

УДК 579.64

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *TRICHODERMA*

Э.А. Рафаилова, А.В. Шишкин, Э.А.Ф. Кабрера,
Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, Ф.К. Алимова

Аннотация

Род *Trichoderma* имеет важное хозяйственное значение в связи с широким использованием многих видов для получения ферментов, биологически активных веществ и препаратов для защиты растений. Многие активные штаммы *Trichoderma* при хранении и длительном культивировании теряют свои свойства и вытесняются низкопродуктивными формами. Это вызывает необходимость предварительного отбора активных штаммов со стабильными признаками и последующую их селекцию.

В данной статье было изучено влияние некоторых абиотических факторов, таких, как температура, интенсивность освещения и состав среды, на рост и размножение микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных из различных источников местообитания. Был проведен сравнительно-морфологический анализ изолятов, а также молекулярно-генетический анализ с использованием полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: *Trichoderma*, идентификация, морфология, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение

Одним из важных направлений по ограничению развития организмов, наносящих значительный ущерб сельскому и лесному хозяйствам, является разработка биологического метода контроля, позволяющего отказаться в ряде случаев от использования пестицидов или значительно снизить дозы их применения. Широкое и успешное использование для биологической защиты растений против грибных возбудителей болезней получили грибы рода *Trichoderma*, встречающиеся во всех типах почв. Они играют ключевую роль в сообществе микроорганизмов [1, с. 248; 2–3] и в человеческой деятельности.

Некоторые виды этого рода являются более эффективными агентами биоконтроля против различных почвенных фитопатогенов, чем известные пестициды, и их воздействие намного более безопасно для окружающей среды. Накоплен огромный фактический материал по географическому распространению видов этого рода, по изучению их культурально-морфологических признаков и физико-биохимических свойств, а также по технологии получения на их основе биопрепаратов.

Род *Trichoderma* имеет важное хозяйственное значение в связи с широким использованием многих видов для получения ферментов, биологически активных веществ и препаратов для защиты растений [4]. С другой стороны, почти все виды *Trichoderma* образуют сильные токсины и могут быть причиной ал-

лергии, а некоторые способны вызывать глубокие микозы у людей с подавленным иммунитетом. В связи с этим точная идентификация видов этого рода важна как для специалистов, занимающихся практическим использованием, так и для изучения распространения этих грибов в природе [5].

Многие активные штаммы *Trichoderma* при хранении и длительном культивировании теряют свои свойства и вытесняются низкопродуктивными формами. Это вызывает необходимость предварительного отбора активных штаммов со стабильными признаками и последующую их селекцию.

Таким образом, целью представленной работы явилось изучение влияния абиотических факторов на рост и размножение микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных из различных источников местообитания. В задачи исследования входило:

- получение моноспоровых культур;
- идентификация по комплексу морфологических признаков;
- молекулярно-генетический анализ с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- изучение кинетических характеристик;
- изучение влияния светового фактора.

1. Методы исследования

В работе были исследованы штаммы гриба рода *Trichoderma*, которые были выделены из почвы различных районов Республики Татарстан (штаммы А, В, D), а также несколько штаммов, выделенных из нефтешлама, предоставленного ОАО «Казаньоргсинтез» (штаммы С). Все штаммы грибов хранятся на кафедре микробиологии Казанского государственного университета.

Моноспоровые культуры грибов получали методом, предложенным А.Н. Лихачевым [6]: методом выделения моноспоровых культур на жидких питательных средах с добавлением глицерина для получения ими определенной вязкости. Морфолого-культуральные свойства изучали на картофельно-глюкозном агаре (PDA), также на средах с низким содержанием сахарозы, на специальном питательном агаре (SNA) [7]. Микроскопию проводили сразу после появления конидий, через 3–4 суток [8, с. 264]. Идентификация по морфологическим признакам проводилась по ключам Дж. Самуэляса [9], А.В. Александровой [10], П. Чавери [11].

