

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Взаимодействия почвенных микроорганизмов и растений.....	8
1.1.1 Негативное воздействие микроорганизмов на растения.....	8
1.1.2 Положительное воздействие микроорганизмов на растения	12
1.1.3 Взаимодействие растений с микроорганизмами-антагонистами патогенов.....	17
1.1.3.1 Влияние грибов рода <i>Trichoderma</i> на рост и развитие растений	18
1.1.3.2 Влияние психротолерантных бактерий на растения.....	22
1.2 Биологическая защита растений.....	23
ГЛАВА 2 ОБЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
2.1 Объекты исследования	27
2.1.1 Описание растений кукурузы	27
2.1.2 Описание растений ржи.....	29
2.1.3 Описание грибов рода <i>Trichoderma</i>	31
2.1.4 Описание психротолерантных микроорганизмов	33
2.2 Методы исследования.....	37
2.2.1. Обработка семян психротолерантными бактериями.....	37
2.2.2 Обработка семян спорами гриба рода <i>Trichoderma</i>	37
2.2.3 Условия выращивания растений	37
2.2.4 Определение количества микроорганизмов.....	38
2.2.5 Определение морфофизиологических параметров растений.....	39
2.2.6 Определение содержания зеленых пигментов.....	39
2.2.7 Статистическая обработка результатов.....	40
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ Ошибка! Закладка не определена.	
3.1 Подбор эффективного штамма психротолерантных микроорганизмов, влияющего на рост и развитие растений .. Ошибка! Закладка не определена.	

3.2 Влияние штамма УОЗК2 и грибов <i>Trichoderma asperellum</i> на структуру ризосферы растений <i>Secále cereále</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Влияние микроорганизмов грибного и бактериального происхождения на рост <i>Secále cereále</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Влияние микроорганизмов грибного и бактериального происхождения на содержание хлорофилла <i>a</i> и <i>b</i> в листьях растений <i>Secále cereále</i>	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одной из важнейших задач современных исследований является повышение продуктивности сельскохозяйственных растений. Особую роль здесь играет защита растений от болезней и сорняков [1,2,3].

В настоящее время зарегистрировано большое количество фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, способных привести к болезням или полной гибели растения [4,3,5,6].

Воздействие микроорганизмов может сказываться как отрицательно, так и положительно на ростовые процессы растений и на их восприимчивость к различному роду болезням. Положительное действие основано на антагонистическом свойстве микроорганизмов. Они способны образовывать связи с корнями растений и оказывать не только защитный эффект, но и стимулировать рост и развитие растения. К таким микроорганизмам относятся грибы рода *Trichoderma*, а также психротолерантные бактерии, выделенные из карстовых пещер Красноярска. Препараты, полученные из спор микроорганизмов-антагонистов безопасны для человека и животных. Это является их отличительной особенностью от других способов защиты растений. Изучение взаимодействия микроорганизмов-антагонистов патогенов и растений в настоящее время представляет большой научный интерес и особенно актуально в связи с возможностью альтернативной замены пестицидов на вещества биологической природы [1,7,8].

Научная новизна. Из всех биопрепаратов грибного происхождения наиболее часто применяются препараты на основе грибов рода *Trichoderma*. Исследователями отмечен их высокий стимулирующий и защитный эффект на различных сельскохозяйственных культурах [4,7,8]. Написано множество статей, описывающих их высокую антагонистическую и гиперпаразитическую активность [3,9,5,10,11]. Следует отметить, что механизм взаимодействия микроорганизмов-антагонистов изучен не

достаточно полно и поэтому исследования взаимодействий бактерий с растениями представляет научную новизну и требует дальнейших исследований.

Еще одними малоизученными, но интересными микроорганизмами-антагонистами являются пещерные психротолерантные бактерии. Отмечено, что эти микроорганизмы способны адаптироваться к низким температурам, разным показателем солености и рН, безкислородному окружению, а также повышенному воздействию УФ. Это дает преимущество над уже существующими биопрепаратами, так как микроорганизмы, входящие в их состав не всегда являются жизнеспособными в природных условиях, особенно в начале вегетационного периода [1].

Поэтому принципиально новым является изучение физиолого-биофизических процессов, происходящих в растении, выращенных под действием психротолерантных микроорганизмов, выделенных из карстовых пещер Красноярского края.

Практическая значимость. Исследование влияния психротолерантных пещерных микроорганизмов и грибов рода *Trichoderma* на рост и развитие растений может способствовать дальнейшим разработкам биологических препаратов для защиты и улучшения продуктивности сельскохозяйственных культур.

Цель данного исследований - изучение влияния грибов рода *Trichoderma asperellum* МГ-97 и психротолерантных пещерных бактерий, выделенных из карстовых пещер Красноярска на микрофлору прикорневой зоны растений и морфо-физиологические и биохимические показатели растений.

Задачи исследования:

1. выбрать эффективные штаммы психротолерантных микроорганизмов, влияющих на рост и развитие растений;

2. определить влияние психротолерантных бактерий на микрофлору прикорневой зоны *Zea mays* и *Secále cereále*;

3. определить влияние психротолерантных бактерий и грибов рода *Trichoderma* на:

- морфо-физиологические параметры *Secále cereále*;
- на содержание пигментов и их соотношение в листьях растений *Secále cereále*.

Работа выполнялась на кафедре водных и наземных экосистем института фундаментальной биологии и биотехнологии под руководством доктора биологических наук, профессора Головановой Т.И.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Взаимодействия почвенных микроорганизмов и растений

Почва представляет собой благоприятную среду для развития ризосферных микроорганизмов. Приблизительные подсчеты показывают, что в 1г почвы содержится 1×10^9 бактерий, 1×10^5 грибов, 1×10^5 актиномицетов, 1×10^3 водорослей. Суммарная масса всех микробных клеток в пахотном слое составляет примерно 6 - 7 т на 1 га. Естественно, такое колоссальное количество живых клеток оказывает многообразное и разностороннее влияние на процессы, происходящие в почве, и на жизнь высших растений [12,13].

