

УДК 632.4:632.937.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРИБА *CONIOTHYRIUM MINITANS* В БИОЛОГИЧЕСКОМ МЕТОДЕ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

К. В. ПОПКОВА, Т. Ю. ФЕДУЛОВА

(Кафедра фитопатологии)

В интегрированной защите растений все большее значение приобретает биологический метод. Особую роль играет этот метод в защите растений от патогенов, которые длительное время могут сохраняться в почве. Среди таких патогенов следует отметить возбудителей корневых гнилей овощных культур — *S. sclerotiorum*, грибы рода *Fusarium*, *Rhizoctonia* и др. Необходимо подчеркнуть, что при интенсификации овощеводства их накопление в почве ускоряется. Существующие меры борьбы с этой группой патогенов — агротехнические, химические, термические (в условиях теплицы) — не всегда применимы по ряду причин и, как правило, не обеспечивают высокого эффекта в условиях интенсивного овощеводства. Существенное место в комплексе защитных мероприятий, применяемых в борьбе с патогенами, должно отводиться приемам, обеспечивающим долговременное подавление инфекции возбудителей, в частности, биологическому методу защиты растений [19]. В последние годы появились сообщения об использовании грибов — гиперпаразитов и антагонистов — против возбудителя белой гнили ряда культур.

В настоящее время известно более 30 видов микроорганизмов, поражающих гриб *Sclerotinia sclerotiorum*, возбудителя белой гнили [14, 15]. Из них наиболее активными себя зарекомендовали *Coniothyrium minitans* [3, 4—13, 16, 17], *Gliocladium catenulatum* [10, 12, 15], *Gliocladium roseum* [10, 15], *Trichoderma viridae* [16, 19], *Sporidesmium sclerotivorum* [2], *Microsphaeropsis centaureae* [20], *Teratosperma oligocladium* [18]. Грибы-гиперпаразиты, паразитируя на склероциях, вызывают их массовую гибель, что ведет к уменьшению инфекционного начала патогена в почве, а следовательно, к снижению заражения растений склеротиниозом.

Наиболее перспективным в этом плане можно считать гриб *Coniothyrium minitans* [4—13], относящийся к классу *Deuteromycetes* порядка *Plenidiales*, семейства *Sphaeropsidaceae*, роду *Coniothyrium*.

S. minitans был обнаружен в 1946 г. Кэмпбелом [4] на склероциях *Sclerotinia minor* (jagger), возбудителя склеротиниоза гваюлы и брюссельской капусты. В 1975 г. в Канаде Хуанг и Хоес [5] обнаружили *S. minitans* на склероциях *Sclerotinia sclerotiorum*, собранных с пораженных растений подсолнечника. Этими авторами было проведено испытание грибов-гиперпаразитов *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium catenulatum* и *Trichoderma viridae* против склероциозного вилта подсолнечника. Наиболее эффективным оказался *S. minitans*, что объясняется его более узкой специализацией по отношению к патогену. В условиях теплицы количество склероциев в сравнении с исходным снизилось до 3 %, а при использовании смеси *G. catenulatum* и *T. viridae* — до 67 % [13]. В полевых опытах Хуанга в 1978 г. на естественно зараженных делянках при использовании *S. minitans* зараженность растений снизилась в 4 раза [13].

В литературе имеются данные о практическом применении *S. minitans*. В Австралии Ватсон и Милтморе [20] проводили послеуборочное опрыскивание посевов подсолнечника *S. minitans*. Ахмед и Трибе [3] использовали пикнидальный dust, приготовленный на основе гриба

C. minitans, против белой гнили лука и установили, что этот гриб поражает *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *S. trifoliorum*, некоторые штаммы *Sclerotium cepivorum*, *Botrytis fabae*, *B. cinerea*. Биологический метод, как указывают исследователи [12], может явиться дополнительным приемом в общей системе мероприятий, направленных на борьбу с белой гнилью. Очевидно, у гриба *C. minitans* может проявляться антагонизм и по отношению к возбудителю корневой гнили огурца и гнили моркови в хранилище — *S. sclerotiorum*.

