

**М. А. Стадниченко**, старший преподаватель  
Белорусский государственный университет, г. Минск

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОТРИТИОЗА С МИКРООРГАНИЗМАМИ В УСЛОВИЯХ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ**

### **РЕЗЮМЕ**

*Изучено взаимодействие изолятов возбудителя ботритиоза с микроорганизмами in vitro. Показано антагонистическое действие бактерий рода *Bacillus* и грибов родов *Trichoderma* и *Chaetomium* по отношению к фитопатогену. Полученные данные говорят о перспективности продолжения научных исследований в данной области для создания эффективных биологических средств защиты от ботритиоза культурных растений.*

*Ключевые слова:* ботритиоз; изолят; возбудитель; серая гниль; биологическая защита; штамм; микофильные грибы; ризосферные бактерии; антагонист.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В последние годы большое внимание исследователями уделяется группе грибов, которые способны развиваться сапротрофно на растительных остатках, но при определенных условиях вызывать болезни растений и даже быть причиной развития эпифитотий у многих сельскохозяйственных и цветочных культур. К такой группе грибов относится возбудитель ботритиоза митоспорный гриб *Botrytis cinerea* Pers. Частота встречаемости болезни варьирует по годам, что связано с восприимчивостью отдельных хозяев, условий вегетационного периода или микроклимата в конкретном месте произрастания растений [13]. Необходимым условием развития болезни является высокая влажность, поэтому ареал его распространения, как правило, в зоне с умеренным климатом. Также патоген активно развивается в закрытых сооружениях с повышенной влажностью воздуха и плохой аэрацией [4]. По уровню биологической организации *B. cinerea* – это типичный мицелиальный гриб, характеризующийся обильным конидиальным спороношением и почти полным отсутствием полового процесса. Неблагоприятные условия стимулируют формирование покоящихся структур – склероциев [10, 13].

Детальное изучение биологических и экологических особенностей патогена позволит не только ограничивать развитие заболевания, но также разрабатывать эффективные приемы профилактики и защиты растений. В борьбе с серой гнилью важно не допускать загущенности растений и заноса инфекции в места хранения, поддерживать оптимальные температуру и влажность, использовать фунгистатические препараты направленного действия. На начальных этапах лечение болезни происходит успешно, но нужно учитывать специфику патогена для дальнейшего снижения распространения

возбудителя. Благодаря своей высокой адаптивной способности и пластичности гриб успешно культивируется в искусственных условиях, что позволяет проводить поиск потенциальных агентов биологической защиты от действия *B. cinerea* [12]. Одним из преимуществ биологических методов защиты в сравнении с химическими методами является не полное истребление патогена, а включение естественных регуляторных механизмов, которые ограничивают развитие возбудителя и тем самым снижают их вредоносность [9].

Одним из приоритетных направлений для снижения вредоносности возбудителя ботритиоза выступает поиск антагонистов гриба *B. cinerea* среди микофильных грибов и ризосферных бактерий. В связи с этим задачей наших исследований было изучить характер взаимодействия грибов *Trichothecium roseum* (Pers.) Link, *Trichoderma koningii* Oudem., *T. viride* 408, *T. viride* 457, *Chaetomium* Kunze, бактерий рода *Pseudomonas* и *Bacillus* по отношению к возбудителю ботритиоза *in vitro*, как потенциальных агентов биологической защиты растений для борьбы с фитопатогеном.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для исследований служили изоляты возбудителя серой гнили *B. cinerea*, выделенные из различных питающих растений (*Pelargonium zonale* L., *Petroselinum crispum* (Mill) A. W. Hill, *Vitis vinifera* L., *Rubus idaeus* L., *Solanum lycopersicum* L., *Capsicum annuum* Group, *Solanum melongena* L., *Daucus sativus* (Hoffm) Roehl, *Brassica oleraceae* L.) [10]. Выделение изолятов в чистую культуру осуществляли согласно методическим указаниям [6, 7], идентификацию проводили по определителям, используемым в микологии и фитопатологии [1, 8].

