

УДК 631.3:63:537

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *TRICHODERMA LIGNORUM*

Карыпбекова Карлыгач Таланбековна (ORCID 0009-0009-3254-8111),
Арзыбаев Момун Арзыбаевич (ORCID 0000-0002-1989-3561)

Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина,
Бишкек, Кыргызстан
E-mail: kkarypbekova@bk.ru

Аннотация. Целью данного исследования является получение модифицированного субстрата для более продуктивного выхода биомассы маточной культуры штамма микромицета из гриба *Trichoderma lignorum* T-22. Данная культура используется в виде биопрепарата в качестве биологического метода защиты растений от грибковых заболеваний, против почвенных нематод в теплицах, а также и в открытом грунте. Биопрепарат Триходермин – широко применяется в сельском хозяйстве. Благодаря способности не только подавлять рост и развитие патогенных грибов, но и паразитировать на них, не нанося вреда растениям. Кроме этого, этот почвообитающий гриб *Trichoderma lignorum* антагонист многих фитопатогенных грибов, развитие которых связано в той или иной степени с почвой.

Ключевые слова: регулятор роста, антифунгальные свойства, возбудитель болезни, биопрепарат на основе микромицета штамма *Trichoderma*

TRICHODERMA LIGNORUM ТУКУМУНДАГЫ КОЗУ КАРЫНДЫН БИОТЕХНОЛОГИЯЛЫК ӨСТҮРҮҮ ЫКМАСЫ

Карыпбекова Карлыгач Таланбековна (ORCID 0009-0009-3254-8111),
Арзыбаев Момун Арзыбаевич (ORCID 0000-0002-1989-3561)

К.И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университети,
Бишкек, Кыргызстан
E-mail: kkarypbekova@bk.ru

Аннотация. Бул изилдөөнүн максаты *Trichoderma lignorum* T-22 тукумунан микромицет штаммынын энелик культурасынан биомассанын кыйла жемиштүү түшүм биомассасы үчүн модификацияланган субстрат алуу болуп саналат. Бул культуранын биологиялык препарат түрүндө өсүмдүктөрдү күнөсканаларда жана ошондой эле ачык жерде грибоктук оорулардан, топурак нематоддорунан коргоонун биологиялык ыкмасы катары колдонулат. Триходермин биологиялык препараты айыл чарбасында кенири колдонулат. Триходермин биопрепараты патогендүү козу карындын өсүшүн жана өнүгүшүн басуу менен, алардын мицелийинин үстүнө жайгашып паразитизм жөндөмдүүлүгү дагы бар, бирок ошону менен бирге өсүмдүктөргө дагы зыян келтирбейт. Мындан тышкары, бул козу карын *Trichoderma lignorum* топурак кыртышта жашоочу болуп көптөгөн фитопатогендик козу карындардын антагонисти болуп саналат, алардын өнүгүшүнө тоскоолдук жаратат.

Өзөктүү сөздөр: өсүүсүн жөнгө салуучу стимулятор, антифунгалдык касиети, *Trichoderma* штаммдын негизиндеги биопрепарат, илдет козгогуч

BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR CULTIVATING FUNGUS OF THE GENUS *TRICHODERMA LIGNORUM*

Karypbekova Karlygach Talantbekovna (ORCID 0009-0009-3254-8111),
Arzibaev Momun Arzibaevich (ORCID 0000-0002-1989-3561)

Kyrgyz National Agrarian University named after. K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyzstan
E-mail: kkarypbekova@bk.ru

Abstract. The aim of this study is to obtain a modified substrate for a more productive biomass yield of the mother culture of the microbial strain of *Trichoderma lignorum* T-22. This culture is used in the form of a biopreparation as a biological method of plant protection against fungal diseases, against soil nematodes in greenhouses, as well as in the open ground. Trichodermin biopreparation is widely used in agriculture. Due to its ability not only to inhibit the growth and development of pathogenic fungi, but also to parasitize them without harming plants. In addition, this soil-inhabiting fungus *Trichoderma lignorum* is an antagonist of many phytopathogenic fungi, the development of which is associated to some extent with soil.

