

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
Україна**АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДОМІНУЮЧИХ ВИДІВ МІКРОМІЦЕТІВ ФІЛОПЛАНІ
ВИНОГРАДУ СОРТІВ СУХОЛИМАНСЬКИЙ БІЛИЙ ТА ОДЕСЬКИЙ ЧОРНИЙ**

При вивченні комплексу мікроміцетів філоплани сортів винограду Сухолиманський білий та Одеський чорний, виявлені мікроміцети роду *Penicillium* з наявністю антагоністичної активності, які є перспективними для можливого використання у біотехнології захисту рослин.

Ключові слова: філоплана, мікобіоти, антагонізм

Вважається, що найбільш безпечними та ефективними засобами захисту рослин від пошкодження фітопатогенами є біологічні, які, на відміну від хімічних пестицидів, більш лагідні до довкілля і не тільки не забруднюють навколишнє середовище токсичними сполуками, але й не руйнують взаємозв'язки між компонентами агрокосмосистеми.

Встановлене явище ендоефітності мікроорганізмів-антагоністів, яке полягає у тому, що окремі мікроорганізми колонізують тканини рослин у фазу паростків і здатні персистувати в організмі рослини на протязі тривалого часу без нанесення останнім будь-яких пошкоджень. При цьому, завдяки власній антагоністичній активності, а інколи завдяки тому, що вмикають захисні реакції рослини, вони захищають рослини від паразитичних мікроорганізмів [1, 2, 3].

Епіфітна мікофлора (мікроміцети, бактерії, стрептоміцети) з наявністю антагоністичних властивостей також тривалий час здатна до збереження у системі "рослина – ґрунт – рослина" і також здатна створювати додаткові захисні бар'єри рослин проти фітопатогенних видів мікроорганізмів. Тому, є актуальним і перспективним пошук та виділення високоактивних штамів мікроміцетів з антагоністичною активністю по відношенню до фітопатогенних видів, що і стало метою цієї роботи.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були видовий склад мікроміцетів, його зміни під впливом пестицидів та властивості епіфітних мікроміцетів філоплани винограду сортів Сухолиманський білий та Одеський чорний з виноградників ННЦ Науково-дослідного інституту виноградарства і виноробства ім.В.С.Таїрова. Виділення мікроміцетів в чисту культуру здійснювали з рослин вказаних сортів, які вирощувалися при захисті рослин з використанням фунгіцидів Антракол і Танос. У контрольному варіанті рослини обприскували водою.

Дослідження проводили шляхом вивчення мікоценозу, що формувався на філоплані сортів винограду як у варіанті із захистом рослин фунгіцидами, так і у контрольному варіанті. З відібраних проб листя сортів Сухолиманський білий та Одеський чорний стерильним фізіологічним розчином робили змиви та готували маточкову суспензію з якої готували 10-кратні розведення від 10^{-1} до 10^{-4} , після чого висівали на щільні поживні середовища: сусло - агар (сусло 4^0 за Балінгом, агар - агар 20 г/л) та Ваксмана (KH_2PO_4 – 1 г/л, MgSO_4 - 0,5 г/л, глюкоза – 10 г, пептон – 5 г, агар-агар – 20 г, вода – 1000 мл, рН – 6,0) [4].

Посіви мікроорганізмів культивували у термостаті при 28°C від 3 до 5 діб, наступним кроком проводили ізоляцію окремих колоній для подальшої роботи з визначення таксономічної належності за загальноприйнятими методами і з використанням визначників [5, 6, 7, 8, 9].

Визначені таким чином комплекси мікроміцетів для кожного варіанту характеризували за показником стрівальності видів, який розраховували за формулою: $C = \frac{A \times 100}{B}$, де: C – стрівальність, A – кількість зразків у яких даний вид зустрічався, B – загальна кількість зразків, а також за показником видової різноманітності, який розраховували за формулою: $d = \frac{S}{\sqrt{N}}$, де: d – індекс видової різноманітності, S - кількість видів виділених у певному варіанті; N - загальна чисельність мікроміцетів у варіанті досліджу [10].