Поиск потенциальных антагонистов к *B. cinerea* выявлен из числа штаммов и изолятов почвенных сапротрофных грибов (*Trichothecium roseum*, *Trichoderma viride* 408, *T. viride* 457, *T. koningii*, *Chaetomium* sp.), ризосферных и эпифитных бактерий (*Bacillus subtilis* 494, *B. subtilis* 8, *B. amyloliquefaciens* 73A3, *Pseudomonas putida* M). Штаммы митоспоровых грибов, аскомицет *Chaetomium* sp., штаммы бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, используемые в экспериментальных исследованиях, являются частью коллекций чистых культур кафедры ботаники и кафедры микробиологии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Антагонистическую активность грибов изучали методом встречных культур при одновременном посеве на картофельно-сахарозном агаре. Бактерии засеивали кольцом на подсушенную агаризованную среду в чашки Петри после образования бактериального кольца, в центр которых помещали мицелий *B. cinerea* и культивировали при температуре 22–24 °С. Основным критерием оценки исследуемых бактерий и почвенных грибов являлось их влияние на рост и развитие изолятов патогена. Наблюдения за ростом культур и характером их взаимодействия проводили в течение 10 суток.

Основным критерием антагонистической оценки исследуемых бактерий и грибов являлось их влияние на рост, развитие и спороносающую активность

изолятов патогена [6, 7]. Ингибирование роста патогена в процентах вычисляли на 5-е сутки по формуле

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

где  $P$  – показатель ингибирования, %;

$K$  – рост гриба в контроле, мм;

$A$  – рост гриба в опыте, мм.

Степень угнетения фитопатогена учитывали через 10 суток совместного культивирования грибов. Для описания внешнего вида колонии использовали шкалу: А – патоген угнетен в сильной степени, мицелий редкий, прижатый к субстрату; Б – патоген угнетен слабо; В – патоген не угнетен; Г – патоген весь покрыт гиперпаразитом.

Оценкой в баллах обозначали площадь патогена, занятую грибами-антагонистами (через 10 суток): 0 – нет нарастания колонии гриба-антагониста на колонию патогена; 1 – гриб занимает до 25 % площади колонии патогена; 2 – 26–50; 3 – гриб занимает 51–75 %, 4 – гиперпаразит полностью покрывает колонию патогена [10]. Также знаком «+» рядом с цифрой обозначали нарастание гриба-антагониста на колонию фитопатогена, а знаком «++» отмечали появление на колонии патогена очагов спороношения гриба-антагониста. При отсутствии нарастания антагониста на колонию *B. cinerea* измеряли интенсивность спороношения в опытных и контрольных вариантах.

Взаимоотношения между микроорганизмами и фитопатогеном характеризовали 5-ю типами [10]: I – индифферентные (безразличные) взаимоотношения; II – фунгистатический алиментарный (односторонний); III – территориальный антагонизм; IV – антибиотический антагонизм; V – взаимный антагонизм.

Интенсивность спорообразования грибов определяли по формуле [6]

$$I = L \times N / S \times V,$$

где  $I$  – интенсивность спорообразования, шт/см<sup>2</sup>;

$L$  – объем воды для смыва спор, мл;

$N$  – среднее количество спор в малом квадрате камеры Горяева, шт.;

$S$  – площадь вырезанной спороносящей поверхности, см<sup>2</sup>;

$V$  – объем малого квадрата камеры, м.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время накоплен обширный материал, свидетельствующий о высокой потенциальной активности антагонистов из рода почвенных грибов *Trichoderma*, способных продуцировать антибиотики, гидролитические ферменты, обладающие антифунгальным действием. В некоторых культурах *T. viride*, например, образуются хитиназа и глюканазы, которые приводят к лизису клеточных стенок грибов [3, 9]. Многие штаммы *Trichothecium roseum* образуют антибиотик трихотетцин, убивающий мицелий других грибов, и используют его в качестве питательного субстрата [2]. Под воздействием антибиотических веществ фитопатогены плохо развиваются, снижается спорообразование, гифы деформируются. Отдельные виды сумчатых грибов рода

*Chaetomium* продуцируют антибиотическое вещество хитомин, который эффективен по отношению к бактериям и фитопатогенным грибам.