ДНК было выделено из свежего мицелия по методике, предложенной И.А. Дружининой [12]. Участок ядерной рибосомальной ДНК, содержащий ITS1 и 2 был амплифицирован в реакции ПЦР с использованием комбинации праймеров SR6R (5'-AAG TAG AAG TCG TAA CAA GG-3') и LR1 (5'-GGT TGG TTT CTT TTC CT-3'). В объеме 50 мкл проводили в автоматическом температурно-циклическом устройстве (Терцик, ДНК-технология) по протоколу Дружининой – Кубичека [13]. Режимы ПЦР: а) денатурация ДНК – 95 °С, 1 мин, б) отжиг праймеров – 54 °С, 1.5 мин, в) элонгация – 72 °С, 1 мин. ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 5.5%-ном ПААГ (полиакриламидном геле) или 1%-ной агарозе в трис-боратном буфере. Агарозный гель окрашивали этидиумбромидом и визуализировали в ультрамикроскопе, ПААГ окрашивали нитратом серебра с последующей сушкой в целлофане.

Для изучения влияния абиотических факторов на рост и размножение микромицетов рода *Trichoderma* использовали среды с низким содержанием сахара, с добавлением специального питательного агара (SNA) и PDA. Использовали метод поверхностного посева на чашках Петри. Для изучения влияния температуры на скорость роста *Trichoderma* использовали метод посева на PDA и SNA при различных температурах: 15, 28, 37 °C. В качестве показателя интенсивности роста различных штаммов измеряли изменение диаметра колонии от времени, исходя из этого, рассчитывали:

- радиальную скорость роста: $V = dD/dt$,

где V – скорость роста, dD – прирост диаметра колонии, dt – время, за которое произошло изменение;

- удельную скорость роста: $\mu = 1/N \cdot dN/dt$,

где N – диаметр колонии, dN – прирост, dt – время.

Для определения интенсивности конидиогенеза исследуемых штаммов сверлом ($S = 0.8 \text{ см}^2$) вырезали участок питательной среды со спороносящим мицелием. Затем делали смыв спор с 3-мя разведениями (в 3-х повторностях). Количество спор определяли по оптической плотности спор на фотоэлектрокалориметре (ФЭК, $\lambda = 590 \text{ нм}$). Параллельно проводили подсчет спор, пользуясь счетной камерой Тома – Горяева. Сопоставив данные, полученные в камере Тома – Горяева, и показатели ФЭК, строили калибровочную кривую зависимости $D_{\text{опт}}$ от количества спор.

Влияние светового фактора на рост и размножение изолятов *Trichoderma* изучали при 15 °C на среде PDA. Мицелий выращивали в условиях изменения светового режима: 6 суток при интенсивном освещении; 6 суток в темноте; 3 суток при интенсивном освещении, затем в течение 3 суток в темноте; 3 суток в темноте и, наконец, в течение 3 суток при интенсивном освещении.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы электронных таблиц. Данные представлены средним $\pm$ стандартным отклонением. Уровень значимости, примененный в работе, равен 0.05.

2. Результаты и обсуждение

Среди исследованных изолятов рода *Trichoderma*, наиболее часто встречающимися в почвах Республики Татарстан, являются представители вида *T. asperellum*, а среди штаммов, выделенных из нефтешлама, большинство являлось представителями вида *T. longibrachiatum*.

По культурально-морфологическим признакам не было обнаружено статистически достоверных отличий. Изоляты из различных мест обитаний достоверно отличались по таким признакам, как скорость прорастания конидий при фиксированной температуре, цвет и форма колонии, наличие или отсутствие пигмента в среде, внешний вид конидиеносцев и др. признакам (рис. 1, а, б).

Размер конидий представителей вида *T. asperellum* варьировал от 4 до 5.5 мкм ((2.8–)3.4–3.6(–7.0) $\times$ (2.4–)3–4(–6) мкм). Конидии зеленые, собранные в слизистые головки. У представителей вида *T. longibrachiatum* размер конидий варьировал в интервале от 4.8 до 2.2 мкм ((2.5–)3.5–4.7(–7.8) $\times$ (2.0–)2.3–3.0(–4.0) мкм). Конидии зеленые, строго эллипсоидные, вытянутые. Так как исследуе-