Антагоністичну активність ізольованих мікроміцетів перевіряли методом відстроченого антагонізму по відношенню до таких фітопатогенів: мікроміцетів роду *Fusarium*: *F.culmorum* (Sm.) Sacc., *F.avenaceum* (Fr.) Sacc., а також *Aureobasidium pullulans* (Db.) Arn. та *Botrytis cinerea* Pers.

Антагоністом вважали мікроміцет, який створює зону затримки росту тест культури не менш ніж 2 мм [11].

Отримані результати оброблено методом варіаційної статистики за стандартними методами [12].

Результати досліджень. У таблиці 1 наведені дані, які характеризують таксономічну належність комплексу мікроміцетів, що були ізольовані з філоплани вивчаємих рослин винограду, а також охарактеризовані за показником стрівальності видів та за індексом видової різноманітності.

Таблиця 1

Видовий склад, стрівальність (%), та видова різноманітність (*d*) домінуючих штамів мікроміцетів філоплани винограду сортів Сухолиманський білий (1) та Одеський чорний (2), контроль (3)

Види мікроміцетів	Стрівальність (%) у варіантах		
	Сухолиманський білий	Одеський чорний	Контроль
<i>Alternaria alternata</i> Keisser	100,0	100,0	100,0
<i>A. tenuissima</i> Wilts.	66,7	66,7	33,3
<i>Aureobasidium pullulans</i> Arnaud	0	0	33,3
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	100,0	100,0	66,7
<i>A. niger</i> Van Tieghem	33,3	0	66,7
<i>Mycelia sterilia alba</i>	33,3	0	100,0
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	33,3	0	33,3
<i>P. frequentans</i> Westling	33,3	0	0
<i>P. rubrum</i> Stoll	0	0	33,3
<i>P. chrysogenum</i> Thom	0	0	33,3
<i>P. decumbens</i> Thom	0	0	33,3
<i>P. fellutanum</i> Biourge	0	0	33,3
<i>Trichoderma hamatum</i> Bain.	0	33,3	0
<i>Varicosporium elodeae</i> Kegel	0	0	33,3
Видова різноманітність, <i>d</i>	0,5	0,28	0,93

В подальшій роботі з визначення антогоністичної активності мікроміцетів використовували лише домінуючі види, частота стрівальності яких була не нижчою за 33%.

З отриманих даних ми бачимо, що при використанні пестицидів на сортах Сухолиманський білий і Одеський чорний із складу мікоценозу випадають блоки мікроміцетів з родів *Penicillium*, *Trichoderma* та *Varicosporium*, причому у більшому ступеню (за кількістю видів) мікоценоз збіднюється за рахунок видів з роду *Penicillium*, які, як правило, є найбільш потужними антагоністами. Таким чином, мікроміцети – антагоністи, наявність та функціонування яких на філоплани рослин є одним з факторів природного захисту рослин від пошкодження фітопатогенними видами в першу чергу страждають від використання фунгіцидів.

Причому, після застосування фунгіцидів на листях рослин винограду залишаються фітопатогенні види такі як: *Alternaria alternata* Keisser, *Aspergillus clavatus* Desm., стрівальність яких становила 100% у всіх варіантах дослідження, *Al. tenuissima* Wilts., із стрівальністю 66,7% у варіантах із застосуванням фунгіцидів, *Asp. niger* Van Tieghem на філоплани винограду сорту Сухолиманський білий із стрівальністю 33,3%. Співставлення видового складу мікроміцетів на досліджених варіантах показало, що пестициди не впливають на окремі фітопатогенні та умовно фітопатогенні види мікроміцетів, а і навпаки створюють умови для їх поширення. В той же час зникнення значної кількості видів з мікоценозу завдяки використанню пестицидів не тільки порушує стабільність мікоценозу, але і значною мірою збіднює та спрощує його різноманітність. Наприклад індекс різноманітності (*d*) на варіанті контролю становив 0,93, а за умов обробки пестицидами Сухолиманський білий та Одеський чорний індекс різноманітності різко збіднювався і становив 0,5 та 0,28 відповідно.