Результаты наших исследований по изучению характера взаимоотношений *B. cinerea* с грибами рода *Trichoderma* показали, что они обладают антагонистическими свойствами по отношению к возбудителю ботритиоза в разной степени. При одновременном посеве наибольшее угнетение роста гриба *B. cinerea* отмечено в тесте с *T. viride* 408 и *T. viride* 457, где показатель ингибирования на 5-е сутки был равен 36,4 и 53,1 % соответственно (табл.).

Штаммы *T. viride* не только нарастают на колонии возбудителей ботритиоза, но и спороносили, проявляя степень гиперпаразитической активности, равную 2. Тип взаимоотношений, когда происходит нарастание колонии антагониста на поверхность колонии фитопатогена, характеризуется как фунгистатический алиментарный антагонизм (рис. 1б, 1с).

Не отмечено гиперпаразитической активности штамма *T. koningii*, патоген был угнетен слабо, нарастания на колонии возбудителя на 10-е сутки не наблюдали, кроме того, интенсивность спороношения в эксперименте была на 20 % выше контроля (рис. 1а). Такой тип взаимоотношений был охарактеризован как территориальный антагонизм, когда происходит обрастание колонии патогена антагонистом. Обычно патоген отстает в росте и снижается споруляция.

Несмотря на слабое угнетение ростовых процессов (показатель ингибирования 25,5 %), отмечалось значительное сокращение спорообразования

Таблица – Оценка антагонистической активности грибов методом встречных культур

Гриб-антагонист	Показатель ингибирования, %	Интенсивность спорообразования, тыс. спор/см <sup>2</sup>		Внешний вид колонии патогена и степень нарастания, балл		Тип взаимоотношений
		Эксперимент	Контроль			
<i>Trichoderma viride</i> 408	36,4	–	–	А	2+	II
<i>Trichoderma viride</i> 457	53,1	–	–	А	2++	II
<i>Trichoderma koningii</i>	24,9	25,3	20,5	Б	0	III
<i>Trichothecium roseum</i>	3,0	28,7	25,7	В	0	I
<i>Chaetomium sp.</i>	25,5	4,8	28,5	Б	0	IV

Примечания. 1. А – патоген угнетен в сильной степени; Б – патоген угнетен слабо; В – патоген не угнетен.

2. 0 баллов – нет нарастания; 1 балл – гиперпаразит занимает до 25 % площади колонии патогена; 2 балла – 26–50 % колонии фитопатогена.

3. + – нарастание гиперпаразита; ++ – на колонии патогена очаги спороношения гиперпаразита.

4. I – индифферентные; II – фунгистатический алиментарный антагонизм; III – территориальный; IV – антибиотический антагонизм.