Почвенные микроорганизмы могут оказывать большое влияние на растения, эффект от которого может быть благоприятным или вредным для одной или обеих сторон [12,13].

1.1.1 Негативное воздействие микроорганизмов на растения

Микроорганизмы могут оказывать негативное воздействие на растение. Они вызывают различные заболевания у растений, которые приводят к ухудшению роста и к дальнейшей гибели организма [14, 15].

Первое место среди фитопатогенных микробов принадлежит грибам, второе место занимают бактерии и вирусы, и лишь небольшой процент болезней растений вызывают актиномицеты. Растения больше поражаются грибами, чем бактериями. Это связано с более кислой средой тканей растений, которая благоприятствует развитию больше грибов, чем бактерий. Тем не менее, известно довольно много бактериальных болезней растений (бактериозы) [15]. Возбудителями бактериальных заболеваний растений являются бактерии из родов *Erwinia* и *Xanthomonas*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Verticillium*. Наиболее распространенным патогеном грибного происхождения является *Fusarium*. Особой патогенностью отличаются – *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. semitectum*, *F. javanicum*, *F. Heterosporum* [16,17].

Существуют различные источники заражения растений. Одним из важнейших источников заражения являются семена. Попадая внутрь или на поверхность семян, фитопатогенные микроорганизмы находят подходящее место для перезимовки. При прорастании семян они могут заражать всходы, а затем по проводящим сосудам передвигаться в растения и заражать взрослые растения в период вегетации. Больные семена могут служить источником распространения инфекции [15].

Переносить фитопатогенные микроорганизмы может также и вода — поливная, вода рек и других источников [15].

Перенос патогенных бактерий возможен с насекомыми, животными и человеком. Например *Erwinia chrysanthemi* переносится на пчелах, проделывающих ранки на поверхности растений. Человек распространяет возбудителей в процессе своей жизнедеятельности: разносит их на сельскохозяйственных орудиях, обуви, одежде. Распространению патогенов способствует обрезка деревьев, резка клубней перед посадкой, уход за растениями и т.д. [15].

Характер воздействия фитопатогена на растение определяется особенностями его паразита. Паразиты извлекают питательные вещества из растений - хозяев различными способами и по этому признаку делятся на биотрофов, которые получают питательные вещества из живых клеток растений-хозяев, и на некротрофов - питающиеся мертвыми клетками. Особенно токсичными выделениями, убивающими клетки растения-хозяина, отличаются факультативные паразиты, которые могут жить как сапрофиты. Поселяясь на живом растении, они предварительно его убивают. В большинстве случаев такие факультативные паразиты являются мало специализированными [15].

Большинство фитопатогенных микроорганизмов активно синтезируют гидролитические ферменты (пектиназы, целлюлазы, протеазы и др.), вызывающие разрушение растительных тканей и клеточных оболочек, что приводит к проникновению возбудителя болезни внутрь клетки. Особенно

большое значение имеет комплекс пектолитических ферментов. Растворяя пектиновые вещества, они разрушают клеточные стенки и тем самым делают доступными для паразитов содержимое клеток. Проникнув в клетку, фитопатогенные микробы нарушают нормальный ход физиологических процессов, прежде всего фотосинтеза и дыхания. Токсины, выделяемые возбудителем болезни, инактивируют ферменты растительной клетки, и это приводит к её гибели. Способность к синтезу пектолитических ферментов широко распространена среди грибов и бактерий [14,18,19].

Инфекционный процесс при грибных болезнях состоит из следующих этапов:

- прорастание возбудителя на поверхности растения;
- проникновение внутрь растения;
- распространение по растению;
- проявление симптомов поражения у растения;
- переход грибов к спороношению [15].

Гриб попадает на растение или в форме спор или в форме мицелия. Грибы проникают в растение через механические повреждения, естественные ходы - устьица, гидатоды, чечевички, а также через неповрежденную поверхность растений. Через механические повреждения чаще в растения попадают факультативные паразиты – грибы, вызывающие корневые гнили, болезни увядания и др. [15].

На этапе распространения фитопатогенных грибов в растении идет процесс нарастания вегетативного тела гриба за счет питательных веществ, получаемых из клеток растения, увеличивается количество заселенных им клеток [15].

Симптомы поражения появляются тогда, когда нарушение жизнедеятельности клеток, вызываемое грибом, будет видно невооруженным глазом. Например, на органах растений, в которых развивается возбудитель килы капусты или рака картофеля, образуются наросты [15].

С момента начала спороношения пораженное растение становится источником инфекции. Пропагативные споры способны сразу же прорасти, поэтому при определенном запасе инфекционного начала, попадая на другое растение, спора возбуждает новый патологический процесс [15].

Однако, есть немало растений, которые не поражаются той или иной инфекционной болезнью. Устойчивость растений против инфекционных заболеваний называется иммунитетом. Различают иммунитет:

- абсолютный – полная устойчивость к данному заболеванию (например, у пшеницы к пыльной головне овса) и
- относительный – частичная поражаемость растений в зависимости от условий окружающей среды [15].

Существуют различные анатомо-морфологические факторы устойчивости растений к фитопатогенам. Выступы на наружных стенках устьиц препятствуют проникновению в подустьичную щель капель жидкости с клетками патогенных бактерий; способность растения к синтезу раневой перидермы, затягивающей раны; быстрая гибель части клеток растений, сопровождаемая образованием токсических для патогенов веществ [15].

Наряду с анатомо-морфологическими факторами устойчивости растения обладают химическими средствами защиты, связанными с накоплением в клетках тканей различных химических веществ. Например, фитоалексинов - антибиотических веществ, образуемых растением конституционно либо в ответ на инфицирование и подавляющих рост патогенна; на ранних этапах инфицирования - образование в растении пероксидаз, заживляющих раны; образование свободных радикалов с антимикробным действием; накопление в определенных условиях в растении новых продуктов (стрессовых метаболитов), многие из которых токсичны для патогенов; синтез в растении антимикробных токсинов – тионов; образование растением ингибиторов протеиназ патогена [15].

