

УДК 632.937.14

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ БИОАГЕНТОВ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ ФУЗАРИОЗА КОЛОСА

М. ХАШЕМ, В. К. ШИЛЬНИКОВА, В. А. ШКАЛИКОВ,
Г. Д. СОКОЛОВА, Л. С. ЛЬВОВА

(Кафедра микробиологии и фитопатологии)

Изучали токсигенность штаммов *F. graminearum*. Определяли в фильтрате культуральной жидкости 4-дезоксиниваленол и его ацетильное производное. Показано, что наибольшей токсигенностью характеризовались штаммы, выделенные в годы эпифитотий (штамм F20 — Канадский и F24 — Краснодарский). Выявлено 3 вида микопаразитизма *T. lignorum* на грибах *F. graminearum*: слабый, сильный и очень сильный.

Установлено, что *F. sp.* в отличие от монокопидиальных изолятов наиболее антагонистичен по отношению к *F. graminearum*. Рассматривается возможность использования биологического метода борьбы как альтернативы химического с возбудителем фузариоза пшеницы.

В условиях, когда антропогенные воздействия достигают уровня, сопоставимого по масштабу с природными процессами, микроорганизмы как наиболее лабильная и реактивная часть биоты почвы скорее всего могут компенсировать и устранять эти неблагоприятные эффекты. Значение микроорганизмов особенно возрастает в связи с тем, что применение комплексных мер защиты растений против ряда заболеваний, преимущественно основанное на использовании пестицидов, получаемых посредством химического синтеза, ведет к загрязнению окружающей среды.

Биологический метод борьбы — наиболее перспективная альтер-

натива химическим приемам защиты. В частности, это относится к предупреждению и борьбе со «злаковым фузариумом» *Fusarium graminearum* Schwabe, поражающим в период цветения и налива зерна колос пшеницы. Борьба с *F. graminearum* затрудняется тем, что он способен существовать в сапротрофной и паратрофной формах и имеет особую половую стадию (*Gibberella zeae*), способен использовать в качестве источников питания разнообразные органические соединения [2]. Все эти особенности обуславливают его высокую пластичность и высокую метаболическую активность в совершенно различных условиях окружающей среды

и в конечном итоге определяют широту его распространения во всем мире.

Успешно действующий нитродуцируемый агент должен обладать способностью распространения (расселения) в популяции вредителя; способностью сохранения в среде его обитания; при условии правильной нитродукации способностью ограничения численности возбудителя до уровня, обеспечивающего отсутствие возможного вреда растению; отсутствием отрицательного эффекта в отношении других биоагентов микробиоценоза почвы; способностью обеспечивать намеченный уровень уничтожения возбудителя; характеризоваться высокой степенью вирулентности, репродукции, технологичностью и т. п.

По мнению Е. Ключковской с соавт. [3], степень распространения фузариумов в агроценозах определяется множественностью их функций. Так, будучи сапротрофами, они могут даже стимулировать рост растения, а в случае проявления их фитопатогенного эффекта растения в зоне воздействия контролируют спектр реакций на популяцию патогена.

В обычные по эпифитотийности годы патогенные, среднепатогенные и непатогенные штаммы в популяциях агробиоценозов соотносятся как 1:3:1 [3]. Однако в последние годы ситуация изменилась: резко возросла вредоносность *F. graminearum*. Причинами распространения фузариоза колоса и зерна в период созревания и уборки, очевидно, стали отсутствие специфических фунгицидов, подавляющих возбудителей фуза-

риоза, снижение доли сортов пшеницы, устойчивых к фузариозу, а также погодные условия и перенасыщение севооборотов зерновыми культурами. Вместе с тем возрастающее антропогенное воздействие на окружающую среду диктует необходимость вместо химических средств защиты растений использовать биопрепараты, работающие в природных условиях: они более избирательны, менее стойки и менее опасны для человека, вызывают минимальные нарушения структуры биоценозов и в то же время не менее активны, чем химические.

F. graminearum, вызывающий фузариоз колоса и зерна пшеницы, активно продуцирует крайне опасные для здоровья человека и животных фузариотоксины, в частности дезоксинивалензол и его ацетильное производное. Последнее может достигать 4,0 мкг/растение [7]. Его роли в патогенезе, специфике и интенсивности токсигенности штаммов, создании устойчивых сортов растений и другим вопросам посвящено большое количество работ [4—6, 8, 9]. В своих исследованиях ставили задачу изучить влияние штаммов *T. lignorum* и *Fusarium sp.* (AF-967) на штаммы *F. graminearum*.