Keywords: growth regulator, antifungal properties, pathogen, biopreparation based on micro-mycete strain *Trichoderma*

Введение

Грибы рода *Trichoderma* широко используются в качестве биологических средств борьбы с фитопатогенами. Известно также, что различные виды рода *Trichoderma* способны продуцировать фитогормоны (ауксины, этилен, цитокинины) и помимо своих защитных свойств оказывают прямое стимулирующее действие на рост растений. Влияние грибов *Trichoderma* на развитие растений важно для их использования в сельском и лесном хозяйстве, а также для понимания роли этих грибов в естественных и искусственных экосистемах. Исходя из них, разработка

экологически чистых технологий, создание биологических препаратов является важным направлением сельскохозяйственного производства. (Сейтеков, 1982.)

Биологический препарат Триходермин производится в Кыргызской Республике с 1990-х годов. Широко используется на овощных, зерновых и плодовых растениях.

В настоящее время разработка технологии получения биопрепаратов на основе штаммов грибов рода *Trichoderma lignorum* и оценка воздействия штаммов на разных субстратах является актуальной задачей.

Целью данного исследования является получение модифицированного субстрата для более продуктивного выхода биомассы маточной культуры штамма микромицета из рода *Trichoderma lignorum* Т-22.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования является микромицет *Trichoderma lignorum* Т-22, маточная культура из лабораторной коллекции Департамента перерабатывающей промышленности, органического сельского хозяйства.

Биотехнологические методы

Ферментационные методы: использование биореакторов для массового культивирования *Trichoderma lignorum* и получения биопрепаратов.

Биоконтроль: изучение эффективности *Trichoderma lignorum* в защите растений от болезней в лабораторных и полевых условиях.

Были выбраны несколько видов питательного субстрата. Далее биомасса биопрепарата, накопивших на определенных субстратах использовали для проращивания семян пшеницы. Согласно государственному стандарту семена проращиваются в оптимальных условиях, соответствующих требованиям ГОСТ 12038-84. Зерновые культуры (яровая, озимая мягкая пшеница, рожь, ячмень, просо) проращивают при постоянной температуре +20 °С, энергию прорастания определяют через 3 дня, всхожесть - через 7 дней. Энергия прорастания характеризует всхожесть семян, быстроту и общую всхожесть. В работе использовали нижеследующие питательные среды:

1. *Питательная среда сусло-агар*

Глюкоза – 10,0 гр (Сахароза – 20 гр)

Агар – 30 гр

Дистиллированная вода – 0,5 л

рН – 6,5 – 7,2

Сусло – 0,5 л

Разбавленная среда стерилизуют в автоклаве при 1,5 атм в течение 40 минут.

2. *Среда Чапека*

Сахароза – 20 гр

NaNO₃ – 2 гр

KH₂PO₄ – 1 гр

MgSO₄*7H₂O – 0,5 гр

KCl – 0,5 гр

FeSO₄ – 0,01 гр

Агар – 20 гр

Дистиллированная вода – 1 л

рН - 5,6-6,0

Разбавленная среда стерилизуют в автоклаве при 1,5 атм в течение 30 минут.

3. *Картофельно-декстрозная агаровая среда*

Мелко нарезанный картофель(кубик) – 200 гр

Глюкоза – 10,0 гр

NaCl – 1,0 гр

Агар – 30,0 гр

Дистиллированная вода – 1 л

рН – 6,5 – 7,2

Разбавленная среда стерилизуют в автоклаве при 1,5 атм в течение 35 минут.

Определение сухого веса биомассы: Для определения веса биомассы грибов после культивирования на жидкой питательной среде мицелиальную пленку отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, промывали физиологическим раствором и вновь фильтровали через бумажный фильтр. Мицелий высушивали в сушильном шкафу до постоянного веса при температуре 105±2 °С(Алимова, 2006).

Определение выхода конидий: После культивирования грибов на жидкой питательной среде споры смывали водой с мицелиальной пленки, высушенной при комнатной температуре, споры смывали водой с навески ферментационной массы. В полученной суспензии подсчитывали количество конидий с помощью камеры Горяева по формуле:

$$T = M \cdot n \cdot 5 \cdot 1000, \quad (1)$$

где T - титр;

M - количество спор в 50 квадратах;

n - разведение (Садькова, 2009).