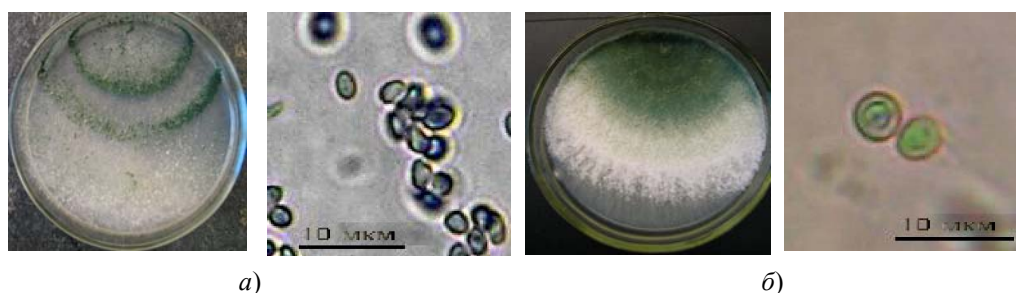


Рис. 1. *T. asperellum*, секция *Trichoderma*. Штамм 4А (а), штамм 5А (б). Место выделения Больше-Кляренское городище 10–11 вв. н. э., Камско-Устьинский р-н РТ

мые изоляты гриба рода *Trichoderma* отличаются своим эволюционным возрастом, мы можем судить о том, что указанные выше признаки являются сравнительно консервативными. Следовательно, они могут служить достоверными критериями для составления систематики грибов данного рода.

Для получения фингерпринтов изолятов *Trichoderma*, максимально отражающих видовые различия, нами были взяты специфические праймеры к ITS-последовательностям участка гена рибосомальной ДНК (SR6R и LR1). Число фрагментов, полученных при амплификации ДНК, колеблется от 5–10. Каждая популяция имеет специфический спектр ПЦР-продуктов-фенотип, характеризующийся определенным количеством фрагментов, их размерами и степенью выраженности (мажорностью). Некоторые фрагменты являются общими для фенотипов всех или большинства исследуемых популяций и выявляют, по-видимому, консервативный участок генома, характеризующий принадлежность этих популяций к одному виду. Число таких фрагментов для *T. asperellum* составило 3 в областях 4000, 1650 и 500 п.н. Для *T. longibrachiatum* – 4 в областях 5000, 4000, 1650 и 500 п.н. (рис. 2). Нами обнаружена невысокая изменчивость между изолятами одного вида, но выделенными из различных экологических ниш.

Исследование ДНК с помощью ПЦР-анализа с использованием специфичных ITS-фрагментов ядерной рибосомальной ДНК изолятов *Trichoderma* подтвердило результаты идентификации с помощью морфологических признаков. Нами показано также различие ПЦР-паттернов изолятов *T. asperellum* и *T. longibrachiatum*, подтверждающих их принадлежность к разным видам.

В природе популяции микроорганизмов, как правило, представлены гетероспоровыми популяциями. Было показано, что природные популяции представлены клонами, проявляющими значимые отличия в кинетических характеристиках. Среди исследованных изолятов были обнаружены гетероспоровые штаммы: A10, C1, D14. В составе гетерогенного изолята A10 было выделено 2 клон: A16 и A17; у изолята C1 выделены 2 клон: C16 и C17; в составе гетерогенного изолята D14 было выделено 3 клон: D16, D17 и D18. Клоны были отделены от соответствующих родительских штаммов на основании значимых различий в кинетических показателях скорости роста до 4-х суток (рис. 3, 4). Для изучения влияния абиотических факторов были получены моноспоровые изоляты.

