M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms // *Plant and soil*. – 2009. – Т. 321. – №. 1-2. – С. 341-361.

11. Newton A. C. et al. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions //Trends in microbiology. – 2010. – T. 18. – №. 8. – C. 365-373.
12. Zahran H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate //Microbiology and molecular biology reviews. – 1999. – T. 63. – №. 4. – C. 968-989.
13. Coronado C. et al. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated //Plant Physiology. – 1995. – T. 108. – №. 2. – C. 533-542.
14. Kiers E. T. et al. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis //science. – 2011. – T. 333. – №. 6044. – C. 880-882.
15. Fellbaum C. R. et al. Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – T. 109. – №. 7. – C. 2666-2671.
16. Ling N. et al. Root exudates from grafted-root watermelon showed a certain contribution in inhibiting *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 5. – C. e63383.
17. Cai T. et al. Host legume-exuded antimetabolites optimize the symbiotic rhizosphere //Molecular microbiology. – 2009. – T. 73. – №. 3. – C. 507-517.
18. Yoneyama K. et al. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants //New Phytologist. – 2008. – T. 179. – №. 2. – C. 484-494.
19. Fang W., Leger R. J. S. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii* //Plant physiology. – 2010. – T. 154. – №. 3. – C. 1549-1557.
20. Kiers E. T. et al. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis //science. – 2011. – T. 333. – №. 6044. – C. 880-882.
21. Nguema-Ona E. et al. Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions //Trends in plant science. – 2013. – T. 18. – №. 8. – C. 440-449.

22. Cannesan M. A. et al. Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination // *Plant physiology*. – 2012. – T. 159. – №. 4. – C. 1658-1670.
23. Vitré M. et al. Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria // *Plant physiology*. – 2005. – T. 138. – №. 2. – C. 998-1008.
24. Neal A. L. et al. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere // *PLoS One*. – 2012. – T. 7. – №. 4. – C. 356-364.
25. Abdel-Lateif K., Bogusz D., Hocher V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria // *Plant signaling & behavior*. – 2012. – T. 7. – №. 6. – C. 636-641.
26. Rudrappa T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria // *Plant physiology*. – 2008. – T. 148. – №. 3. – C. 1547-1556.
27. Kumar A. S. et al. Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata // *The Plant Journal*. – 2012. – T. 72. – №. 4. – C. 694-706.
28. Compant S., Clément C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2010. – T. 42. – №. 5. – C. 669-678.
29. Saharan B. S., Nehra V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review // *Life Sci Med Res*. – 2011. – T. 21. – №. 1. – C. 30.
30. de Weert S. et al. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2002. – T. 15. – №. 11. – C. 1173-1180.
31. Oku S. et al. Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization // *Microbes and environments*. – 2012. – T. 27. – №. 4. – C. 462-469.

32. Gao M. et al. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2003. – T. 16. – №. 9. – C. 827-834.
33. De-la-Peña C. et al. Root secretion of defense-related proteins is development-dependent and correlated with flowering time // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – T. 285. – №. 40. – C. 30654-30665.
34. Battisti D. S., Naylor R. L. Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat // *Science*. – 2009. – T. 323. – №. 5911. – C. 240-244.
35. Singh J. S., Pandey V. C., Singh D. P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development // *Agriculture, ecosystems & environment*. – 2011. – T. 140. – №. 3-4. – C. 339-353.
36. Wassmann R. et al. Regional vulnerability of climate change impacts on Asian rice production and scope for adaptation // *Advances in Agronomy*. – 2009. – T. 102. – C. 91-133.
37. Masciarelli O., Llanes A., Luna V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation // *Microbiological research*. – 2014. – T. 169. – №. 7-8. – C. 609-615.
38. Chodak M. et al. Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress // *Annals of microbiology*. – 2015. – T. 65. – №. 3. – C. 1627-1637.
39. Vimal S. R. et al. Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: A review // *Pedosphere*. – 2017. – T. 27. – №. 2. – C. 177-192.
40. Spence C., Bais H. Role of plant growth regulators as chemical signals in plant-microbe interactions: a double edged sword // *Current opinion in plant biology*. – 2015. – T. 27. – C. 52-58.
41. Złoch M. et al. Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to Cd²⁺ // *Chemosphere*. – 2016. – T. 156. – C. 312-325.
42. Disante K. B., Fuentes D., Cortina J. Response to drought of Zn-stressed *Quercus suber* L. seedlings // *Environmental and Experimental Botany*. – 2011. – T. 70. – №. 2-3. – C. 96-103.