1.1.2 Положительное воздействие микроорганизмов на растения

Доказано, что микроорганизмы снабжают растения биологически-активными веществами: витаминами, некоторыми аминокислотами, ферментами, антибиотиками, ауксинами и др., которые участвуют в дополнительном питании растений. Стимулирующее действие микроорганизмов биологически активными веществами происходит во многих случаях в тот период, когда корневая система мала и фотосинтезирующий аппарат недостаточно развит, т.е. когда молодой проросток использует еще питательные вещества эндосперма и мало зависит от поступления пищи извне. В дальнейшем обогащение корневой зоны этими соединениями происходит за счет деятельности, как растений, так и микроорганизмов [20]. Положительная роль микроорганизмов в корневой зоне растений проявляется в трансформации органических остатков, синтезе гумуса, улучшении минерального питания растений азотом, фосфором и другими элементами, биоконтроле над фитопатогенами и вредителями, продуцировании биологически активных веществ, стимулирующих рост и развитие растений, детоксикации антропогенных загрязнений. В свою очередь растения снабжают почвенные микроорганизмы продуктами фотосинтеза, фитогормонами, другими аллелопатически активными веществами [20]. Это наиболее наглядно подтверждено опытами, проведенными в стерильных условиях, где растения развивались значительно хуже, чем в присутствии микрофлоры. Обнаружено, что процессы превращения поглощенных корнями кукурузы минеральных соединений азота протекали значительно интенсивнее в присутствии микроорганизмов [20].

Микрофлора ризосферы, принимая участие в процессах трансформации органических веществ в почве, обеспечивает растения необходимыми элементами минерального питания и некоторыми биологически активными веществами. Кроме того, микроорганизмы

ризосферы разлагают многие токсичные для растений соединения, обеззараживая почву [14, 15].

Интенсивно протекающие микробиологические процессы трансформации веществ в ризосфере обуславливают накопление в ней водорастворимых элементов минерального питания растений. Выделяемые бактериями угольная и другие минеральные и органические кислоты способствуют растворению и усвоению растениями труднодоступных соединений, таких, как фосфаты кальция, силикаты калия и магния. Синтезируемые микроорганизмами витамины (тиамин, витамин В12, пиридоксин, рибофлавин, пантотеновая кислота и др.) и ростовые вещества (гиббереллин, гетероауксин) оказывают стимулирующее действие на ростовые процессы растений. Многие сапрофитные бактерии ризосферы являются антагонистами фитопатогенных микробов и выполняют роль санитаров в почве [14, 15,57].

Адаптация к условиям внешней среды путем симбиотических взаимодействий с микроорганизмами является одним из фундаментальных свойств высших растений. Обладая способностью полностью обеспечивать себя углеродом и энергией, получаемыми в процессе фотосинтеза, большинство растений испытывает недостаток во многих других элементах минерального питания, в первую очередь – в азоте и фосфоре. Поэтому симбиозы с микроорганизмами, фиксирующими азот (ризобии, актиномицеты, цианобактерии, эндофитные и ризосферные бактерии) или оптимизирующими получение питательных веществ из почвы (микоризные грибы), характерны для подавляющего большинства растений [14, 21, 22]. Примером такого взаимоотношения микроорганизмов с растениями служит симбиоз между клубеньковыми бактериями и бобовыми культурами, при котором растения получают значительную часть необходимых питательных веществ от микроорганизмов. В этом случае можно говорить о симбиотрофизме, т. е. о благоприятном взаимодействии микроорганизмов и растений, между которыми возникли симбиотические отношения. Ещё не так

давно большое значение придавалось истинному симбиозу между бактериями и растениями. В настоящее время известно, что для питания очень важны любые взаимоотношения между растениями и микроорганизмами [14, 23, 24].

Часто встречается микоризообразование – симбиоз мицелия гриба с корнем высшего растения. Микоризу образует большинство растений (за исключением водных), как древесных, так и травянистых (особенно многолетних). Травянистые растения вступают в микоризный симбиоз с микроскопическими грибами в основном из класса несовершенных грибов (*Deuteromycetes*), отчасти из класса зигомицетов (*Zygomycetes*) с мицелием, лишенным перегородок (неклеточным) и отчасти из класса сумчатых грибов (*Ascomycetes*). Грибы родов элафомицес (*Elaphomyces*) и трюфель (*Tuber*) образуют микоризу с букком, дубом и другими деревьями [14, 25, 27].

Многие растения поддерживают в своих тканях или на поверхности микроорганизмы, которые защищают его от фитофагов благодаря синтезу токсинов, подавляющие развитие патогенов. К аналогичным выводам привело изучение регуляции растениями арбускулярной микоризы. При ее развитии в эпидермисе и кортексе корня индуцируется синтез фенолов, пероксидаз, глюканаз, хитиназ, каллозы и других веществ, используемых растениями для защиты от фитопатогенов. В случае микоризы эти реакции гораздо менее интенсивны и более дифференцированы в пространстве и во времени, чем при патогенном процессе, что связано с регуляцией защитных реакций растения сигналами симбионта-мутуалиста [21, 27]. Такие свойства были обнаружены различными авторами [11,16,27]. У свободноживущих, ассоциативных и симбиотрофных азотфиксаторов, некоторых фосфатмобилизирующих бактерий и актиномицетов. Все они были выделены из ризосферы овощных, злаковых и технических культур, произраставших на разных типах почвы.

Разновидностью положительного взаимоотношения растений и микроорганизмов является ассоциативность. Ассоциативные бактерии

потребляют эксудаты растений, но в результате формирования ассоциативного взаимодействия, эти бактерии могут способствовать стимулированию роста, снабжению растений азотом и даже оказывать фитосанитарный и другие положительные эффекты на растения. Известно, что ассоциативные бактерии весьма активно проникают в органы высших растений (корни, листья, стебли). Это воздействие приводит к общему результату: ускоренному росту растений, повышение иммунитета, способности и устойчивости к стрессам. Следовательно, ассоциативные бактерии образуют с высшими растениями ассоциацию с положительным взаимодействием партнеров [29, 30, 31,55].