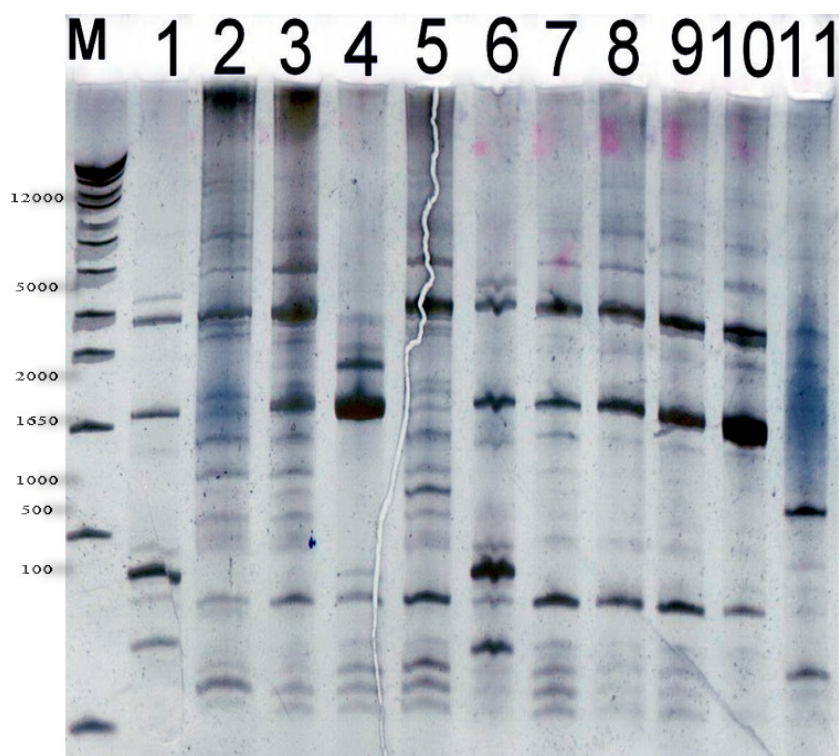


Рис. 2. ПЦР-амплификаты изолятов с использованием праймеров к ITS-последовательности (SR6R и LR1): М – маркер, 1 – *T. longibrachiatum* 2B, 2 – *T. longibrachiatum* 3B, 3 – *T. longibrachiatum* 4B, 4 – *T. spp.* 61, 5 – *T. longibrachiatum* 5B, 6 – *T. asperellum* 67, 7 – *T. asperellum* 2A, 8 – *T. asperellum* 3A, 9 – *T. asperellum* 4A, 10 – *T. asperellum* 5A, 11 – *T. spp.* 11. Электрофорез в 8%-ном ПААГ

Штаммы одного и того же вида, выделенные из географически отдаленных районов обнаруживают значимые отличия по интенсивности конидиогенеза и оптимальной температуре роста. Определен оптимум температуры и скорость роста выделенных изолятов. Исследуемые виды подразделяются на три группы: медленнорастущие со скоростью роста 0.008–0.01 см/ч, быстрорастущие со скоростью роста 0.2 см/ч и изоляты со средней скоростью роста 0.05–0.015 см/ч.

Максимальная интенсивность конидиогенеза наблюдалась при 28 °С у 60% (9 изолятов) А-штаммов, у 46% (7 изолятов) В-штаммов, у 13% (2 изолята) С-штаммов и у 86% (13 изолятов) D-штаммов. С-штаммы отличались высокой интенсивностью конидиогенеза при 15 °С (более 60% всех изолятов из данного места выделения). Были отмечены незначительные колебания величин интенсивности конидиогенеза некоторых изолятов (рис. 5).

Для всех изолятов при температурах 10 и 37 °С характерно более позднее спороношение (на 96–120-й ч роста) в виде неравномерных скоплений (пустул), разбросанных по всей чашке Петри. Температура 28 °С является наиболее благоприятной для роста исследованных изолятов. При этой температуре наблюдается максимальная скорость роста изолятов. Споронение появляется на 48–72-й ч роста в виде концентрических кругов или равномерно расположенных пустул.

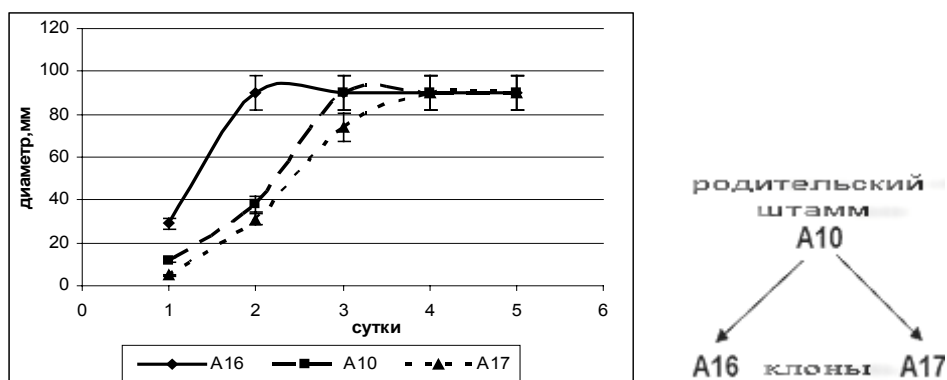


Рис. 3. Расщепление изолятов на клоны и отделение их от родительских штаммов на основании значимых различий по кинетическим показателям