Результаты исследования

Определение сухой биомассы дает информацию о сохранении скорости деления, количестве клеток – растут они или перестали расти. Далее клетки микромицета попадая в окружающую среду дает ему возможность закрепиться в данной эконише, что может благотворительно влиять и на почвенную биоту. Так как, известно, что присутствие в почвенной биоте грибка триходермы представляет собой о благополучном состоянии данной почвенной биоты.

Систематический статус рода *Trichoderma* следующий: - по Домену относится к эукариотам, царство грибы, отдел Аскомицеты, к классу Дейтеромицеты, к порядку Гипомицеталес, к семейству Гипокреалес, к роду Триходерма и к виду *Trichoderma lignorum* T-22 (рис.1).

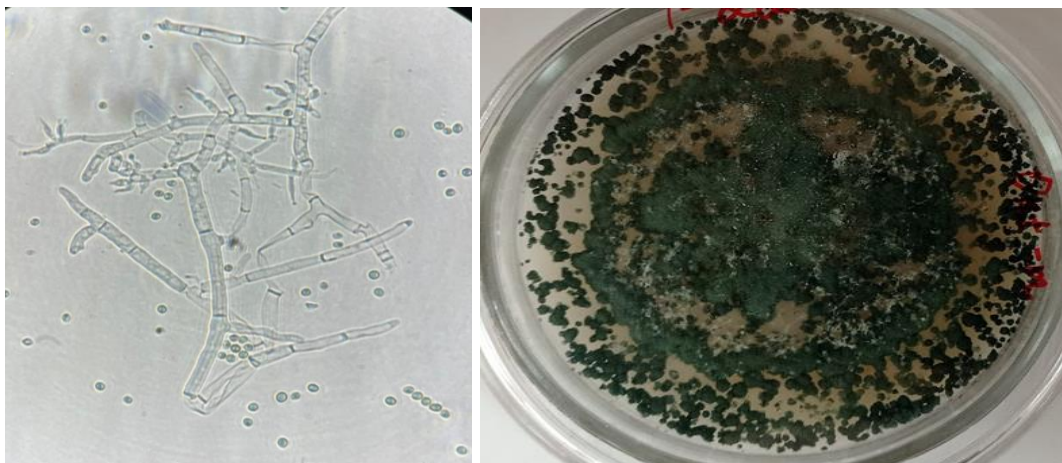


Рис. 1. *Trichoderma lignorum* T-22 чистая культура

Грибы триходермы образуют бесцветный мицелий, белые, желтые, часто зеленые или темно-зеленые колонии. Колонии одноклеточные, шаровидные (2,5 – 3,7 мкм), по 10 – 20 штук объединены в одну головку. Гриб образует сферические хламидоспоры размером 7,5-15 мкм. Эти штаммы грибов устойчивы к низким температурам (переносят низкие температуры от -2°C до -4°C), оптимальное значение pH 4-6.

Незрелые грибы имеют характерный внешний вид. Они образуют быстрорастущие колонии, густо-зеленые, иногда белые, с мицелием в соответствующих мешочках-спорах. Носители конидий образуют мешочки разных типов. Отличить их очень сложно. Иногда образует воздушный мицелий, иногда образует сложные мешочки, похожие на ветки деревьев. Фиалиды образуют бутылкообразный мешочки, а конидии располагаются в головке (Садькова, 2012, 2015). Триходерма: *Trichoderma hamatum* и *Trichoderma polysporum* при спорообразовании образуют компактные полукруглые кисты. Лишь у густо разросшегося воздушного мицелия на богатой питательной среде мешочки появляются на 3-й неделе или не появляются вовсе. Спороношение происходит только в микроконидиях. По этим признакам мы не можем правильно определить вид. У других видов рост спороносителя проявляется в различных формах как в мицелии, так и в аскаспорах. Хотя цвет и пигмент субстратного мицелия колонии наблюдаются нечасто, они могут быть важным индикатором, описывающим окружающую среду. Но пигменты проявляются не во всех средах, а только у свежeweделенных культурах. Штаммы часто имеют светло-зеленовато-желтые пигменты. Многие виды имеют темно-зеленый цвет. Но это не отличительные знаки. С другой стороны, некоторые виды появляются без пигмента. У некоторых изолятов можно наблюдать розовую окраску (Садькова, 2012; Алимова, 2006).