За Работновим [13] доміантантами першого рангу вважають види, стрівальність яких у ценозі знаходиться у діапазоні від 20% до 50%. У даній роботі усі мікроміцети, стрівальність яких перевищувала 33% відносили до доміант першого рангу і використовували у подальших дослідженнях з визначення їх антагоністичної активності. Мікроміцети другого рангу (діапазон стрівальності від 5 до 25%), а також ті, що відносяться до рідко стрівальних видів у подальшій роботі не використовували, оскільки характер взаємовідносин мікроміцетів у складі мікоценозу та його стан визначаються саме антагоністичними властивостями домінуючих видів.

У зв'язку із встановленим фактом збіднення мікоценозу (випадіння з мікоценозу дуже важливого блоку мікроміцетів – антагоністів за умов обробки пестицидами) очевидно стала необхідність вивчення антагоністичних властивостей домінуючих видів мікроміцетів філоплани сортів винограду по відношенню до фітопатогенних штамів мікроміцетів. Антагоністичні властивості домінуючих видів мікроміцетів філоплани винограду сортів Сухолиманський білий та Одеський чорний досліджувались по відношенню до найбільш токсигенних фітопатогенних штамів мікроміцетів роду *Fusarium*: *F.culmorum*, *F. avenaceum*, а також *Aureobasidium pullulans* та *Botrytis cinerea*.

У таблиці 2 наведені дані щодо первинного виявлення антагоністів серед домінуючих видів мікроміцетів філоплани сортів Сухолиманський білий та Одеський чорний по відношенню до фітопатогенних штамів.

Результати досліджень показують, що по відношенню до *F. culmorum* високу активність проявляли штами: *Aspergillus clavatus* Desm, *A. niger* Van Tieghem, *P. implicatum* Biourge, *P. rubrum* Stoll, *Trichoderma hamatum* Bain, які утворювали зони затримки росту 16,3; 21,3; 14,3; 11,3 та 14,3 мм відповідно.

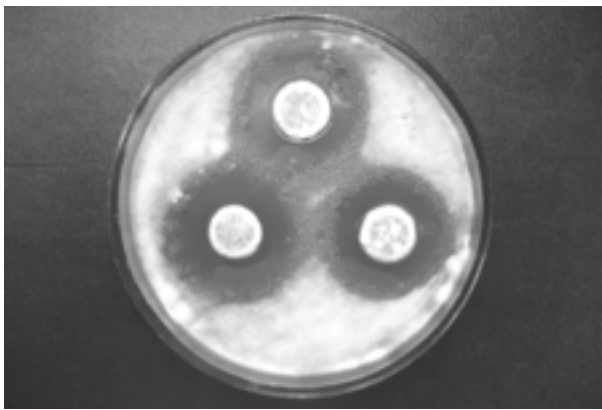
По відношенню до *Fusarium avenaceum* антагоністичну активність проявили такі штами: *Penicillium decumbens* Tho, *P. implicatum* Biourge, *P. rubrum* Stoll, *Trichoderma hamatum* Bain, *Varicosporium elodeae* Kegel, які утворювали зони затримки росту 12,3; 15,3; 10,7 та 12,7 відповідно.

Таблиця 2

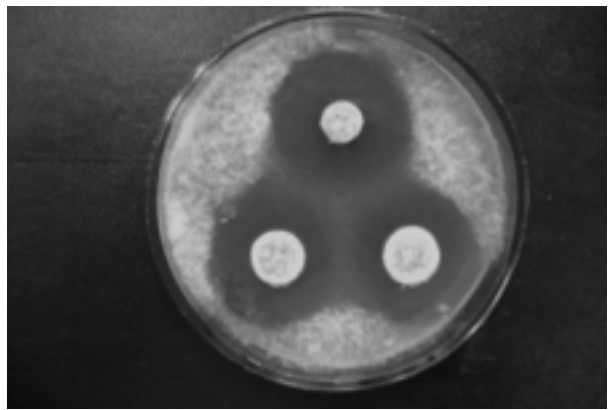
Антагоністичні властивості домінуючих видів мікроміцетів філоплани винограду сортів Сухолиманський білий та Одеський чорний по відношенню до фітопатогенних мікроміцетів