43. Tiwari S. et al. *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2016. – T. 99. – C. 108-117.
44. Lata C., Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants // *Journal of experimental botany*. – 2011. – T. 62. – №. 14. – C. 4731-4748.
45. Porcel R. et al. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants // *BMC plant biology*. – 2014. – T. 14. – №. 1. – C. 36.
46. Goswami D., Thakker J. N., Dhandhukia P. C. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC // *Journal of microbiological methods*. – 2015. – T. 110. – C. 7-14.
47. Cohen A. C. et al. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels // *Physiologia plantarum*. – 2015. – T. 153. – №. 1. – C. 79-90.
48. Bal H. B. et al. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress // *Plant and soil*. – 2013. – T. 366. – №. 1-2. – C. 93-105.
49. Vardharajula S. et al. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress // *Journal of Plant Interactions*. – 2011. – T. 6. – №. 1. – C. 1-14.
50. Kang S. M. et al. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions // *Plant physiology and biochemistry*. – 2014. – T. 84. – C. 115-124.
51. Naseem H., Bano A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize // *Journal of plant interactions*. – 2014. – T. 9. – №. 1. – C. 689-701.

52. Shrivastava P., Kumar R. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation //Saudi journal of biological sciences. – 2015. – T. 22. – №. 2. – C. 123-131.
53. Kasim W. A. et al. Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley //Annals of Agricultural Sciences. – 2016. – T. 61. – №. 2. – C. 217-227.
54. Barassi C. A. et al. Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce //Scientia Horticulturae. – 2006. – T. 109. – №. 1. – C. 8-14.
55. Bacilio M., Moreno M., Bashan Y. Mitigation of negative effects of progressive soil salinity gradients by application of humic acids and inoculation with *Pseudomonas stutzeri* in a salt-tolerant and a salt-susceptible pepper //Applied Soil Ecology. – 2016. – T. 107. – C. 394-404.
56. Ruiz-Lozano J. M. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato //Plant, cell & environment. – 2016. – T. 39. – №. 2. – C. 441-452.
57. Shukla N. et al. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress //Plant Physiology and Biochemistry. – 2012. – T. 54. – C. 78-88.
58. Navarro J. M., Pérez-Tornero O., Morte A. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi depends on the rootstock salt tolerance //Journal of plant physiology. – 2014. – T. 171. – №. 1. – C. 76-85.
59. Chirakkara R. A., Cameselle C., Reddy K. R. Assessing the applicability of phytoremediation of soils with mixed organic and heavy metal contaminants //Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. – 2016. – T. 15. – №. 2. – C. 299-326.
60. Chen L. et al. Interaction of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and functional endophyte *Pseudomonas* sp. Lk9 on soil heavy metals uptake //Soil Biology and Biochemistry. – 2014. – T. 68. – C. 300-308.
61. Alam M. A. et al. Dissecting heat stress tolerance in tropical maize (*Zea mays* L.) //Field Crops Research. – 2017. – T. 204. – C. 110-119.

62. Qu A. L. et al. Molecular mechanisms of the plant heat stress response //Biochemical and biophysical research communications. – 2013. – T. 432. – №. 2. – C. 203-207.
63. Li L. L. et al. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses //Biochemical and biophysical research communications. – 2009. – T. 387. – №. 4. – C. 778-783.
64. Yadav J. et al. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*) //Ecological engineering. – 2014. – T. 62. – C. 123-128.
65. Meena R. K. et al. Isolation of low temperature surviving plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2015. – T. 4. – №. 4. – C. 806-811.
66. Javani S. et al. Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2015. – T. 483. – C. 60-69.
67. Chang C. H., Yang S. S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation //Bioresource Technology. – 2009. – T. 100. – №. 4. – C. 1648-1658.
68. Ramegowda V., Senthil-Kumar M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination //Journal of plant physiology. – 2015. – T. 176. – C. 47-54.
69. Shoebitz M. et al. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere //Soil Biology and Biochemistry. – 2009. – T. 41. – №. 9. – C. 1768-1774.
70. Miller G. A. D. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses //Plant, cell & environment. – 2010. – T. 33. – №. 4. – C. 453-467.