Соотношение макро- и микроконидий друг к другу зависит от условий выращивания. Это затрудняет идентификацию. Строение макроконидий имеет таксономическое значение.

Таким образом, на трех средах в жидком виде проращивали микромицет триходермина в итоге самый лучшие показатели были на картофельно-декстрозном агаровой среде. Так, если, на среде Чапека грибок в течении 10 суток набрал биомассы всего 176 тысяч клеток/мл среды, то в картофельно-декстрозном биомасса была увеличена в 3 раза, то есть составляла 510 тысяч кл/мл среды. Надо отметить, также рост на сусло-агаре, она составляла меньше количество клеток на 1 порядок ниже, т.е. составил 460 тысяч клеток/мл среды (рис. 2). Однако у более молодой культуры проявлялся субстратный пигмент, которого у обоих и в картофельно-декстрозном и на среде Чапека он не проявлялся.

Дискуссия

В наших дискуссионных исследованиях штамм *Trichoderma lignorum* T-22 изучался как противогрибковый и регулирующий рост стимулятор видов растений *in vitro* и *in vivo*.

Грибы этого типа имеют большое значение для различных областей биотехнологии. Грибы рода *Trichoderma* широко используются в качестве биологических агентов для борьбы с фитопатогенами растений (Mastouri, Bjorkman, Harman, 2010). Чтобы выяснить многофункциональные свойства препарата Триходермин, мы оценили ак-

тивность стимуляции роста. Для определения продуктивности семян использовали семена пшеницы (*Triticum aestivum*) и кукурузы (*Zea mays*). Они дали хорошие результаты. В последнее время появились сообщения о том, что различные виды рода *Trichoderma* способны продуцировать фитогормоны (ауксины, этилен, цитокинины) и, помимо защитных свойств, оказывать прямое стимулирующее действие на рост растений (Голованова, 2009). Такое влияние грибов *Trichoderma* на развитие растений важно для их использования в сельском и лесном хозяйстве, а также для понимания роли этих грибов в естественных и искусственных экосистемах.

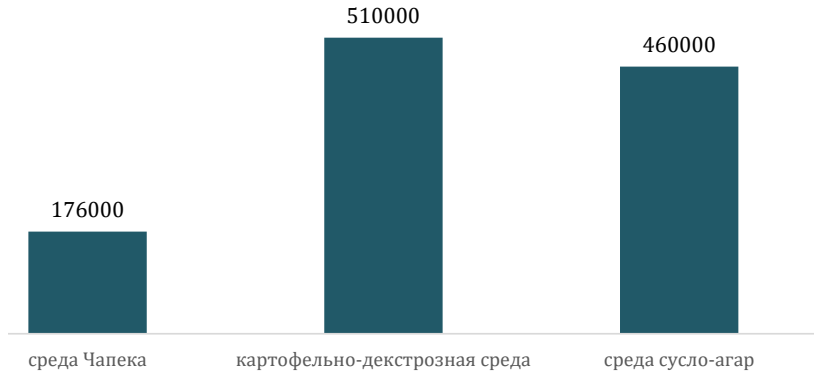


Рис. 2. Общая биомасса (ккл/мл)

Гриб *Trichoderma lignorum* является очень сильным ингибитором патогенных видов, обладает противогрибковой активностью в отношении патогенных грибов *F. redolens* и *F. oxysporum* при методе перпендикулярных штрихов, также нами были проведены модельные эксперименты в почве.