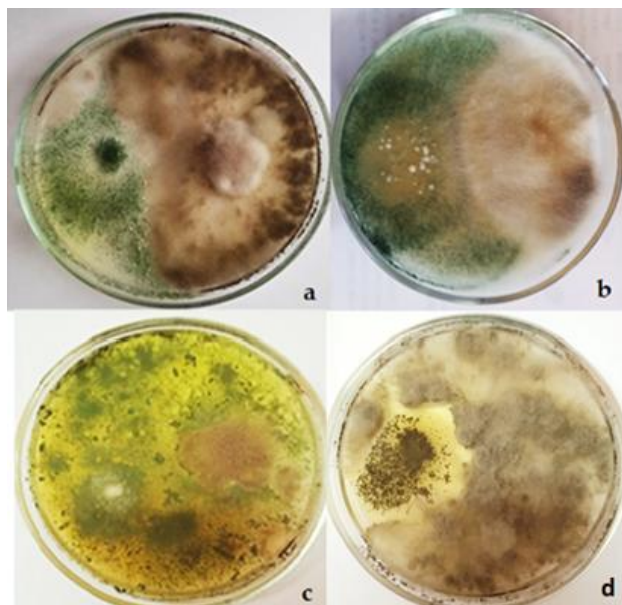


Рисунок 1 – Ингибирование возбудителя ботритиоза грибами: а – *T. koningii*, б – *T. viride* 408, с – *T. viride* 457, d – *Chaetomium sp.*

патогена при совместном культивировании с грибом *Chaetomium sp.* Интенсивность спороношения была в 5,9 раза ниже, чем в контроле. Ограничение конидиального формирования у фитопатогена свидетельствует о выделении в субстрат продуктов метаболизма грибом-антагонистом, что подтверждается наличием свободной зоны между грибами (рис., 1d). Тип взаимоотношений характеризуется как антибиотический антагонизм – замедление роста колонии патогена, образование зоны, в которой роста патогена не наблюдается, но проявляется снижение репродуктивной активности вследствие выделения продуктов жизнедеятельности антибиотической природы антагонистом.

Изучение характера взаимоотношений при совместном культивировании изолятов *B. cinerea* и *Trichothecium roseum* показало, что отношения между грибами индифферентные, что свидетельствует об отсутствии гиперпаразитической способности или фунгистатического действия изолята *Tr. roseum*. Показатель ингибирования составил всего 3 %.

Бактериальным штаммам отводится важная роль в биологическом контроле фитопатогенов на сельскохозяйственных культурах. В рамках определения характера взаимоотношений и поиска антагонистов гриба *B. cinerea* среди бактерий изучено действие представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Псевдомонады способны синтезировать высокоактивные антимикробные вещества, которые ингибируют многие фитопатогенные грибы, в том числе и развитие серой гнили [5]. Спектр антибиотической активности бактерий рода *Bacillus* формируется за счет продуцирования экзоферментов и эндобиотиков.

Рассмотрен характер роста в условиях чистой культуры трех изолятов возбудителя серой гнили, относящихся к различным морфогруппам (склероциальной,

спорулирующей, мицелиальной). Отмечено, что в кольце бактерий рода *Bacillus* рост колоний патогена прекращался на 2–3-и сутки, на 5-е сутки показатель ингибирования составил 88,6–100 %, что указывает на высокую степень антагонизма (рис. 2, 3а, 3б). Проведенные исследования показали, что по отношению к изолятам *B. cinerea* максимальную степень антагонизма проявили бактерии *B. amyloliquefaciens* 73А3 (показатель ингибирования 100 %).

Не отмечено снижение радиального роста фитопатогена в кольце бактерии *P. putida* М, колонии которого распространялись за кольцо бактерий (рис. 3с). На 5-е сутки показатель ингибирования стремился к нулю или даже отмечалось небольшое стимулирование роста гриба под влиянием бактерий (-1,7–3,8 %). Однако на 10-е сутки рост гриба *B. cinerea* в опыте с бактериями *P. putida* М сравнялся с контролем.

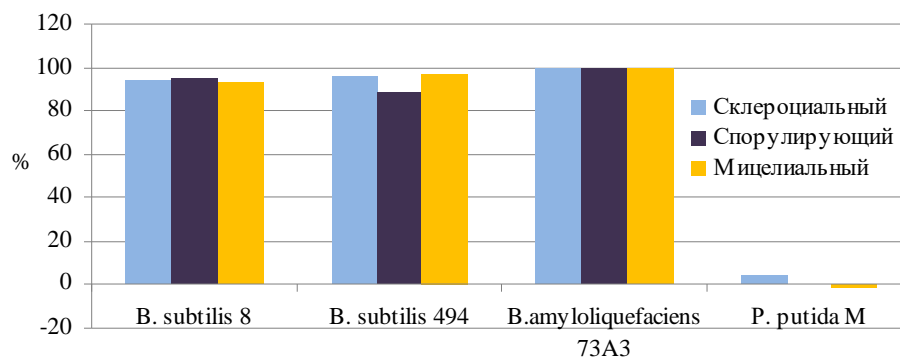


Рисунок 2 – Антагонистическая активность бактерий по отношению к изолятам возбудителя ботритиоза, %