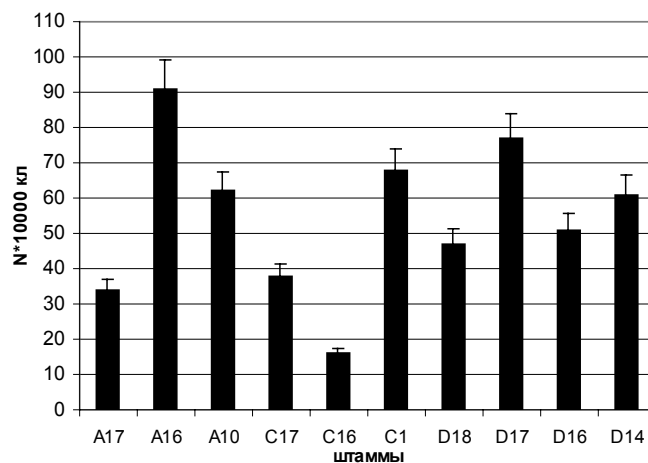


Рис. 4. Интенсивность конидиогенеза родительских штаммов и их клонов при 28 °C на среде КГА

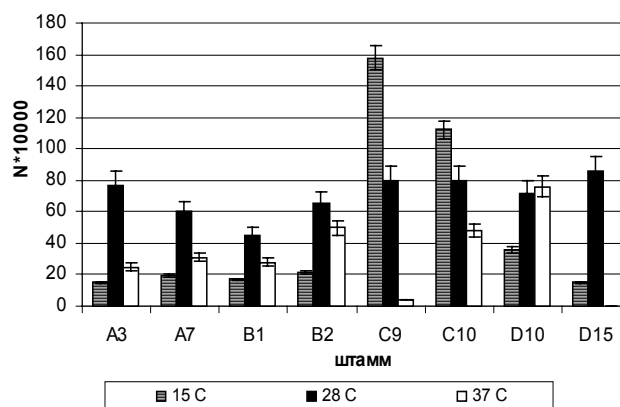


Рис. 5. Зависимость интенсивности конидиогенеза при различных температурных режимах

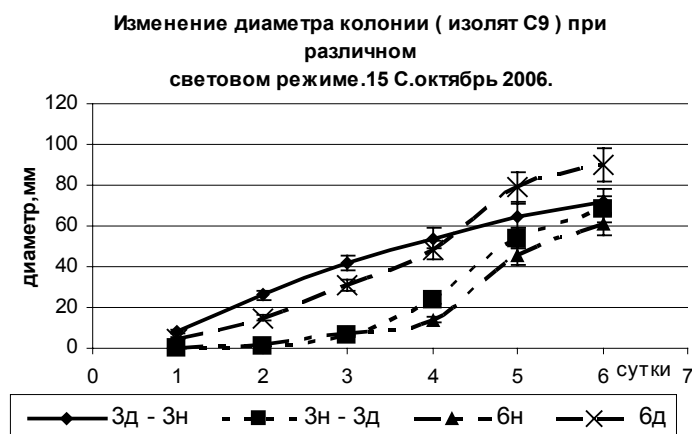


Рис. 6. Влияние фотопериодизма на кинетические характеристики изолята в октябре 2006 г.



Рис. 7. Влияние фотопериодизма на кинетические характеристики изолята в марте 2007 г.

Непрерывное, интенсивное освещение угнетающе влияло на рост и размножение микромицетов рода *Trichoderma*. Наоборот, периодическое чередование темного и светлого времени суток активизировало жизнедеятельность грибов этого рода (рис. 6). Была также обнаружена положительная корреляция между интенсивностью роста микромицетов рода *Trichoderma* и сезонными колебаниями продолжительности светлой части суток. Так, наблюдались значимые различия в интенсивности роста изолятов в октябре и марте при изменении интенсивности освещения при сохранении температуры, влажности и состава питательной среды. К тому же интенсивность роста изолятов в октябре при более короткой светлой части суток превышала соответствующую в марте (рис. 6, 7).