Методика

Использовали штаммы *F. graminearum*, выделенные из зараженного зерна в годы эпифитотии (Капата F20 и Краснодарский край F24) и 11 штаммов — в обычные годы. Использовали также штаммы *T. lignorum*, выделенные из почв Удмуртии и Московской

области, и в качестве агента биологической борьбы с возбудителями фузариоза колоса и зерна пшеницы были выбран *F. sp.* (AF-967), ранее проявивший высокую эффективность в вегетационных и полевых опытах на растениях пшеницы, пораженных корневыми гнилями [1], и 5 изолятов из моноконидий этого гриба.

Проводили первичную оценку токсигенности штаммов *F. graminearum*. 4-Дезоксиниваленол (ДОН) и его ацетильное производное (АсДОН) определяли в фильтрате культуральной жидкости после 7 суток культивирования на роторной качалке при 220 об/мин и 26° С, на среде следующего состава (г/л): сахароза — 40, глицерин — 10, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 1, KH_2PO_4 — 3, MgSO_4 — 2, NaCl — 5.

Культуральную жидкость отфильтровывали от конидий и мицелия. Микотоксины (ДОН и АсДОН) извлекали 10-кратным количеством смеси ацетонитрил : вода = 5 : 1 при обработке в ультразвуковом дезинтеграторе в течение 10 мин. Извлечение повторяли дважды. Экстракты упаривали досуха, остаток реэкстрагировали смесью ацетонитрил : вода = 5 : 1. Реэкстракт (10 мл) пропускали через колонку, заполненную 0,3 г активированного угля, 0,3 г цеолита и 2 г нейтральной окиси алюминия. Колонку промывали 10 мл указанной смеси. Элюат фильтровали, упаривали в вакууме, остаток растворяли в метаноле и хроматографировали на пластинках сидофола в системе этилацетат : гексан : метанол (6 : 4 : 1) в

сравнении со стандартом. Пятна стандартов обнаруживали в ультрафиолетовом облучении (366 нм) после опрыскивания пластинки 10% спиртовым раствором хлористого алюминия и нагревания в течение 10 мин при 92° С. Зоны, по хроматографической подвижности соответствующие ДОН или АсДОН, элюировали метанолом, упаривали досуха и с целью количественного определения анализировали на газовом хроматографе дериватизированные N-гептафторбутилимидазолом производные.

Результаты и их обсуждение

Первичная оценка штаммов *F. graminearum* и их изолятов (табл. 1) показала, что самыми сильными продуцентами (по суммарной концентрации) ДОН и АсДОН являются штаммы F20 из Канады и F24 из Краснодарского края. Они продуцировали значительно больше микотоксинов, чем другие штаммы, выделенные не в эпифитотийные годы. Все штаммы подразделены на 3 группы по токсигенности (мг/г):

1) самые сильные: F20 (70,7); F24 (45);

2) средней токсигенности: F25 (26); F19 (21,4); F1 (26,8); F23 (19,8); F3 (14,1);

3) слабой токсигенности: F21 (3,4); F2 (0,8); F22 (0,3); F5 (0,3); F26 (0,3); F4 (0,2).

Следует заметить, что АсДОН накапливалось значительно больше, чем ДОН. При изучении взаимодействия *T. lignorum* и *F. graminearum* методом встречных культур в чашках Петри (табл. 2)

Токсигенность изолятов *F. graminearum*

Штамм	Биомасса гриба, г/л	Концентрация, мг/л			Сумма токсинов, мг/г гриба
		ДОН	АсДОН	сумма ДОН+АсДОН	
F20	6,8	41,8	438,7	480,5	70,7
F24	9,7	38,8	398,1	436,9	45,0
F25	12,8	9,8	323,1	332,9	26,0
F19	13,1	32,3	247,7	280,0	21,4
F1	8,2	13,5	206,4	219,9	26,8
F23	10,0	7,5	190,7	198,2	19,8
F3	7,3	5,9	96,9	102,8	14,1
F21	8,9	0,0	30,7	30,7	3,4
F2	11,8	0,3	9,6	9,9	0,8
F22	10,4	0,4	3,2	3,6	0,3
F4	11,1	0,0	2,6	2,6	0,2
F5	6,8	0,0	2,3	2,3	0,3
F26	6,9	0,0	2,1	2,1	0,3