71. Nawrocka J., Małolepsza U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma* //Biological control. – 2013. – T. 67. – №. 2. – C. 149-156.
72. Salas-Marina M. A. et al. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways //European Journal of Plant Pathology. – 2011. – T. 131. – №. 1. – C. 15-26.
73. Heil M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens—a promising field for ecological research //Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. – 2001. – T. 4. – №. 2. – C. 65-79.
74. Jain S. et al. Bacteria-induced systemic resistance and growth promotion in *Glycine max* L. Merrill upon challenge inoculation with *Fusarium oxysporum* //Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. – 2013. – T. 83. – №. 4. – C. 561-567.
75. Sunkar R., Li Y. F., Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses //Trends in plant science. – 2012. – T. 17. – №. 4. – C. 196-203.
76. Banerjee S. et al. Stress Induced Phosphate Solubilization by 'Arthrobacter' Sp. and 'Bacillus' Sp. Isolated from Tomato Rhizosphere //Australian Journal of crop science. – 2010. – T. 4. – №. 6. – C. 378.
77. Ahemad M., Khan M. S. Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain //Saudi journal of biological sciences. – 2012. – T. 19. – №. 4. – C. 451-459.
78. Krasensky J., Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks //Journal of experimental botany. – 2012. – T. 63. – №. 4. – C. 1593-1608.
79. Cramer G. R. et al. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective //BMC plant biology. – 2011. – T. 11. – №. 1. – C. 1-14.
80. Duque A. S. et al. Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive //Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture. – 2013. – C. 49-101.

81. Van den Ende W., El-ESawe S. K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? //Environmental and Experimental Botany. – 2014. – T. 108. – C. 4-13.
82. Sami F. et al. Role of sugars under abiotic stress //Plant Physiology and Biochemistry. – 2016. – T. 109. – C. 54-61.
83. Gangola M. P. et al. Galactinol synthase enzyme activity influences raffinose family oligosaccharides (RFO) accumulation in developing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds //Phytochemistry. – 2016. – T. 125. – C. 88-98.
84. Griffiths C. A., Paul M. J., Foyer C. H. Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2016. – T. 1857. – №. 10. – C. 1715-1725.
85. Chibbar R. N. et al. Carbohydrate metabolism. – 2016.
86. Wan H. et al. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond //Trends in plant science. – 2018. – T. 23. – №. 2. – C. 163-177.
87. Nguyen Q. A. et al. Pronounced phenotypic changes in transgenic tobacco plants overexpressing sucrose synthase may reveal a novel sugar signaling pathway //Frontiers in plant science. – 2016. – T. 6. – C. 1216.
88. Lemoine R. et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors //Frontiers in plant science. – 2013. – T. 4. – C. 272.
89. Lunn J. E. et al. Trehalose metabolism in plants //The Plant Journal. – 2014. – T. 79. – №. 4. – C. 544-567.
90. Kwak J. M., Nguyen V., Schroeder J. I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses //Plant Physiology. – 2006. – T. 141. – №. 2. – C. 323-329.
91. Matros A. et al. Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis* //The Plant Journal. – 2015. – T. 82. – №. 5. – C. 822-839.
92. Van den Ende W., El-ESawe S. K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? //Environmental and Experimental Botany. – 2014. – T. 108. – C. 4-13.

93. Li L., Sheen J. Dynamic and diverse sugar signaling //Current opinion in plant biology. – 2016. – T. 33. – C. 116-125.
94. Ljung K., Nemhauser J. L., Perata P. New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks //Current Opinion in Plant Biology. – 2015. – T. 25. – C. 130-137.
95. Althani A. A. et al. Human microbiome and its association with health and diseases //Journal of cellular physiology. – 2016. – T. 231. – №. 8. – C. 1688-1694.
96. Martin B. D., Schwab E. Current usage of symbiosis and associated terminology //International Journal of Biology. – 2013. – T. 5. – №. 1. – C. 32.
97. Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms //FEMS microbiology reviews. – 2013. – T. 37. – №. 5. – C. 634-663.
98. Lareen A., Burton F., Schäfer P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes //Plant molecular biology. – 2016. – T. 90. – №. 6. – C. 575-587.
99. Vorholt J. A. Microbial life in the phyllosphere. Nat Publ Gr 10: 828–840. – 2012.
100. Compant S. et al. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization //Microbial ecology. – 2011. – T. 62. – №. 1. – C. 188-197.
101. Moore D., Robson G. D., Trinci A. P. J. 21st century guidebook to fungi. – Cambridge University Press, 2020.
102. Chagas F. O. et al. Chemical signaling involved in plant–microbe interactions //Chemical Society Reviews. – 2018. – T. 47. – №. 5. – C. 1652-1704.
103. Baltrus D. A., McCann H. C., Guttman D. S. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: challenges in bacterial molecular plant pathology //Molecular plant pathology. – 2017. – T. 18. – №. 1. – C. 152-168.
104. McNally R. R., Zhao Y., Sundin G. W. Towards understanding fire blight: virulence mechanisms and their regulation in *Erwinia amylovora* //Bacteria-Plant Interactions: Advanced Research and Future Trends. – 2015. – C. 61-82.