Бактерии корневой зоны, осуществляющие эти взаимоотношения, объединены под общим названием «способствующие росту растений ризобактерии» — Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) [14, 32].

Действие PGPR на растение может быть прямым и опосредованным. Прямое действие состоит в следующем:

- обеспечении элементами минерального питания за счёт фиксации атмосферного азота диазотрофами, солюбилизации фосфора фосфатмобилизирующими бактериями;
- хелатировании микроэлементов (в основном железа) бактериальными сидерофорами, вследствие чего ионы металлов становятся более доступными корням растения;
- регулировании роста и развития растений бактериальными метаболитами фитогормональной природы.

Непрямое воздействие PGPR на растение состоит

- в угнетении развития фитопатогенов;
- синтезе антибиотических веществ;
- продуцировании ферментов, лизирующих клеточную оболочку фитопатогенов;
- конкуренции с последними за источник питания и заселение корней,
- индукции у растений резистентности к заболеваниям [14, 32, 33].

PGPR были обнаружены в семействах Azotobacteriaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhodospirillaceae и многих других [29].

В процессе взаимодействия ассоциативных бактерий с растениями выделяют такие основные этапы, как хемотаксис и прикрепление бактерий к корням, колонизация поверхности и, в ряде случаев, внутренних тканей подземных органов растений. Родоначальниками эндофитных сообществ могут стать бактерии, выходящие из кортекса корня в проводящую систему растения и заселяющие затем стебель, листья и другие органы растений, а также микробы - колонизаторы филлосферы и спермосферы [29, 34].

Многие PGPR способны осуществлять ассимиляторное и диссимиляторное восстановление нитрата, приводящее к образованию нитрита, при дальнейшей редукции которого образуются газообразные продукты. Ассоциативные бактерии, являются продуцентами ауксинов, цитокининов и гиббереллинов и они могут влиять на содержание этих гормонов в разных органах растений. Штаммы PGPR способствуют удлинению у растений главного корня, развитию придаточных корней и увеличению количества корневых волосков.

Таким образом, ассоциативные бактерии способны оказывать воздействие на рост и развитие растений [29,34].

Наряду с ассоциативными взаимоотношениями между растением и микроорганизмами, существуют и симбиотические отношения. Эта форма взаимоотношений, при которых бактерии могут находиться с растениями в синтрофных связях и, являясь взаимными партнерами, способствуют развитию друг друга [29,34].

Различие в том, что при симбиозе бактерии колонизируют ткани растений и те образуют специализированные структуры (например, клубеньки), без которых бактерии не могут осуществлять метаболическую функцию, то при ассоциативных взаимоотношениях бактерии не образуют специализированных структур в растениях. В данном случае сами микроорганизмы формируют специфические бактериальные объединения, а в

ряде случаев и структуры, с помощью которых они прикрепляются к поверхности листьев или корней, или проникают во внутренние ткани. Поэтому, видимо, почти каждый орган растения является эконической для ассоциативных бактерий (ризосфера, ризоплана, филлосфера и филлоплана). Микроорганизмы могут благотворно влиять на растения вследствие конкуренции, антагонизма или паразитизма в отношении патогенных бактерий и грибов. Помогает им в этом способность к продукции широкого спектра антимикробных веществ, среди которых: циклические липопептиды и иные сурфактанты, бактериоцины, феназины, цианид, пиолитеорин и др. [21,29,34].

Эти функции могли быть преобразованы для защиты растений от патогенов, а также для взаимодействия с более молодыми симбионтами-мутуалистами. Об этом говорит, например, наличие ряда общих факторов, регулирующих развитие арбускулярной микоризы и клубеньков. Наличие у растений единой системы контроля над развитием различных форм симбиоза является основой для разработки методов биоконтроля патогенов, осуществляемого при использовании микробных препаратов [21].

1.1.3 Взаимодействие растений с микроорганизмами-антагонистами патогенов

Еще одним видом защиты от фитопатогенов, является микробный антагонизм. В естественных условиях обитания микробы находятся в ассоциациях – сложных сообществах, состоящих из разнообразных видов бактерий, грибов, актиномицетов, простейших и других микроорганизмов. В процессе эволюционного развития между определенными видами и группами микроорганизмов и другими живыми существами установились сложные взаимоотношения. Например, взаимоотношение микроорганизмов, при котором один штамм полностью подавляет или замедляет рост другого [14,34].

Проявления микробного антагонизма разнообразны и включают различные типы воздействия одного организма на другой:

- образование и выделение микробами-антагонистами метаболитических продуктов, ингибирующих размножение некоторых микроорганизмов. К таким продуктам относятся органические кислоты, изменяющие рН среды, антибиотики, бактериоцины.

- влияние неспецифических продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, которые приводят субстрат в состояние, непригодное для развития других представителей микрофлоры;

- паразитизм - существование одного микроорганизма, получающего эту возможность за счет другого [14,34,35].

Под влиянием антагонистов у патогенов изменяются форма и величина колоний и клеток либо нарушаются процессы роста, развития, размножения; у грибов часто наблюдаются распад гиф на отдельные членики, лизис мицелия, дегенерация гаусториев. Нарушаются также процессы питания и синтез жизненно важных соединений, дыхание, деятельность ферментных систем и др. функции; бактерии не окрашиваются по Граму. Воздействие антагонистов может привести к изменениям наследственных свойств, мутациям [11,36].

1.1.3.1 Влияние грибов рода *Trichoderma* на рост и развитие растений

В настоящее время широкое применение и большой научный интерес представляют грибы рода *Trichoderma* [3,4,9,34,36].

Виды *Trichoderma* играют важную роль в формировании микробиоценозов почвы и характеризуются высокой приживаемостью и конкурентноспособностью в экологической нише [35, 8, 9, 5, 11, 37].