Мікроміцети	Зони затримки росту, мм			
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Alternaria alternata</i> * Keisser	0	0	0	0
<i>A. tenuissima</i> Wilts.	0	0	0	0
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	16,3	0	0	0
<i>A. niger</i> Van Tieghem	21,3	0	0	0
<i>Penicillium decumbens</i> Thom	12,0	12,3	23,7	33,0
<i>P. fellutanum</i> Biourge	0	0	0	0
<i>P. frequentans</i> Westling	0	0	0	0
<i>P. chrysogenum</i> Thom	0	0	5,7	0
<i>P. implicatum</i> Biourge	14,3	15,3	0	0
<i>P. rubrum</i> Stoll	11,3	10,7	25,0	39,0
<i>Trichoderma hamatum</i> Bain.	14,3	12,7	0	0
<i>Varicosporium elodeae</i> Kegel	0	8,3	0	0

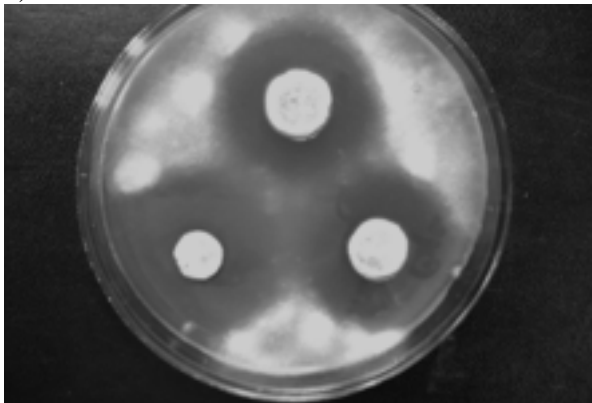
Антагоністичні властивості по відношенню до *Aureobasidium pullulans* виявлені лише у трьох штамів: *Penicillium decumbens* Thom, *P. chrysogenum* Thom, *P. rubrum* Stoll зона затримки росту в експериментах складала 23,7, 5,7, 25,0 мм відповідно. Відносно *Botrytis cinerea* антагоністичну активність проявили штами - *Penicillium decumbens* Thom та *P. rubrum* Stoll, при дуже значних зонах затримки росту у фітопатогенних штамів мікроміцетів, особливо ця властивість помітна у *Penicillium rubrum* (33,0 та 39,0), що проілюстровано рисунком 1 (а - з).



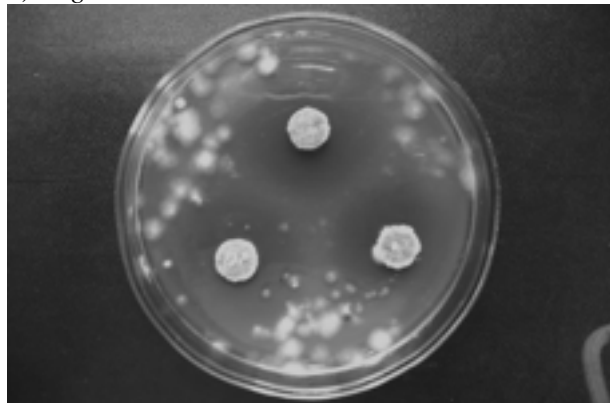
а) *Fusarium culmorum*



б) *F. graminearum*



в) *F. oxysporum*



г) *Botrytis cinerea*

Рис. 1. Антагоністична активність *Penicillium rubrum* відносно токсигенних штамів мікроміцетів (а – г)

В результаті проведених досліджень мікоценозу філоплани рослин винограду сортів Сухолиманський білий та Одеський чорний ізольовано комплекси домінуючих мікроміцетів (*перерахувати комплекси*), визначена видова належність мікроміцетів філоплани (*навести кількість видів*), стривальність видів (*від - до*) та домінантність видів у популяціях (*домінанти першого порядку - %, другого порядку - %та ін.*), підраховані індекси різноманітності (*по сортах Сухол. біл. – ***Од. чорний *** контроль ****).