105. Martin-Urdiroz M. et al. Investigating the biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* //Fungal Genetics and Biology. – 2016. – T. 90. – C. 61-68.
106. Talbot, N.J., 2003. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (1), 177–202.
107. Dessaux Y., Grandclément C., Faure D. Engineering the rhizosphere //Trends in plant science. – 2016. – T. 21. – №. 3. – C. 266-278.
108. Walker V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum* //New Phytologist. – 2011. – T. 189. – №. 2. – C. 494-506.
109. McNear Jr D. H. The rhizosphere-roots, soil and everything in between //Nature Education Knowledge. – 2013. – T. 4. – №. 3. – C. 1.
110. Bais H. P. et al. Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2001. – T. 37. – №. 6. – C. 730-741.
111. Estabrook E. M., Yoder J. I. Plant-plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts //Plant Physiology. – 1998. – T. 116. – №. 1. – C. 1-7.
112. Nardi S. et al. Soil organic matter mobilization by root exudates //Chemosphere. – 2000. – T. 41. – №. 5. – C. 653-658.
113. Adl S. Rhizosphere, food security, and climate change: A critical role for plant-soil research. – 2016.
114. Hawksworth D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation //Mycological research. – 1991. – T. 95. – №. 6. – C. 641-655.
115. Smith I. M. et al. (ed.). European handbook of plant diseases. – John Wiley & Sons, 2009.
116. Joosten M. H. A. J., De Wit P. J. G. M. The Tomato–*Cladosporium Fulvum* Interaction: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions //Annual review of phytopathology. – 1999. – T. 37. – №. 1. – C. 335-367.

117. Balmer D., Planchamp C., Mauch-Mani B. On the move: induced resistance in monocots //Journal of experimental botany. – 2013. – T. 64. – №. 5. – C. 1249-1261.
118. Sharma K. K. Fungal genome sequencing: basic biology to biotechnology //Critical reviews in biotechnology. – 2016. – T. 36. – №. 4. – C. 743-759.
119. Spanu P. D. The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs //Annual review of Phytopathology. – 2012. – T. 50. – C. 91-109.
120. De Wit P. J. G. M. et al. The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry //PLoS Genet. – 2012. – T. 8. – №. 11. – C. 1083-1101.
121. Ökmen B. et al. Detoxification of α -tomatine by *Cladosporium fulvum* is required for full virulence on tomato //New Phytologist. – 2013. – T. 198. – №. 4. – C. 1203-1214.
122. Jones J. D. G., Dangl J. L. The plant immune system //nature. – 2006. – T. 444. – №. 7117. – C. 323-329.
123. Liebrand T. W. H., van den Burg H. A., Joosten M. H. A. J. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1 //Trends in plant science. – 2014. – T. 19. – №. 2. – C. 123-132.
124. Stergiopoulos I., de Wit P. J. G. M. Fungal effector proteins //Annual review of phytopathology. – 2009. – T. 47. – C. 233-263.
125. Stergiopoulos I. et al. Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 16. – C. 7610-7615.
126. Rooney H. C. E. et al. *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance //Science. – 2005. – T. 308. – №. 5729. – C. 1783-1786.
127. van Esse H. P. et al. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense //The Plant Cell. – 2008. – T. 20. – №. 7. – C. 1948-1963.