Грибы рода *Trichoderma*, искусственно внесенные в почву, входят в сложные взаимоотношения с автохтонной микрофлорой. Известно несколько вариантов взаимодействия *Trichoderma* с представителями почвенной микрофлоры:

- угнетение - когда *Trichoderma* задерживает рост микроорганизмов;
- стимуляция - когда присутствие *Trichoderma* благоприятствует развитию других микроорганизмов;
- нейтральность - когда почвенные микроорганизмы относятся безразлично к присутствию *Trichoderma*.

Имеются данные, в которых показано, что изоляты *Trichoderma* ограничивают линейный рост всех патогенов.

Грибы рода *Trichoderma* обладают тремя формами антагонизма:

- способностью быстро осваивать субстрат, вытесняя медленно растущие организмы;
- гиперпаразитической активностью;
- способностью продуцировать антибиотические вещества [37].

Они способны паразитировать на широком круге патогенных и сапрофитных грибов [37].

В процессе своей жизнедеятельности грибы рода *Trichoderma* способны продуцировать широкий спектр токсических веществ, обладающих антибиотическими свойствами: триховиридин, U-21693, дермадин, виридин, глиотоксин, циклоспорины А и С, алламетицин, соцукаллин, алламецин, трихополины А и В, обладающие антигрибными и антибактериальными свойствами. В основе их действия лежит механизм вмешательства в биосинтез белка или хитина, происходящие в клетках фитопатогенов. Многие из антибиотиков охарактеризованы по спектру действия и химическому составу, причем для некоторых из них отмечено отсутствие видовой специфики. Кроме вышеуказанных биологически активных соединений грибы рода *Trichoderma* способны продуцировать в окружающую среду летучие органические вещества, обладающие антибиотическими и стимулирующими свойствами, которые проявляются избирательно, в зависимости от характера тест-организма, свойств среды, возраста продуцента. Активными компонентами летучих выделений являются ацетальдегид, этанол, ацетон, лактон, этилен, терпеновые дериваты

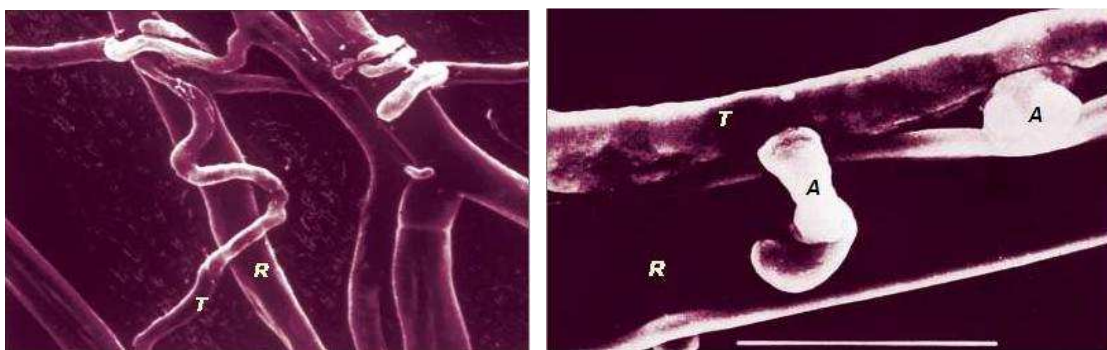
и иногда дериваты альфа-пирана. Эти вещества обладают споростатической активностью, угнетают рост фитопатогенных грибов и актиномицетов, когда прямой контакт мицелия отсутствует, большое практическое значение имеет стимулирующее влияние летучих продуктов *Trichoderma* на дрожжевые организмы [37].

Грибы рода *Trichoderma* обладают паразитическими свойствами. Микопаразитизм является одним из наиболее важных механизмом действия грибов рода *Trichoderma* на патогены (рис. 1) [38].

Данный процесс состоит из нескольких стадий:

- узнавание хозяина,
- нападение,
- последующее проникновение и уничтожение патогена.

В момент соприкосновения *Trichoderma* с гифами патогена, гифы *Trichoderma* начинают образовывать боковые ответвления, которые спиралевидно обвивают гифу патогена. Многие короткие боковые отростки заканчиваются аппрессориями, которые плотно присасываются к гифам патогена [38]. Этот процесс усиливается, гифа патогена опутывается гифами *Trichoderma*. Во время этого процесса *Trichoderma* синтезирует ферменты, разрушающие клеточную стенку гриба-хозяина. В местах нахождения аппрессорий имеются отверстия через которые осуществляется проникновение гиф *Trichoderma* в полость гриба-мишени [38].



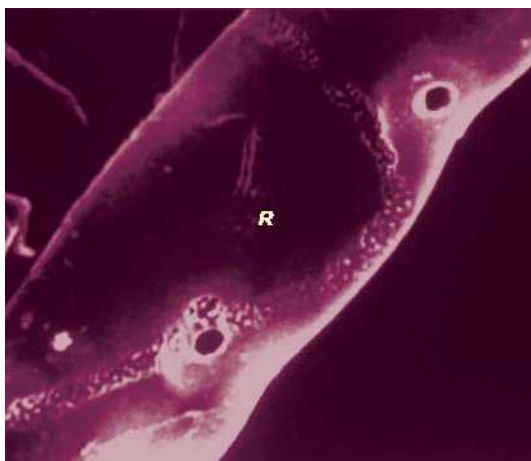


Рисунок 1 – Микопаразитизм грибов рода *Trichoderma*:

R – гифы патогенного гриба *Rhizoctonia solani*; T – *Trichoderma* spp.;

A – аппрессории (G. Harman et al, 2004).

Преобладающим типом взаимоотношений *Trichoderma* с растениями является его стимулирующее влияние, которое зависит от вида организма-эдификатора и инфицированности его возбудителями заболеваний. Виды грибов рода *Trichoderma* способны синтезировать вещества, стимулирующие рост растений. В серии экспериментов доказана стимуляция роста как нативных растений, так и каллусных культур разных видов злаковых и хвойных растений благодаря синтезу ауксинов [4,3,9,10].