Настоящая работа была посвящена изучению возможностей биологической борьбы с корневой гнилью огурца. В задачу наших исследований входило: 1) изучение морфолого-культуральных особенностей гриба с целью разработки метода культивирования в условиях лаборатории; 2) изучение особенностей гиперпаразитизма в пределах вида, влияния условий культивирования на стабильность признака гиперпаразитизма; 3) выделение и отбор штаммов, наиболее перспективных в качестве агентов биометода.

Методы исследований

Исследования проводили в 1981—1982 гг. на кафедре фитопатологии Тимирязевской академии.

Материалом служили склероции *C. minitans*, полученные с пораженных корнеплодов моркови из овощехранилищ Москвы и Молдавии и с растений огурца из теплиц Московской области.

Для обнаружения гиперпаразита *C. minitans* на склероциях использовалась методика Хуанга [11], по которой всю массу склероциев тщательно анализировали, каждый склероций просматривали под бинокляром, надрезали скальпелем и отбирали склероции с побуревшими внутренними тканями и с точками пикнид на поверхности. Отобранные таким образом склероции тщательно промывали под струей водопроводной воды, затем выдерживали в течение одной минуты в 96 % спирте, промывали стерильной дистиллированной водой, затем их высевали в стерильные чашки Петри на картофельно-глюкозный агар (КГА).

При изучении морфолого-культуральных особенностей гриба *C. minitans* его выращивали на КГА по общепринятой методике.

Получали моноспоровые изоляты гриба по методике Примак и Водяне [1]. Стерильные колбы с дистиллированной водой объемом 100 мл инокулировали небольшим количеством пикнид (2—3 шт.) и ставили на качалку на 1 ч. За это время выходили практически все пикно-споры. Затем в стерильном боксе брали пипеткой несколько капель жидкости из колб и переносили в пробирки с теплым агаром (картофельным), перемешивали несколько секунд и разливали в пустые чашки Петри. На одну колбу необходимо 5 пробирок и 5 чашек Петри. Через 2—3 дня после появления проросших спор чашки просматривали под микроскопом и проросшие споры с кусочком агара переносили с помощью шпателя в чашки Петри с КГА. Через две недели проводилась группировка штам-

мов по Хуангу [6].

Для разделения моноспоровых изолятов по морфологическим признакам их выращивали на свету и в темноте. Для этого изоляты высевали в чашки Петри (по 3 на каждый вариант).

Оценку гиперпаразитной активности гриба *C. minitans* проводили двумя методами: методом блоков или двойных культур и подсевом склероциев [6]. В последнем случае из 14-дневных культур *S. sclerotiorum* брали по 10 склероциев и подсевали их в чашки Петри с 14-дневной колонией *C. minitans*. Проводился и подсев склероциев естественного происхождения, предварительно простерилизованных спиртом и стерильной дистиллированной водой.

При использовании метода двойных культур на КГА в чашках Петри на расстоянии 5 см друг от друга помещали агаровые блоки диаметром 9 мм, вырезанные из 14-дневных культур *C. minitans* и 6-дневных *S. sclerotiorum*. Учеты при использовании обоих методов проводили на 28-й день. Все склероции, образованные в двойной культуре и подсеянные к колонии *C. minitans*, в дальнейшем высевали на КГА и через 7 дней учитывали их пораженность. Повторность опытов 3-кратная.

В двойной культуре определяли интенсивность образования склероциев, а также процент склероциев, пораженных *C. minitans*. О гиперпаразитной активности гриба (ГА) судили по значению интегрального показателя, характеризующего общее снижение количества здоровых склероциев за счет уменьшения по сравнению с контролем (в %) их численности и жизнеспособности. Расчет активности гиперпаразитизма проводился по формуле

$$ГА = 100\% - \frac{S_{обр} \cdot (100\% - S_{пор})}{100\%},$$

где $S_{обр}$ — образовавшиеся в двойной культуре склероции, % к контролю; $S_{пор}$ — пораженные склероции, %.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате анализа 2186 склероциев было выделено 5 изолятов гриба *C. minitans*. Все они получены из склероциев *S. sclerotiorum*, со-

бранных с корнеплодов моркови в Молдавии. Из склероциев с моркови и огурцов других образцов (хранилище и теплицы Московской области) гриб *S. minitans* не был получен. Очевидно, гиперпаразит *S. minitans* экологически приурочен к условиям юга. Из всех проанализиро-