Вивчено антагоністичні властивості виділених ізолятів та виявлено активний штам *Penicillium rubrum*, який у процесі росту виділяє фітотоксичні метаболіти відносно токсигенних фітопатогенів родів *Fusarium*, *Aureobasidium* та *Botrytis*, що свідчить про його перспективність для біотехнологічного використання як продуцента метаболітів, що захищають рослини.

Як ми бачимо, застосування пестицидів негативно впливає на мікоценоз філоплани оскільки знищує, в першу чергу, штами з високою антагоністичною активністю (*перерахувати види*) і практично не впливає на чисельність багатьох паразитичних та умовно паразитичних видів (*перелічити види і їх стривальність*).

Література

1. Афанасьева Л.Б. Использование бактерий в борьбе с белой гнилью подсолнечника / Л. Б. Афанасьева // Проблемы создания и применения микробиологических средств защиты растений: тез. докл. Всесоюз. конф. - М., 1989. - Ч.2. - С. 285.
2. Возможности биологической иммунизации хлопчатника эндофитными бактериями / М. Я. Менликиев [и др.] // Проблемы генетики, селекции и интенсивной технологии сельскохозяйственных культур: тез. науч. конф. - Душанбе, 1987. - С. 76-77.
3. Misachi I. J. Endophytic bacterien in symptom-free cotton plants / I. J. Misachi // Phytopatology. - 1990. - 80. № 9. - P. 806-811.
4. Кириленко Т. С. Выделение грибов из природных субстратов / Т. С. Кириленко // Методы экспериментальной микологии. - К. : Наукова думка, 1982. - С. 439 - 441.

1. Дьяков Ю. Т. Жизненные стратегии фитопатогенных грибов и их эволюция / Ю. Т. Дьяков // Микология и фитопатология. – 1992. – Т. 26. – Вып. 4. – С. 309-318.
2. Дьяков Ю. Т. Системы размножения грибов и их эволюция / Ю. Т. Дьяков // Микология и фитопатология. - 1999. – Т. 33, № 3. – С. 137 – 149.
3. Дьяков Ю. Т. Общая и молекулярная фитопатология: учебное пособие / Ю. Т. Дьяков, О. Л. Озерецковская, В. Г. Джавахия. – М.: Изд-во общества фитопатологов, 2001. – 302 с.
4. Жданова Н. Н., Василевская А. И. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте / Н. Н. Жданова, А. И. Василевская. – К. : Наукова думка, 1982. – 167 с.
5. Калітiч С. О. Виноградарство / С. О. Калітiч. – Донецьк: БАО, 2005. – 128 с.
6. Дьяков Ю. Т. Общая фитопатология с основами иммунитета / Ю. Т. Дьяков, И. Г. Семенкова, Успенская. – М. : Колос, 1976. – 256 с.
7. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. - М. : Высшая школа, 1986. – 447 с.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей вузов / Г. Ф. Лакин. – 4-е изд. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
9. Работнов Т. А. Фитоценология / Т. А. Работнов. - М. : Изд-во МГУ, 1978. - 384 с.

Слюсаренко А.Н., Кривицкая Т. Н. , Кулак Ю.А.

Антагонистические свойства доминирующих видов микромицетов филопланы винограда сортов Сухолиманский белый и Одесский черный

При изучении комплекса микромицетов филопланы сортов винограда Сухолиманский белый и Одесский черный, обнаружены микромицеты рода Penicillium с наличием антагонистической активности, которые являются перспективными для для возможного использования в биотехнологии защиты растений.

Slusarenko A.N., Krivitskaya T.N., Kulak Yu.A.

Antagonistic properties of dominant type of micromycetes filloplana grape sorts Sukholimansky beliy and Odesskij chernyj

Studying the complex of micromycetes filloplana grape sorts Sukholimansky beliy and Odesskij chernyj, had been found, micromycetes from the family of Penicillium with antagonistic activity, which are prospective for using in biotechnology plant protection.