Инокуляция семян растений спорами *Trichoderma* приводит к увеличению всхожести, что связано с взаимодействием грибов с корнями растений и использованием растениями метаболитов, выделяемых грибами [4,11,35,56].

Грибы рода *Trichoderma* влияют на длину надземной и корневой систем растений. Это дает большое преимущество для растений, так как мощное развитие корневой системы благоприятствует поступлению минеральных веществ в растение. *Trichoderma* способствует накоплению биомассы растений, что свидетельствует об их влиянии на продуктивность растительного организма. *Trichoderma* увеличивает общее содержание зеленых пигментов в листьях C₄ – растений [11].

1.1.3.2 Влияние психротолерантных бактерий на растения

В последнее десятилетие в мире наблюдается растущий интерес к использованию психротолерантных микроорганизмов в биотехнологии. Исследования показали, что карстовые пещеры Средней Сибири являются уникальным природным источником психрофильных и психротолерантных микроорганизмов. Среди них встречаются перспективные микроорганизмы для использования в сельскохозяйственной биотехнологии в качестве безопасных для теплокровных животных и способные к функционированию в низкотемпературных условиях в начале вегетационного периода биофунгицидов [28,39,40,41].

Микроорганизмы, входящие в состав существующих биопрепаратов, не всегда оказываются жизнеспособными в природных условиях, особенно в начале вегетационного периода. В этот период температура находится ниже оптимума мезофильных штаммов, поэтому активация их происходит поздно, когда местная фитопатогенная микобиота уже в значительной степени поражает молодые проростки. В этой связи следует ожидать, что психротолерантные штаммы в начале вегетационного периода будут получать дополнительное конкурентное преимущество над фитопатогенами, благодаря своему пониженному температурному оптимуму. Кроме того, благодаря своим температурным пределам роста, они безопасны для человека и теплокровных животных, поскольку не могут развиваться при температуре человеческого тела [28].

Среди выделенных в пещерах психротолерантных бактерий и грибов обнаружена высокая встречаемость изолятов, подавляющие развитие фитопатогенных грибов р. *Bipolaris*, являющихся одними из наиболее распространённых и вредоносных возбудителей заболеваний зерновых, а также фитопатогенных грибов р. *Fusarium*. По частоте встречаемости антагонистов пещерные сообщества статистически достоверно ($p < 0,01$) превосходят сообщества почв региона, и даже

превосходят по этому показателю к микробным сообществам почвоподобных субстратов, получаемых в результате биоконверсии соломы и характеризующихся высокой антифунгальной активностью [42].

Бактеризация семян комбинированным культуральным фильтратом привела к статистически значимому снижению интенсивности болезни на основании стебля и вторичных корнях [28,42].

Штаммы психротолерантных микроорганизмов оказывают влияние на интенсивность и распространенность корневой гнили и листовой пятнистости пшеницы на стадиях кущения и колошения [28,42,43].

1.2 Биологическая защита растений

Микробиопрепараты являются важнейшими средствами защиты растений от вредителей и болезней в органическом (биологическом, экологическом) земледелии. Главной особенностью этих средств защиты является их безвредность для человека, окружающей среды, домашних и диких животных, насекомых (опылителей, энтомофагов) и других представителей биоценоза [7].

Биологические фунгициды (антибиотики) - биологически активные вещества органического происхождения, подавляющие жизнеспособность или вызывающие гибель микроорганизмов. Они продуцируются микроорганизмами (бактериями, актиномицетами, грибами), а также растениями (фитонциды) и животными. Обладают избирательным действием на микроорганизмы. Биологические фунгициды применяют для борьбы с болезнями растений. Проникая в корни и листья, они распространяются по тканям растений и передают им антибиотическую активность. В тканях находятся в неизменном виде или превращаются в более активные вещества, которые воздействуют на обмен веществ растений, повышая их устойчивость к патогенным микроорганизмам. Было показано, что микробные препараты оказывают положительное влияние на морфологические показатели исследуемых растений, на накопление белков, углеводов и пигментов.

Биологические фунгициды также могут повышать всхожесть семян, ускорять рост растений, стимулировать образование корней [2,35].

В настоящее время во всем мире выпускается различные виды микробиологических средств защиты растений [14,15,44,45].

По принципу действия выделяют следующие группы препаратов:

- Препараты микроорганизмов-антагонистов, ограничивающих распространение вредителей и болезней. Например, бактерии рода *Pseudomonas*, на основе которых созданы препараты ризоплан, псевдобактерин, за счет быстро усваивают ионы железа, превращая их в сидерофоры, недоступные для других микроорганизмов [15].

- Препараты гиперпаразитов или паразитов II-го порядка: Например, пикнидиальный гриб *Cicinobolus cesati* паразитирует на возбудителях мучнистой росы, бактерии рода *Pseudomonas* - на фузариозных грибах. Пентафаг - препарат пяти бактериофагов – гиперпаразитов фитопатогенных бактерий [15].

- Препараты антибиотиков, токсикантов и антифидантов, продукты метаболизма микроорганизмов, ингибирующие жизнедеятельность других микробов, обладающие нейротоксическим или репеллентным действием. Примеры: агравертин, фитоверм, трихотецин, фитофлавин и др. [15].

Обогащать почвы микробами-антагонистами можно внесением специальных биопрепаратов, представляющих собой чистую их культуру или компост, насыщенный этими микроорганизмами. Для искусственного размножения микробов-антагонистов используют твердые и жидкие питательные среды. В производственных условиях широко применяют препарат триходермин, изготавливаемый на основе почвенного гриба-антагониста *Trichoderma lignorum*. При обогащении почвы культурой этого гриба подавляется развитие возбудителей корневых гнилей зерновых культур, вилта хлопчатника, ризоктониоза картофеля и др. *Trichoderma lignorum* выделяет ряд активных антибиотиков (гликотоксин, виридини др.),

вследствие чего обладает широким спектром антагонистического действия [15].