Trichoderma lignorum эффективна в борьбе с почвенными фитопатогенами, вызывающими корневые гнили злаков, увядание хлопчатника, ризоктониоз картофеля, черную ножку капусты и ряда других заболеваний. Данная культура особенно перспективна при использовании в защищенном грунте (Алимова, 2005). Это связано с тем, что они обладают способностью создавать антибиотические соединения и гидролазы широкого спектра действия против патогенных бактерий, фитопатогенных грибов и раковых клеток с целью обеспечения безопасности живых организмов (Алимова, 2006). Кроме того, они взаимодействуют с фосфолипидной мембраной возбудителя, повышают ее проницаемость и проявляют ингибирующую активность. В настоящее время обнаружено, что каждый тип *Trichoderma* sp. обладает антагонистическими свойствами (Djonovic S. et al., 2007).

Гриб *Trichoderma lignorum* является очень сильным ингибитором патогенных видов, противогрибковая активность патогенного гриба *F. oxysporum* полностью покрывалась гиперпаразитизмом за 5-7 дней. А *F. chlamydosporum* смог проявить свои гиперпаразитарные свойства примерно через 10 дней. *F. redolens*, *F. equiseti* обладали сильными патогенными свойствами, но через 15-17 дней гриб *Trichoderma* проявлял к ним более антагонистические свойства. В лабораторных условиях установлено, что биологический препарат на основе *Trichoderma lignorum* обладает высокими антагонистическими свойствами (Доолоткельдиева, Конурбаева, Бобушова, 2009; Сейтеков Г. Ш., 1982).

Кроме того, в почве определяли влияние грибов *Trichoderma lignorum* на семена кукурузы и пшеницы. Гриб триходерма часто встречается в почве (Алимова, 2005). Сведения о местонахождении некоторых видов рода *Trichoderma* можно найти только в специальных исследованиях почвенной микобиоты (Садыкова и др., 2015).

В этом исследовании *Trichoderma lignorum* T-22 (500 000 клеток/мл) также была высокой в качестве регулятора роста, тогда как патогенные *F. redolens*, *F. oxysporum* составляли 30-70%. С другой стороны, продуктивность патогенных грибов *F. redolens*, *F. oxysporum* и *Trichoderma lignorum* при совместном посеве составила 65-100% (Мелентьев, Кочемасова, Галимзянова, 1990).

Выводы

Культивирование грибов рода *Trichoderma lignorum* представляет собой важное направление в биотехнологиях, предоставляя экологически чистые и эффективные решения для сельского хозяйства, промышленности и охраны окружающей среды. Современные методы культивирования и применения этих грибов способствуют устойчивому развитию и инновациям в различных областях.

Биологический препарат Триходермин производится в Кыргызской Республике с 1990-х годов. В биологической лаборатории его культивируют только на сусло агар-агаре. Поэтому в нашем исследовании были предприняты модифицировать данную среду, возможность роста их на других по составу средах.

Нами были изучены морфологические и культуральные свойства гриба триходерма. Установлено, что, в наших исследованиях биомасса триходермы выше в картофельно-декстрозном агаре, чем на среде Чапека. Однако, у более молодой культуры триходермы на сусло-агаре проявлялся субстратный пигмент, которого у обоих и в картофельно-декстрозном и на среде Чапека он не проявлялся.

Использованная литература

1. Алимова Ф.К. *Trichoderma*/Нуроцеа (Fungi, Ascomycetes, Нуроцеалы): Таксономия и распространение/Ф.К.Алимова. -Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2005. - 328с
2. Алимова, Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*: учебное пособие / Ф. К. Алимова. – Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2006. -209с.
3. Алимова Ф.К. Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве. В: журнал АГРО XXI, 2006, пр. 4-6, с. 18-21
4. Голованова, Т.И. Роль грибов рода *Trichoderma* в повышении урожайности пшеницы и ячменя / Т.И. Голованова, Е.В. Долинская, Е.А. Сичкарук // Вестник КрасГАУ. – Красноярск. – 2009. Т. 6. С. 53
5. Доолоткельдиева Т.Д., Конурбаева М.У., Бобушова С.Т. Целлюлозаразлагающая активность почвенных микромицетов, выделенных из различных экосистем Кыргызстана. //Известия НАН КР Бишкек-2009.
6. Мелентьев А. И., Кочемасова А. П., Галимзянова Н. Ф. Использование микроорганизмов для защиты сельскохозяйственных растений от болезней // Актуальные вопросы биотехнологии. 1990. –С.4.
7. Садыкова В.С. и др. Антагонистическая и ростстимулирующая активность штаммов родов *Trichoderma* и перспективы их использования в биоконтроле. В: Иммунология, аллергия, инфектология, микология. форум. Москва, 2009, т. 2, с. 206-207.
8. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е., Рогожин Е.А. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири// Прикладная биохимия и микробиология. -2015. –Т.51, №13.
9. Садыкова В.С. Грибы рода *Trichoderma* Средней Сибири: видовой состав и использование в биотехнологии / В.С. Садыкова // Биоразнообразие и экология грибов и грибоподобных организмов Северной Евразии: материалы Всерос. конф. с междунар. участием. – Екатеринбург, 2015. – С. 217–219.
10. Сейтеков Г. Ш Грибы рода *Trichoderma* и их использование в практике. Из-во «Наука», 1982. Алма-Ата: Наука, 1982-248 с.
11. Mastouri F., Bjorkman T., Harman G. Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. In: J. Phytopathology, 2010, vol. 100, p. 1213-1221.