128. van den Burg H. A. et al. Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2006. – T. 19. – №. 12. – C. 1420-1430
129. Van Esse H. P. et al. The chitin-binding Cladosporium fulvum effector protein Avr4 is a virulence factor //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2007. – T. 20. – №. 9. – C. 1092-1101.
130. Borah N., Albarouki E., Schirawski J. Comparative methods for molecular determination of host-specificity factors in plant-pathogenic fungi //International journal of molecular sciences. – 2018. – T. 19. – №. 3. – C. 863.
131. Takken F., Rep M. The arms race between tomato and Fusarium oxysporum //Molecular plant pathology. – 2010. – T. 11. – №. 2. – C. 309-314.
132. Prasad P. et al. Rust pathogen effectors: perspectives in resistance breeding //Planta. – 2019. – T. 250. – №. 1. – C. 1-22.
133. Jones J. D. G., Dangl J. L. The plant immune system //nature. – 2006. – T. 444. – №. 7117. – C. 323-329.
134. Kourelis J., Van Der Hoorn R. A. L. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function //The Plant Cell. – 2018. – T. 30. – №. 2. – C. 285-299.
135. Wang Y., Wang Y. Trick or treat: microbial pathogens evolved apoplastic effectors modulating plant susceptibility to infection //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2018. – T. 31. – №. 1. – C. 6-12.
136. Rouxel T. et al. Effector diversification within compartments of the Leptosphaeria maculans genome affected by Repeat-Induced Point mutations //Nature communications. – 2011. – T. 2. – №. 1. – C. 1-10.
137. Stotz H. U. et al. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens //Trends in Plant Science. – 2014. – T. 19. – №. 8. – C. 491-500.
138. Singh R. P. et al. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control //Annual review of phytopathology. – 2016. – T. 54. – C. 303-322.

139. Chen J. Y. et al. Comparative genomics reveals cotton-specific virulence factors in flexible genomic regions in *Verticillium dahliae* and evidence of horizontal gene transfer from *Fusarium* // *New Phytologist*. – 2018. – Т. 217. – №. 2. – С. 756-770.
140. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести.
141. ГОСТ 33777-2016 Метод определения фитотоксичности на семенах высших растений
142. Роль экссудатов корневой системы огурца в формировании микробного ценоза при выращивании по малообъемной технологии / Д. Г. Титова, А. Г. Буланов, О. М. Филатова и др. // *Успехи в химии и химической технологии*. — 2014. — Т. 28, № 5. — С. 70–73.
143. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Anal. Chem.* - 1959. - V.31. - №3. - p. 426- 428
144. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor // *J. Gen. Physiol.* – 1947. - V. 30. - №1. - P.291-310
145. ГОСТ 31859-2012 Метод определения химического потребления кислорода
146. Fazeli-Nasab B., Piri R., Rahmani A. F. Assessment of the role of rhizosphere in soil and its relationship with microorganisms and element absorption // *Plant Protection: From Chemicals to Biologicals*. – 2022. – Т. 225.
147. Zhong Y. et al. Root-secreted bitter triterpene modulates the rhizosphere microbiota to improve plant fitness // *Nature Plants*. – 2022. – Т. 8. – №. 8. – С. 887-896.
148. Luo J. et al. Core microbiota in the rhizosphere of heavy metal accumulators and its contribution to plant performance // *Environmental science & technology*. – 2022. – Т. 56. – №. 18. – С. 12975-12987.
149. Tian L. et al. Foliar application of SiO₂ nanoparticles alters soil metabolite profiles and microbial community composition in the pakchoi (*Brassica chinensis* L.) rhizosphere grown in contaminated mine soil // *Environmental Science & Technology*. – 2020. – Т. 54. – №. 20. – С. 13137-13146.

150. Dietz S. et al. Root exudate composition of grass and forb species in natural grasslands //Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 10691.

151. Nizioł J., Misiorek M., Ruman T. Mass spectrometry imaging of low molecular weight metabolites in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Primoris with 109Ag nanoparticle enhanced target //Phytochemistry. – 2019. – Т. 159. – С. 11-19.

152. Vives-Peris V. et al. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond //Plant cell reports. – 2020. – Т. 39. – С. 3-17.

153. Ichino T., Yazaki K. Modes of secretion of plant lipophilic metabolites via ABCG transporter-dependent transport and vesicle-mediated trafficking //Current Opinion in Plant Biology. – 2022. – Т. 66. – С. 102184.

154. Sun L. et al. An overview of sucrose transporter (SUT) genes family in rice //Molecular Biology Reports. – 2022. – Т. 49. – №. 6. – С. 5685-5695.

155. Olanrewaju O. S. et al. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions //Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – Т. 103. – С. 1155-1166.

156. Porter C. L. Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi //American Journal of Botany. – 1924. – С. 168-188.