Микроорганизмы-антагонисты применяют разными способами: прямое внесение в почву, внесение в составе компостов, опудривание или дражирование семян, опрыскивание растений. В защищенном грунте используют прямое внесение в почву [15].

В природных условиях выявлены микроорганизмы (бактерии, грибы и др.), способные паразитировать на фитопатогенах. Они получили название гиперпаразиты, сверхпаразиты или паразиты второго порядка. Механизм действия гиперпаразитов различен. Они могут вызывать лизис, или растворение, клеток хозяина, продуцировать биологически активные вещества, подавляющие патогены. В этом случае гиперпаразиты проявляют такие же свойства, как и антагонисты. Вообще, между гиперпаразитизмом и антагонизмом нет четкой разницы, так как антагонист нередко ведет себя как паразит второго порядка. Например, *Trichoderma lignorum* выделяет ряд активных антибиотиков (глитоксин, виридин и др.), вследствие чего обладает широким спектром антагонистического действия. Кроме того, *Trichoderma lignorum* может паразитировать на склероциях некоторых патогенных грибов, т. е. проявляет свойства гиперпаразита [15].

В борьбе с возбудителями болезней оказались весьма эффективными антибиотики. Их можно применять в очень малом количестве, безвредном для растений, животных и человека [15].

Основные требования, предъявляемые к используемым в борьбе с фитопатогенными организмами антибиотикам:

- активность в отношении возбудителя заболевания;
- способность легко проникать в ткани растений;
- сохранение биологического эффекта внутри тканей растения и в течение определенного промежутка времени;
- безвредность в лечебных дозах для растений [15].

Наиболее распространенные методы применения антибиотиков: обработка семян и посадочного материала, опрыскивание растений, внесение в почву. Все приемы использования антибиотиков основаны на том, что препарат, нанесенный на поверхность семян, листьев, стебля (ствола) или внесенный в почву, угнетает рост или убивает фитопатогенные организмы, которые находятся на поверхности или внутри тканей растения. Антибиотики поглощаются корнями, листьями, стеблями и довольно быстро распространяются по растению. В тканях растения они сохраняются сравнительно долго – до 20-30 дней. Некоторые антибиотики обладают системным иммунизирующим воздействием на растение, значительно повышая его устойчивость к болезням. Кроме того, эти вещества не только предупреждают развитие болезни, но и лечат растения [15].

ГЛАВА 2 ОБЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали растения кукурузы гибрид "Кубанский сахарный 210" (производитель семян фирма "Евросемена"), растения озимая рожь (производитель семян фирма "Семена для Сибири"), психротолерантные бактерии штаммов ВДР5м и УОЗК2 из карстовых пещер Красноярска и микромицеты *Trichoderma asperellum*.

Эксперимент производился по следующей схеме:

контроль - растения, семена которых не обработаны микроорганизмами;

опыт 1 - растения, семена которых подверглись обработке спорами гриба рода *Trichoderma* (титр – 10^8 КОЕ/мл);

опыт 2 - растения, семена которых подверглись обработке психротолерантными бактериями штамма ВДР5м (титр – 10^5 КОЕ/мл);

опыт 3 – растения, семена которых подверглись обработке психротолерантными бактериями штамма УОЗК2 (титр – 10^5 КОЕ/мл).

2.1.1 Описание растений кукурузы

Кукуруза сахарная – *Zea mays Linnaeus* по систематическому положению относится к:

Отделу покрытосеменных – *Magnoliophyta*

Классу однодольных – *Liliopsida*

Подклассу лилиидных – *Lilidae*

Порядку злакоцветных – *Poales*

Семейству злаковых – *Poaceae*

Роду кукуруза – *Zea* [46].

Кукуруза относится к C_4 -типу растений, к NADP-МДГ подгруппе. Это высокорослое однолетнее травянистое растение, достигающее высоты 3 м и более. Кукуруза имеет хорошо развитую мочковатую корневую систему, проникающую на глубину 100—150 см. На нижних узлах стебля могут

образовываться воздушные опорные корни, предохраняющие стебель от падения и снабжающие растение водой и питательными веществами [47].

Стебель прямостоячий до 4 м в высоту и 7 см в диаметре, без полости внутри (в отличие от большинства других злаков). Листья крупные, линейно-ланцетные, до 10 см шириной и метр длиной. Их число от 8 до 42. Растения однодомные с однополыми цветками: мужские собраны в крупные метёлки на верхушках побегов, женские — в початки, расположенные в пазухах листьев. На каждом растении обычно 1—2 початка, редко больше. Длина початка от 4 до 50 см, диаметр от 2 до 10 см, масса от 30 до 500 граммов. Початки плотно окружены листообразными обвёртками. Наружу на верхушке такой обвёртки выходит только пучок длинных пестичных столбиков. Ветер переносит на их рыльца пыльцу из мужских цветков, происходит оплодотворение, и на початке развиваются крупные плоды-зерновки [47].

Форма зерновок кукурузы кубические или округлые, плотно прижаты друг к другу и расположены на стержне початка вертикальными рядами. В одном початке может быть до 1000 зерновок. Размеры, форма и окраска зерновок различаются у разных сортов; обычно зерновки жёлтого цвета, но бывает кукуруза с красноватыми, фиолетовыми, синими и даже почти чёрными зерновками

Вегетационный период длится приблизительно 90—150 суток. Всходит кукуруза на 10—12 сутки после посева. Кукуруза является теплолюбивым растением. Оптимальная температура для её выращивания — 20—24 °С. Кроме того, кукуруза нуждается в хорошем солнечном освещении.

В качестве объекта исследований использовали семена кукурузы сорта "Кубанский сахарный 210" фирмы "Евросемена".

Характеристика сорта:

Раннеспелый гибрид. Растение высотой 180 – 200 см. Образует слабokonические початки до 20 см длиной, массой 230 г, с 10 рядами зерен. Зерна желто-оранжевые, с нежной кожицей.