Summary

E.A. Rafailova, A.V. Shishkin, E.A.F. Cabrera, D.I. Tazetdinova, R.I. Tychbatova, F.K. Alimova. Studying the Influence of Abiotic Factors on the Growth and Reproduction of Micromyces Isolates Genus *Trichoderma*.

Different species of the genus *Trichoderma* have an important economic value in connection with the wide use of many of its species for enzyme production, biological active substances and preparations for plant protection. On the other hand, almost all species of *Trichoderma* produce strong toxins and can cause allergy, while some species are capable of causing deep mycosis in people with suppressed immunity. In this connection the exact identification of the species of this genus is important for experts engaged in practical use, and for studying the distribution of these fungi in nature. Many active *Trichoderma* cultures at storage and long cultivation can lose their properties and are superseded by less productive forms. This calls for the preliminary selection of active stems with stable attributes and their subsequent selection.

Key words: *Trichoderma*, identification, morphology, polymerase chain reaction (PCR).

Литература

1. Сейкетов Г.Ш. Грибы рода *Trichoderma* и их использование в практике. – Алма-Ата: Наука, 1982. – 248 с.
2. Великанов Л.Л. Роль грибов в формировании мико- и микробиоты почвоестественных и нарушенных биоценозов и агроценозов: Дис. ... д-ра биол. наук – М., 1997. – 547 с.
3. Rifai M.A. A revision of the genus *Trichoderma* // Mycol. Pap. – 1969. – V. 116. – P. 1–56.
4. Singh A., Srivastava S., Singh H.B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases // Biores. Technol. – 2007. – V. 98, No 2. – P. 470–473.
5. Samuels G.J., Petrini O., Kuhls K., Lieckfeldt E., Kubicek C.P. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* // Studies in Mycology. – 1998. – No 41. – P. 1–54.
6. Лихачев А.Н. Культуральные и биологические особенности штаммов *Trichoderma lignorum* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. – 1998. – Вып. 3. – С. 103–104.
7. Hermosa M.R., Grondona I., Iturriaga E.A., Diaz-Minguez J.M., Castro C., Monte E., Garcia-Acha I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66, No 5. – P. 1890–1898.
8. Алимова Ф.К. *Trichoderma*/Hypocrea (Fungi, Ascomycetes, Hypocreales): таксономия и распространение. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2005. – 263 с.
9. Samuels G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus // Mycol. Res. – 2000. – V. 100. – P. 923–935.
10. Александрова А.А., Великанов Л.Л., Сидоров И.И. Исторический обзор и современная система рода *Trichoderma* (*Eumycota*, *Deuteromycotina*, *Hyphomycetes*) // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38, № 1. – С. 3–19.
11. Chaverri P., Castlebury L.A., Overton B.E., Samuels G.J. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia // Mycologia. – 2003. – V. 95, No 6. – P. 1100–1140.
12. Druzhinina I., Kubicek C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? // J. Zhejiang Univ. Sci. B. – 2005. – V. 6, No 1. – P. 98–112.

13. Druzhinina I., Koptchinski A., Komon M., Bisset J., Szakacs G., Kubicek C.P. A DNA-barcode for strain identification in *Trichoderma* // J. Zhejiang Univ. Sci. B. – 2006. – V. 6, No 2. – P. 100–118.

Поступила в редакцию
12.07.07

Рафаилова Элина Александровна – студент биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.
E-mail: *elinka-85@mail.ru*

Шишкин Антон Владимирович – студент биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.
E-mail: *antonio_foraldo_@mail.ru*

Кабрера Алехандро Эктор Фуентес – студент биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.
E-mail: *alejandro_cafu@mail.ru*

Тазетдинова Диана Ирековна – аспирант биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.
E-mail: *tazetdinova_d@rambler.ru*

Тухбатова Резеда Ильгизовна – аспирант биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.
E-mail: *resedushka@yandex.ru*

Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского государственного университета.
E-mail: *farida_alimova@hotmail.com*