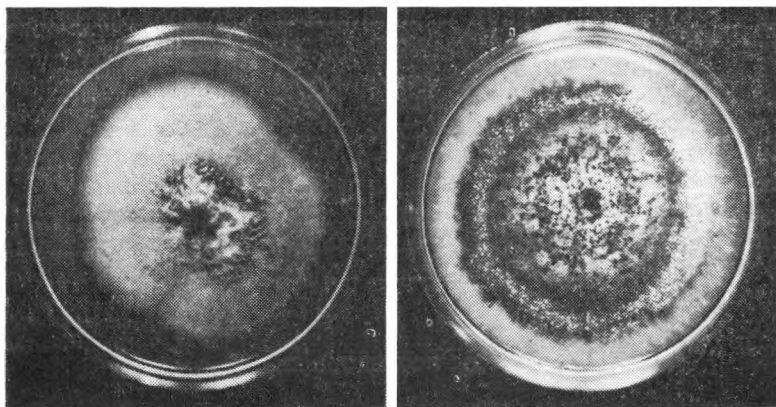


Рис. 1. 14-дневная культура гриба *Coniothyrium minitans*, выращенная в темноте (слева) и на свету (изолят № 70).

ванных склероциев 143, или 6,55 %, было пораженных, в том числе 5, или 0,22 %, — грибом *S. minitans*. Последнее свидетельствует о том, что этот гриб достаточно распространен в условиях Молдавии.

Полученные три поколения моноспоровых изолятов *S. minitans* (по 100 в каждом) резко различались по культурально-морфологическим особенностям, скорости роста, интенсивности спороношения.

Характер морфологических признаков был неодинаковым у изолятов, выращенных при разной освещенности (рис. 1). Так, в темноте было установлено наличие внутри вида 9 основных групп, четко отличающихся друг от друга по типу окраски колонии, на свету — 5 групп (табл. 1).

В первом случае преобладают серый и серо-оливковый типы окраски колонии, в последнем — темно-оливковый и темно-коричневый. Следовательно, при культивировании гриба в темноте типы окраски колоний были более разнообразны, причем преобладало более светлое окрашивание. На свету разнообразие типов окраски уменьшалось и проявлялась тенденция к потемнению колоний и только в отдельных случаях сохранялся светло-оливковый цвет.

В потомстве при пересевах в основном общая тенденция в окраске колоний сохранялась при некоторых вариациях по интенсивности. Однако появлялись отдельные колонии и с иным типом окраски. Поэтому есть все основания считать, что преобладающим типом окраски является исходный.

Изучение скорости роста колоний показало (табл. 2), что у большей части изученных моноспоровых изолятов *S. minitans* скорость роста на свету несколько выше, чем в темноте: диаметр колонии варьировал соответственно в пределах 75—90, 56—87 мм. В то же время от-

Таблица 1

Распределение типов колоний *Coniothyrium minitans* при выращивании в темноте и на свету (14-дневная культура)

Тип окраски колонии	В темноте		На свету	
	шт.	%	шт.	%
Светло-оливковый	6	6,06	1	4,34
Серо-оливковый	33	33,3	—	—
Оливковый	13	13,11	3	13,07
Темно-оливковый	3	6,06	7	30,43
Серо-коричневый	6	6,06	—	—
Коричневый	10	10,10	—	—
Темно-коричневый	—	—	7	30,43
Серый	26	26,26	—	—
Оливково-коричневый	1	1,01	5	21,73
Серый лучистый	2	2,02	—	—

Сравнительная характеристика окраски и скорости роста колоний *Coniothyrium minitans* на свету и в темноте

№ изолята	Окраска колонии		Диаметр колонии		Скорость роста на свету в % к скорости роста в темноте
	на свету	в темноте	на свету	в темноте	
85	Оливково-коричневая	Темно-оливковая	90	85	6
49	Темно-оливковая	Светло-коричневая	90	76	18
39	Темно-оливковая	Серо-оливковая	85	68	25
22	Оливково-коричневая	Серая	89	87	0,1
12	Темно-коричневая	Коричневая	89	72	23
86	Оливковая	Серая	89	84	5
48	Оливково-коричневая	Оливковая	89	82	8
51	Темно-коричневая	Коричневая	75	60	25
76	Оливковая	Серо-оливковая	89	81	10
35	Оливково-коричневая	Серая	75	56	34
Среднее			87,2	75,2	16