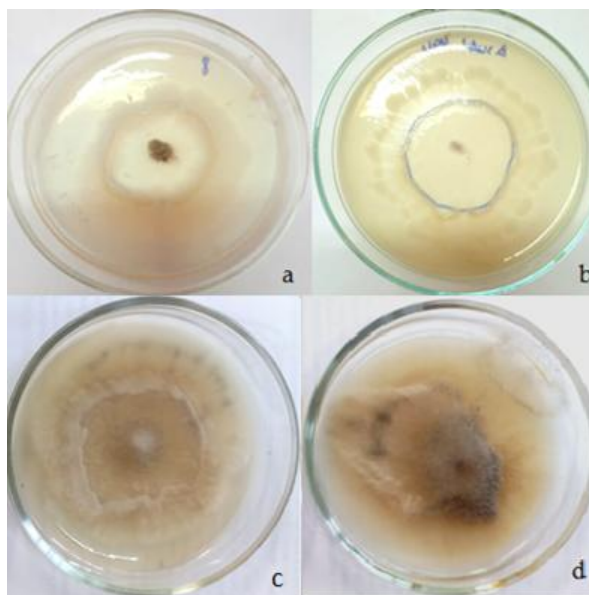


Рисунок 3 – Действие бактерий *B. subtilis* 8 (а), *B. subtilis* 494 (б), *P. putida* М (с) по отношению к *B. cinerea* – контроль (д)

Таким образом, наибольшее угнетение изоляты *B. cinerea* испытывали в тестах с бактериями рода *Bacillus* на основании расчета показателя ингибирования. Полученные результаты можно объяснить возможностью испытываемых бактерий синтезировать вещества антимикробного действия, при действии которых характерным типом взаимоотношений является антибиотический антагонизм. В противовес индифферентные взаимоотношения наблюдались в тестах *B. cinerea* и *P. putida*, где происходило нарастание колонии фитопатогена на поверхность бактерий с сохранением скорости роста гриба.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изученные штаммы почвенных грибов рода *Trichoderma* проявили антагонистический эффект по отношению к возбудителю ботритиоза, показатель ингибирования составил 24,9–53,1 %. Фунгистатический алиментарный антагонизм отмечен при совместном культивировании с *T. viride* 408 и *T. viride* 457. Такой тип отношений, как территориальный антагонизм, установлен между *Trichoderma koningii* и изолятами *B. cinerea*.

При совместном культивировании фитопатогена *B. cinerea* и грибом-аскомицетом *Chaetomium sp.* отмечено значительное снижение интенсивности спороношения изолятов серой гнили. Свободная зона на границе соприкосновения двух грибов свидетельствует о способности *Chaetomium sp.* синтезировать вещества антибиотической природы, что позволяет говорить об антибиотическом антагонизме.

Индифферентные взаимоотношения *B. cinerea* отмечены в опыте с грибом *Trichothecium roseum* и бактерией *Pseudomonas putida* М. Соответственно, данные микроорганизмы не могут быть рекомендованы как агенты биологической защиты для снижения вредоносности патогена.

Бактерии *Bacillus subtilis* 494, *B. subtilis* 8 и *B. amyloliquefaciens* 73А3 являются антагонистами гриба *Botrytis cinerea*. Показатель ингибирования составил 88,6–100 % при совместном культивировании изолятов серой гнили и бактерий рода *Bacillus*, что позволяет инициировать дальнейшие исследования для создания на их основе эффективных биологических средств защиты растений от возбудителя ботритиоза.