Таблица 2

Микопаразитизм штаммов *Trichoderma lignorum* в отношении к штаммам *Fusarium graminearum* на 10-е сутки

Штамм	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
F1	0	++	++	+	+	+	+	+
F2	++	++	+	+	+	+	+	+
F3	++	+++	+	0	++	+	+++	++
F4	++	++	+++	+	0	0	+++	+++
F5	+	+	++	++	+	+	++	++
F19	+	+	+	+	+	0	+	+
F20	++	++	+++	++	++	+	++	+++
F21	+	+++	+	0	+	0	+	++
F22	+	+++	++	++	++	++	++	+
F23	0	+	+	++	+	+	+	+
F24	++	+	++	+	+	+	+	+
F25	+	+++	+	+	+	+	++	+
F26	++	+++	++	+	0	+	+	++

Примечание: три + — сильный микопаразитизм (штамм триходермы полностью покрывает штаммы фузариума); два + — штаммы фузариума покрыты наполовину; один + — незначительный микопаразитизм; 0 — микопаразитизма нет — колонии грибов смыкаются при встрече.

наиболее сильным микопаразитическим эффектом характеризовался штамм триходермы Т8. В 5 случаях мицелий фузариумов (штаммы F3, F21, F22, F25, F26) полностью был покрыт мицелием триходермы, в 4 случаях — наполовину (F1, F2, F4, F20) и в остальных случаях эффект паразитизма у этого штамма был незначительным, но все же проявлялся.

Менее сильным микопаразитическим эффектом обладали штаммы триходермы Т13, Т14 и Т9, еще меньше — все остальные. Наиболее сильно был угнетен триходермой штамм средней токсиногенности F3 (полностью на нем паразитировали штаммы Т8 и Т13 и наполовину — Т7, Т11, Т12 и Т14).

Сильный продуцент микотоксинов F20 оказался менее стойким к триходерме, чем F24 (штамм из Краснодарского края). Поскольку штаммы фузариумов разной степени токсиногенности (F20, F22, F5, F2, F25, F24 и F6) испытывали достаточно сильное угнетение со стороны различных штаммов триходермы, можно предположить, что штаммовые особенности как биоагента, так и биомишени играют важную роль во взаимодействии, и их необходимо учитывать при создании биопрепарата. Может быть, следует принять путь создания мультибиопрепарата на основе ассоциации живых культур биоагента, поскольку это обеспечит ему более широкие адаптационные возможности в природных условиях, чем монокультура.

Связи между степенью токсиногенности *F. graminearum* и степенью активности штаммов триходермы не выявлено.

Что касается антагонистического влияния разных изолятов *F. sp.* на штаммы *F. graminearum* на 7-е сутки (табл. 3), можно сделать заключение, что наибольшей активностью характеризовался исходный штамм *F. sp.* в отношении практически всех штаммов *F. graminearum* — размер зоны подавления варьировал в пределах 2,7—4,7 мм. Изоляты *F. sp. c*, *F. sp. d* и *F. sp. e* были индифферентны по отношению к ряду *F. graminearum* (F. gr. 3, 4, 20, 1, 2, 5, 23), к другим штаммам их активность варьировала в пределах 1,0 — 2,0. *F. sp. a* и *F. sp. b* занимали среднее положение. Как и в случае с триходермой, корреляции между степенью токсиногенности *F. graminearum* и антагонистической активностью *F. sp.* не выявлено. Здесь также доминирующую роль играли штаммовые особенности микопартнеров.

Мы снова подчеркиваем, что интродуцируемые популяции антагониста, в первую очередь, должны быть гетерогенными, поскольку они практически запоев устанавливают трофические связи в уже сложившейся экосистеме и должны обладать высокой конкурентной и адаптивной способностью, чтобы занять соответствующую экологическую нишу. Именно этим можно объяснить те неудачи, которые бывают при использовании биопрепарата — монокультуры на практике. Внешение нескольких штаммов анта-

Антагонистическая активность штаммов гриба *Fusarium sp.* (AF-967) в отношении к штаммам *Fusarium graminearum* (средний размер зоны подавления на 7-е сутки, мм)