Таблица 3

Поражение склероциев *S. sclerotiorum* природными изолятами *C. minitans*

Вариант	Суммарное количество образовавшихся склероциев	Пораженных <i>C. minitans</i>		Жизнеспособных		ГА, %
		шт.	Спор, %	шт.	%	
Контроль <i>S. sclerotiorum</i>	36	—	—	36	100	—
Двойная культура + <i>S. sclerotiorum</i> + изолят I <i>C. minitans</i>	20	17	85	3	15	92
Двойная культура + <i>S. sclerotiorum</i> + изолят II <i>C. minitans</i>	16	9	60	7	40	83

дельные изоляты (№ 85, 22, 86, 76) практически не различались по скорости роста в указанных условиях. Это свидетельствует о возможности отбора быстрорастущих изолятов, не требующих дополнительного освещения, что важно в технологических целях.

Проведенный анализ позволяет определить некоторые критерии отбора моноспоровых изолятов, обладающих большой скоростью роста,

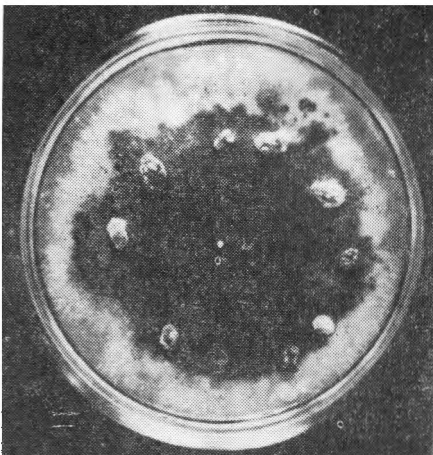
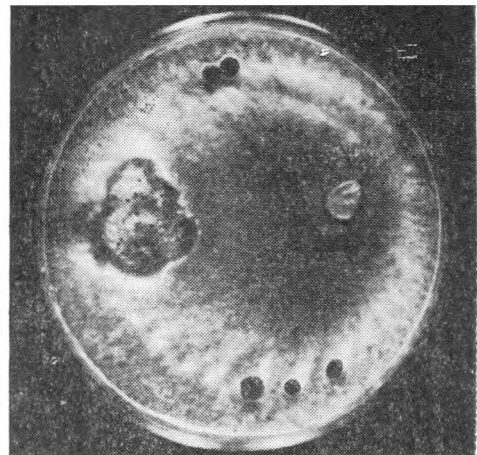
Рис. 2. Метод подсева склероциев к 14-дневной культуре *Coniothyrium minitans*Рис. 3. Метод двойных культур. Слева колония *Coniothyrium minitans*

Таблица 4

Патогенность *C. minitans* на склероциях *S. sclerotiorum* (метод подсева)

№ изолята <i>C. minitans</i>	Количество склероциев в опыте	% склероциев, давших после пересева рост грибов	
		<i>C. minitans</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
70	30	100	—
35	30	100	—
58	30	100	—
59	30	100	—
6	30	100	—
39	28	100	—
76	30	100	—
35	30	94	6
2	25	100	—

для оценки их гиперпаразитной активности по отношению к *Sclerotinia sclerotiorum*.

Нами проведено изучение гиперпаразитической активности (ГА) двух изолятов *C. minitans*, выделенных из пораженных склероциев *S. sclerotiorum* (табл. 3).

Численность склероциев в двойной культуре уменьшилась в два и более раз, 60—80 % из них колонизировалось грибом *C. minitans*. ГА изолятов I и II оказалась достаточно высокой — соответственно 92 и 83 %.

С целью получения изолятов *C. minitans*, характеризующихся и высокой скоростью роста и высокой

гиперпаразитной активностью, из двух исходных изолятов, обладающих первым признаком, получены моноспоровые изоляты для оценки их гиперпаразитных свойств двумя методами — подсева склероциев и двойных культур (рис. 2 и 3).

При подсеве *C. minitans* к колонии *S. sclerotiorum* отмечалась почти 100 % пораженность склеротинией (табл. 4).