УДК 63.632.111

ОЦЕНКА СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БОЛЕЗНЯМ И ВРЕДИТЕЛЯМ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРНОГО ПОЛИГОНА ГОРНОГО АЛТАЯ

Окашева Нурлана Амантаевна (ORCID 0009-0007-2823-0464)¹,
Красников Сергей Николаевич (ORCID 0009-0008-2069-7980)²,
Конунова Айана Николаевна (ORCID 0009-0008-2086-0506)¹

¹ФГБОУ ВО «Горно-Алтайский государственный университет»,
Горно-Алтайск, Россия

²ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»,
Омск, Россия

E-mail: onur_lana@mail.ru

Аннотация. В данной работе впервые проведено исследование с целью определения уровня устойчивости к болезням и вредителям ранних сортов картофеля Белуха, Горец и Сувенир Горного Алтая (авторы сортов Стрельцова Т.А., Красников С.Н.) в условиях высокогорного полигона Горного Алтая (с. Акташ, Улаганский район в 2023 году). Основные находки и выводы исследования касаются следующего аспекта - уровень устойчивости к болезням и вредителям у каждого сорта картофеля определяется различными факторами, такими как климатические условия, почвенный состав и наличие патогенов и вредителей на полигоне.

Ключевые слова: Генотип, Горец, Белуха, Сувенир Горного Алтая, фитофтороз, парша обыкновенная

КАРТОШКА СОРТТОРУН ООРУЛАРГА ТУРУКТУУ БААЛОО ЖАНА АЛТАЙДЫН БИЙИК ТООЛУРУНУН ЗЫЙКАНЧЫЛАРЫ

Окашева Нурлана Амантаевна (ORCID 0009-0007-2823-0464)¹,
Красников Сергей Николаевич (ORCID 0009-0008-2069-7980)²,
Конунова Аяна Николаевна (ORCID 0009-0008-2086-0506)¹

¹Горно-Алтай мамлекеттик университетинин федералдык мамлекеттик
бюджеттик жогорку окуу жайы, Тоолуу-Алтай ш. Алтайск, Орусия

²Омск агрардык изилдөө борбору, Омск, Орусия

Аннотация. Бул иште биринчи жолу картошканын Алтай тоосунун Белуха, Горец жана сувенир сортторунун (сорттордун авторлору Стрельцова Т.А., Красников С.Н.) илдеттерге жана зыянкечтерге туруктуулук деңгээлин аныктоо боюнча изилдөө жүргүзүлгөн. Алтай тоосунун бийик тоолуу полигонунун шарттары (б. Акташ, Улаган району 2023-ж.). Изилдөөнүн негизги тыянактары жана корутундулары төмөнкү аспектиге тиешелүү – ар бир картошканын сортундагы илдеттерге жана зыянкечтерге туруктуулук деңгээли ар кандай факторлор менен аныкталат, мисалы, климаттык шарттар, кыртыштын курамы жана уча-стокто оору козгогучтар менен зыянкечтердин болушу.

Өзөктүү сөздөр: Генотип, Тоолуу, Белуха, Алтай тоосунун сувенири, кеч күйүүчү май, кадимки котур