Штамм	F. sp.	F. sp. a	F. sp. b	F. sp. c	F. sp. d	F. sp. e
F1	3.3	2.0	2.0	2.3	0.0	1.3
F2	3.7	2.7	3.3	1.7	0.0	1.7
F3	3.3	1.3	1.3	0.0	1.0	1.7
F4	2.7	1.0	0.0	0.0	1.3	1.0
F5	3.7	2.0	2.0	1.7	0.0	1.3
F19	3.3	1.0	1.7	2.6	1.7	2.0
F20	2.7	1.3	3.0	0.0	1.7	0.0
F21	4.7	1.7	2.3	1.7	2.0	1.7
F22	2.7	1.7	1.7	1.3	1.7	2.0
F23	3.7	2.0	2.3	2.3	0.0	1.7
F24	3.3	1.3	1.0	2.0	1.0	1.0
F25	2.7	2.3	1.7	1.7	2.0	2.0
F26	4.3	2.7	1.7	2.7	1.3	1.0

гонистов в сложную динамическую систему биогеоценоза даст возможность учесть не только конкретные условия на данный момент, но и дальнейшие сукцессии микроорганизмов, вызываемые биотическими и абиотическими факторами, и предупредить возможность элиминирования внесенной популяции антагониста.

Выводы

1. Изучены биотические связи 13 патогенных штаммов *F. graminearum*, 8 *T. lignorum* и 6 *F. sp.* AF-967.

2. Установлено, что штаммы *F. graminearum* различны по степени токсигенности. Наибольшее количество ДОН и АсДОН синтезировали штаммы, выделенные из зерна, выращенного в Канаде и Краснодарском крае в годы эпифитотии.

3. Корреляции между степенью токсигенности и антагонистической активностью *T. lignorum* и *F. sp.* AF-967 не установлено.

4. Выявлено 3 вида микропаразитизма *T. lignorum* на грибах *F. graminearum*: слабый, сильный и очень сильный.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аль-Афанди М. Микроорганизмы ризосферы и фитосанитарное состояние посевов яровой пшеницы при использовании перспективных протравителей и новых биологически активных веществ. Автореф. канд. дис., М., 1995. — 2. Билай В. И. Фузарии. Киев: Наук. думка, 1977. — 3. Клечковская Е., Адамовская В., Дубинина Л. и др. Стабильность агроценоза на основе сбалансированности сорта пшеницы и его микрофлоры. — Растлиництво,

- 1996, № 1, с. 2—5. — 4. Львова Л. С., Омельченко М. Д., Орлова Н. Ю. и др. Санитарно-гигиеническое состояние фузариозного зерна пшеницы: его хранение, переработка. — Вест. сельск. хоз-ва, 1990, № 10, с. 68—73. — 5. Львова Л. С., Кизлинко О. П., Шульгина А. П. и др. Особенности образования дезоксиниваленола и зеараленона в зерне пшеницы, пораженной фузариозом колоса. — Микология и фитопатология, 1997, т. 31, с. 52—58. — 6. Монастырский О. А., Евтушенко Л. А., Кузнецова Е. В. и др. Токсикообразование видов и штаммов фузариев, поражающих колос пшеницы. — Агрехимия, 1997, № 1, с. 73—75. — 7. Сидоров И. А., Есауленко Е. А., Соколов М. С. Загрязнение фузариотоксинами различных по толерантности к *Fusarium graminearum* Schwabe сортов озимой пшеницы и пути его снижения. — Агрехимия, 1996, № 12, с. 74—78. — 8. Терехов В. П., Бессмельцев В. П., Антилогова Л. К. и др. Прогноз вредности фузариоза зерна озимой пшеницы. — Защита растений, 1998, № 1, с. 11—12. — 9. Чкашников Д. П., Соколова Г. Д., Девяткина Г. А. и др. Роль дезоксиниваленола на ранней стадии развития *Fusarium graminearum* Schwabe. — Микология и фитопатология, 1997, т. 31, с. 78—83.

Статья поступила
15 июня 1999 г.

SAMMARY

Toxicogenic activity of *Fusarium graminearum* species was investigated. 4-desoxy-nivalenol and its acetylic analog were defined in liquid culture filtrate. The species isolated in epiphytotic years (20-Canadian and 24-Krasnodarian) appeared to be most active.

Three types of *Trichoderma lignorum* mycoparasitism have been found on *F. graminearum*: weak, strong and very strong ones.

It has been ascertained that *F. sp.* is the most antagonistic to *F. graminearum* as compared with monconidial isolates. The possibility to use biological protection method with pathogens causing fusarium diseases in wheat as alternative to chemical method is discussed.