157. Puvača N. et al. Ascomycete fungi (*Alternaria* spp.) characterization as major feed grains pathogens //J. Agron. Technol. Eng. Manag. – 2020. – Т. 3. – С. 499-505.

158. Bak E. N. et al. Physical and chemical mechanisms that impact the detection, identification, and quantification of organic matter and the survival of microorganisms on the Martian surface—a review //International Journal of Astrobiology. – 2022. – С. 1-24.

159. Haq I. U., Khan N. A., Sarwar M. K. An Insight Into Fungal Biology //Phytopathology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions. – CRC Press, 2023. – С. 27-50.

160. Исследование взаимодействия *trichoderma viride* и *fusarium oxysporum* на ранних этапах прорастания спор / С. И. Ривера, Н. Б. Бехбудзада,

А. С. Журавлёва и др. // *Успехи в химии и химической технологии*. — 2020. — Т. 34, № 11. — С. 75–77.

161. Zin N. A., Badaluddin N. A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications // *Annals of Agricultural Sciences*. – 2020. – Т. 65. – №. 2. – С. 168-178.

162. Градова Н. Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – 1999.

163. Hoagland D. R. et al. The water-culture method for growing plants without soil // *Circular. California agricultural experiment station*. – 1950. – Т. 347. – №. 2nd edit.

164. Fuhrman J. A. Microbial community structure and its functional implications // *Nature*. – 2009. – Т. 459. – №. 7244. – С. 193-199.

165. Philippot L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – Т. 11. – №. 11. – С. 789-799.

166. Hallam S. J., McCutcheon J. P. Microbes don't play solitaire: how cooperation trumps isolation in the microbial world // *Environmental microbiology reports*. – 2015. – Т. 7. – №. 1. – С. 26-28.

167. Shi S. et al. The interconnected rhizosphere: high network complexity dominates rhizosphere assemblages // *Ecology letters*. – 2016. – Т. 19. – №. 8. – С. 926-936.

168. Zhou J. et al. Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂ // *MBio*. – 2011. – Т. 2. – №. 4. – С. e00122-11.

169. Chaparro J. M., Badri D. V., Vivanco J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development // *The ISME journal*. – 2014. – Т. 8. – №. 4. – С. 790-803.

170. Berry D., Widder S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks // *Frontiers in microbiology*. – 2014. – Т. 5. – С. 219.

171. Mishra S. et al. Harnessing plant-microbe interactions for enhanced protection against phytopathogens //Plant microbes symbiosis: applied facets. – 2015. – C. 111-125.
172. Robertson I. D. Disease control, prevention and on-farm biosecurity: the role of veterinary epidemiology //Engineering. – 2020. – T. 6. – №. 1. – C. 20-25.
173. Bisen K. et al. Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture //Nutrient use efficiency: from basics to advances. – 2015. – C. 193-206.
174. Keswani C. et al. Exploring the role of secondary metabolites of *Trichoderma* in tripartite interaction with plant and pathogens //Agro-Environmental Sustainability: Volume 1: Managing Crop Health. – 2017. – C. 63-79.
175. Keswani C. et al. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp //Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – T. 98. – C. 533-544.
176. Tabbene O. et al. Bacillomycin D and its combination with amphotericin B: promising antifungal compounds with powerful antibiofilm activity and wound-healing potency //Journal of applied microbiology. – 2016. – T. 120. – №. 2. – C. 289-300.
177. Ye W. et al. Enhancing gliotoxins production in deep-sea derived fungus *Dichotomomyces cejpii* by engineering the biosynthetic pathway //Bioresource Technology. – 2023. – C. 128905.
178. Li Z. et al. Composition and activity of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus* spp. in daqu fermentation //Food Microbiology. – 2023. – T. 111. – C. 104211.
179. Maulidia V. et al. Secondary metabolites produced by endophytic bacteria against the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne* sp.) //Biodiversitas Journal of Biological Diversity. – 2020. – T. 21. – №. 11.
180. Mukherjee P. K. et al. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases //Fungal Biology Reviews. – 2022. – T. 39. – C. 15-33.
181. Nehra S. et al. Mechanism of Antagonism: Hyperparasitism and Antibiosis //Microbial Biocontrol: Sustainable Agriculture and Phytopathogen Management: Volume 1. – Cham : Springer International Publishing, 2022. – C. 257-277.