## Список использованных источников

1. Билай, В. И. Определитель токсинообразующих микромицетов / В. И. Билай, З. И. Курбацкая. – Киев : Наукова думка. – 1990. – 236 с.
2. Жизнь растений : в 6 т. / под ред. М. В. Горленко. – М., 1976. – Т. 2: Грибы. – 541 с.
3. Коломбет, Л. В. Грибы рода *Trichoderma* – продуценты биопрепаратов для растениеводства / Л. В. Коломбет // Микология сегодня : сб. науч. тр. и лекций // Нац. акад. микологии ; под ред. Ю. Т. Дьякова, Ю. В. Сергеева. – М., 2007. – Т. 1. – С. 323–371.
4. Лихачев, А. Н. Грибы рода *Botrytis Micheli* (Fungi, Deuteromycota): биология, экология, микроэволюция : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.24 / А. Н. Лихачев. – М., 2000. – 350 л.

5. Максимова, Н. П. Антифунгальная активность биопрепаратов на основе природных и эпифитных бактериальных штаммов / Н. П. Максимова, В. Д. Поликсенова, В. В. Лысак // Тез. докл. науч.-производ. конф., посвящ. 25-летию БелНИИЗР, Минск – Прилуки, 14–16 февр. 1996 г. : в 2 ч. – Минск, 1996. – Ч. 1. – С. 147–149.

6. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» / авт.-сост. В. Д. Поликсенова [и др.]. – Минск : БГУ, 2004. – 36 с.

7. Методы экспериментальной микологии / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев, 1982. – 552 с.

8. Определитель болезней растений / М. К. Хохряков [и др.]. – СПб. : Лань, 2003. – 592 с.

9. Сейкетов, Г. Ш. Грибы рода триходерма и их использование в практике / Г. Ш. Сейкетов. – Алма-Ата, 1982. – 248 с.

10. Сравнение гиперпаразитической и антибиотической активности изолятов рода *Trichoderma* Pers.: Fr. и *Gliocladium virens* Miller, Giddens et Foster по отношению к патогенам, вызывающим корневые гнили гороха / Л. Л. Великанов [и др.] // Микология и фитопатология. – 1994. – Т. 28, вып. 6. – С. 52–56.

11. Стадниченко, М. А. Морфолого-культуральные особенности изолятов митоспорового гриба *Botrytis cinerea* Pers. / М. А. Стадниченко, К. В. Вергейчик // Актуальные проблемы изучения и сохранения фито- и микобиоты : материалы IV Междунар. науч.-практ. конф., приуроченной к 100-летию кафедры ботаники, Минск, 31 мая 2021 г. / БГУ ; редкол. : В. Н. Тихомиров (гл. ред.) [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ., 2021. – С. 201–204.

12. Стадниченко, М. А. Перспективы биологического контроля возбудителя ботритиоза на пасленовых культурах / М. А. Стадниченко // Вестн. Белгос. ун-та. Сер. 2. – 2011. – № 2. – С. 49–55.

13. Botrytis: Biology, Pathology and Control / Edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzunski, N. Delen // Springer. – The Netherlands, 2007. – 403 p.

*Поступила в редакцию 28 ноября 2022 г.*

**M. A. Stadnichenko**

## **INTERACTION OF THE CAUSATIVE AGENT OF BOTRYTIOSIS WITH MICROORGANISMS IN CONDITIONS OF PURE CULTURE**

### **SUMMARY**

*The interaction of isolates of the causative agent of botrytiosis with microorganisms in vitro was studied. The antagonistic effect of bacteria of the genus Bacillus and fungi of the genera Trichoderma and Chaetomium in relation to the phytopathogen was shown. The data obtained indicate that it is promising to continue scientific research in this area in order to create effective biological means of protection against botrythiosis in cultivated plants.*

*Key words:* botrytiosis; isolate; causative agent; gray rot; biological protection; strain; mycophilous fungus; rhizospheric bacteria; antagonist.