Таблица 5

Гиперпаразитная активность моноизолятов *C. minitans* по отношению к *Sclerotinia sclerotiorum*

№ изолята <i>C. minitans</i>	Среднее количество образовавшихся склероциев на 1 повторность*	$S_{обр}$	$S_{пор}$	Средний диаметр зоны роста, мм	ГА, %
		% к контролю			
82	7	54	92	17	96
2	10	77	95	18	96
86	7	54	100	14	100
85	8	62	95	12	97
48	6	46	100	17	100
11	7	54	79	18	89
22	7	54	95	18	97
79	8	62	100	19	100
59	8	62	100	21	100
70	9	69	92	23	95
76	4	31	100	19	100
35	13	100	94	17	94
6	6	46	94	21	97
32	8	62	95	26	96
58	10	77	30	20	48

* В чистой культуре *S. sclerotiorum* образовалось 13 склероциев.

При методе подсева активность гриба-гиперпаразита оказалась очень высокой, что не позволяло дифференцировать различные изоляты по данному признаку. Поэтому был использован метод двойных культур, для чего из общего числа моноспоровых изолятов произвольно отобрали 15 и определили их гиперпаразитическую активность (табл. 5).

Проверка моноизолятов методом двойных культур выявила существенные различия по ГА, которая варьировала от 48 до 100 % у пяти моноизолятов, но в целом уровень ее достаточно высок.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования гриба *C. minitans* при защите сельскохозяйственных культур от *S. sclerotiorum*. Основными показателями для отбора штаммов являются скорость роста на питательных средах и гиперпаразитная активность.

Выводы

1. Гриб *S. minitans* при культивировании на питательных средах образует морфолого-культуральные типы, различающиеся по типу окраски и характеру роста. Наибольшее разнообразие типов наблюдается при культивировании гриба в темноте. Скорость роста гриба на свету выше, чем в темноте.

2. Внутри вида выявлены штаммы, различающиеся по гиперпаразитной активности.

3. Не установлено корреляции между особенностями морфологических признаков и гиперпаразитной активностью.

4. Для выделения штаммов с высокой гиперпаразитной активностью необходимо использовать метод двойных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Примак Т. О., Воляне П. О. *Защит рослин*, 1970, вып. 12, с. 63—67. — 2. Adams P. B., Ayers W. A. — *Phytopathol.*, 1981, vol. 71, p. 90—93. — 3. Ahmed A. H. M., Tribe H. T. — *Plant Pathol.*, 1977, vol. 26, p. 75—78. — 4. Campbell W. A. — *Mycologia*, 1947, vol. 39, p. 190—195. — 5. Huang H. C., Hoes J. A. — *Phytopathol.*, 1975, vol. 65, p. 1431—1437. — 6. Huang H. C. — *Sunflower Forum*, 1976, vol. 8, p. 20—25. — 7. Huang H. C., Hoes J. A. — *Can. J. of Bot.*, 1976, vol. 54, p. 406—410. — 8. Huang H. C. — *Can. J. of Bot.*, 1977, vol. 55, p. 289—295. — 9. Huang H. C. — *Can. J. of Bot.*, 1978, vol. 56, p. 2243—2246. — 10. Huang H. C., — *Sunflower*, 1979, N 5, p. 14. 16. 11. Huang H. C. — *Can. Agric.*, 1979, vol. 24, p. 12—14. — 12. Huang H. C., Hoes J. A. — *Plant Distase*, 1980, vol. 64, p. 81—84. — 13. Huang H. C. — *Can. J. of Plant Pathol.*, 1980, vol. 3, p. 26—32. — 14. Karhuvaara L. *Acta Agric. Scand.*, 1960, vol. 10, p. 127—134. — 15. Makkonen R., Pohjakallio O. — *Acta Agric. Scand.*, 10, p. 105—126. — 16. Smidt H. H. — *Arch. Pflanzenen Schutz.*, 1970, vol. 6, p. 321—334. — 17. Turner G. J., Tribe H. T. — *Plant Pathol.*, 1975, vol. 24, p. 421—427. — 18. Uecker F. A. — *Mycotoxon*, 1980, vol. X, N 2, p. 421—427. — 19. Wells H. D., Bell D. K., Jaworski G. A. — *Phytopathol.*, 1971, vol. 62, p. 442—447. — 20. Watson A. K., Miltimore J. R. *Can. J. of Bot.*, 1975, vol. 53, p. 2458—2461.

Статья поступила 20 января 1983 г.