182. Nakkeeran S., Renukadevi P., Aiyathan K. E. A. Exploring the potential of Trichoderma for the management of seed and soil-borne diseases of crops //Integrated pest management of tropical vegetable crops. – 2016. – C. 77-130.
183. Palmieri D. et al. Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases //Horticulturae. – 2022. – T. 8. – №. 7. – C. 577.
184. Heydari A. et al. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists //Journal of biological sciences. – 2010. – T. 10. – №. 4. – C. 273-290.
185. Timmis K., Ramos J. L. The soil crisis: the need to treat as a global health problem and the pivotal role of microbes in prophylaxis and therapy //Microbial Biotechnology. – 2021. – T. 14. – №. 3. – C. 769-797.
186. Boro M. et al. Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review //Archives of Microbiology. – 2022. – T. 204. – №. 11. – C. 666.
187. Gamalero E. et al. Saline and arid soils: Impact on bacteria, plants, and their interaction //Biology. – 2020. – T. 9. – №. 6. – C. 116.
188. Weng W. et al. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi as a biocontrol agent in the control of plant diseases //Microorganisms. – 2022. – T. 10. – №. 7. – C. 1266.
189. Meena M. et al. Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress //Plant Stress. – 2022. – T. 5. – C. 100103.
190. Orozco-Mosqueda M. C. et al. Agroecological Management of the Grey Mould Fungus Botrytis cinerea by Plant Growth-Promoting Bacteria //Plants. – 2023. – T. 12. – №. 3. – C. 637.
191. Sood M. et al. Trichoderma: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent //Plants. – 2020. – T. 9. – №. 6. – C. 762.
192. Lahlali R. et al. Biological control of plant pathogens: A global perspective //Microorganisms. – 2022. – T. 10. – №. 3. – C. 596.
193. Corredor-Moreno P., Saunders D. G. O. Expecting the unexpected: factors influencing the emergence of fungal and oomycete plant pathogens //New Phytologist. – 2020. – T. 225. – №. 1. – C. 118-125.

194. Jayaraman S. et al. Disease-suppressive soils—beyond food production: a critical review //Journal of Soil Science and Plant Nutrition. – 2021. – Т. 21. – С. 1437-1465.
195. Dunn L. et al. Dual ecosystem services of syrphid flies (Diptera: Syrphidae): pollinators and biological control agents //Pest management science. – 2020. – Т. 76. – №. 6. – С. 1973-1979.
196. Xu R. et al. Screening of antifungal lactic acid bacteria as bioprotective cultures in yogurt and a whey beverage //Journal of Food Protection. – 2021. – Т. 84. – №. 6. – С. 953-961.
197. Wang H. et al. Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity //Microorganisms. – 2021. – Т. 9. – №. 9. – С. 1988.
198. Douarre C. et al. Novel data augmentation strategies to boost supervised segmentation of plant disease //Computers and electronics in agriculture. – 2019. – Т. 165. – С. 104967.
199. Madriz-Ordeñana K. et al. The *Bacillus cereus* strain ec9 primes the plant immune system for superior biocontrol of *Fusarium oxysporum* //Plants. – 2022. – Т. 11. – №. 5. – С. 687.
200. Oskarsson A. et al. Assessment of source and treated water quality in seven drinking water treatment plants by in vitro bioassays—Oxidative stress and antiandrogenic effects after artificial infiltration //Science of the Total Environment. – 2021. – Т. 758. – С. 144001.
201. Martens R. Contribution of rhizodeposits to the maintenance and growth of soil microbial biomass //Soil Biology and Biochemistry. – 1990. – V. 22. – №. 2. – P. 141-147.
202. Иванов В. П. Растительные выделения и их значение в жизни фитоценозов. – Наука, 1973.
203. Смирнов А. М. Рост и метаболизм изолированных корней в стерильной культуре. – Изд-во" Наука", 1970.

204. Vančura V., Hanzlíková A. Root exudates of plants: IV. Differences in chemical composition of seed and seedlings exudates //Plant and Soil. – 1972. – V. 36. – P. 271-282.
205. Rovira A. D. Plant root exudates //The botanical review. – 1969. – V. 35. – P. 35-57.
206. Bowen G.D. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In: Contemporary microbial ecology /D.C. Ellwood, J.N. Hedger e.a. (eds.). London, – 1980. – P. 283-304
207. Lynch J. M., Whipps J. M. Substrate flow in the rhizosphere //Plant and soil. – 1990. – V. 129. – P. 1-10.