2.1.2 Описание растений ржи

По систематическому положению рожь относится к:

Отделу Цветковые *Magnoliophyta*

Классу Однодольные *Liliopsida*

Порядку Злакоцветные *Poales*

Семейству Злаки *Gramíneae*

Роду Рожь *Secále* [53]

Рожь имеет мочковатую корневую систему, проникающую на глубину до 1—2 м, поэтому она хорошо переносит лёгкие песчаные почвы, а благодаря высокой физиологической активности быстро усваивает из почвы полезные вещества из труднорастворимых соединений. Узел кущения у ржи формируется на немного меньшей глубине от поверхности почвы (1,7—2 см), чем пшеницы (2—3 см). Когда зерно помещается в почву глубоко, рожь закладывает два узла кущения: первый — глубоко, а позже второй — ближе к поверхности почвы, который становится главным. Интенсивность кущения у ржи высока — каждое растение формирует 4—8 побегов, а при благоприятных условиях — до 50—90 [47].

Стебель у ржи полый, с пятью—шестью (реже тремя или семью) междоузлиями, прямой, голый или лишь под колосьями опушённый. Высота стебля в зависимости от условий выращивания и сорта колеблется от 70 до 180—200 см (в среднем 80—100 см) [47].

Листья широколинейные, плоские, вместе со стеблем сизые. Длина листовой пластинки — 15—30 см, ширина 1,5—2,5 см. В основании пластинки размещается короткий язычок и короткие голые или опушённые ушки (auriculate), охватывающие стебель. Листовая пластинка с верхней стороны иногда покрыта волосками, что указывает на сравнительную устойчивость к недостатку влаги и приспособленность к лёгким песчаным грунтам. Язычок и ушки у листьев ржи рано засыхают и опадают [47].

Стебель несёт на верхушке соцветие — один удлинённый, немного поникающий сложный колос; под колосом стебель немного волосистый.

Колос неломкий, с крепкой, не разламывающейся на членики осью, 5—15 см длиной и 0,7—1,2 см шириной, состоит из клетчатого, почти четырёхгранного стержня и плоских колосков, сидящих на выступах стержня и обращённых к нему плоской стороной [47].

Зерновка продолговатая, немного сжатая с боков, с глубокой бороздкой с внутренней стороны посередине; после созревания она вываливается из колоска. Зерно ржи различается по размеру, форме и окраске. Длина его 5—10 мм, ширина 1,5—3,5 мм, толщина 1,5-3 мм. Масса 1000 зёрен у диплоидной ржи — 20—35 г, тетраплоидной — 50—55 г. Форма зёрен удлинённая (с соотношением длины к ширине более 3,3) или овальная (с соотношением длины к ширине 3,3 и менее) с заметной поперечной морщинистостью на поверхности. По окраске различают зерно белое, зеленоватое, серое, жёлтое, тёмно-коричневое [47].

При одинаковых условиях всходы ржи появляются быстрее на 1—2 дня. На 1—2 дня быстрее она начинает и кущение. Узел кущения закладывается ближе к поверхности грунта (1,7—2,5 см), чаще встречаются двух- и трёхузловые растения. Кущение у ржи происходит в основном осенью. Весной она начинает выход в трубку через 18—20 дней от начала весеннего отрастания, а через 40—50 дней колосится. Цветение наступает через 7—12 дней от начала колошения (у пшеницы через 4—5 дней) и продолжается 7—9 дней. Фаза молочной спелости наступает за 10—14 дней после цветения и продолжается 8—10 дней. Через 2 месяца после колошения рожь созревает. Послеуборочное созревание проходит дольше, поэтому рожь реже прорастает в колосе. Масса 1000 зёрен у диплоидных сортов — 23—38 г, а у тетраплоидных — 35—62 г. [47].

К условиям выращивания, в особенности к почвам, рожь менее требовательна. У неё хорошо развита корневая система, которая проникает на глубину от 1,5 до 2 метров и способна усваивать фосфор и калий из труднорастворимых соединений. Рожь в меньшей степени чувствительна к кислотности почвы. Хорошо растёт при pH 5,3—6,5. Поэтому её можно

выращивать на малопригодных для пшеницы подзолистых почвах. Но лучшими являются плодородные структурные чернозёмы и серые лесные почвы среднего и лёгкого суглинистого механического состава. Плохо растёт на тяжёлых глинах, заболоченных, засоленных почвах [13].

Рожь более зимостойкая, чем другие озимые хлеба. Выдерживает снижение температуры на уровне узла кущения до минус 19—21 °С. Семена начинают прорасти при 0,5—2 °С. Заканчивает вегетацию осенью и возобновляет весной при 3—4 °С.

В качестве объекта исследований использовали семена озимой ржи сорта *Secale cereale* L. фирмы "Семена для Сибири".

Характеристика сорта:

Озимая рожь — самая древняя фитосанитарная культура и замечательный сидерат. За короткое время она создает большой объем зеленой массы и корней. Корневая система ржи хорошо развита, она проникает на глубину 1,5 — 2 м и способна усваивать фосфор и калий из труднодоступных соединений. Важным является то, что корни ржи выделяют фитонцидные вещества, которые подавляют прорастание других семян. Семена ржи начинают прорасти уже при 0,5-2⁰С. Кроме того, растение быстро кустится и, захватывая ресурсы света и влаги, не позволяет развиваться сорнякам.

2.1.3 Описание грибов рода *Trichoderma*

Грибы рода *Trichoderma* в большом количестве встречаются в почвах тайги, целинных, лесных и лесолуговой зоны, т.е. в почвах, богатых органическими остатками. Особенно хорошо растут в кислых почвах (рН 3,7-5,2) [37,48,49].

Грибы имеют бесцветный или светлый мицелий, образующий белые, желтые или темно-зеленые колонии. Конидии одноклеточные, шаровидные или эллипсоидные, светлые или бесцветные, часто скученные в небольшие головки (рис. 2) [48,49].



Рисунок 2 – *Trichoderma asperellum*.

1,2. Пустулы. 3. Конидиефоры. 4. Конидии. 5. Фиалиды. [37].

Споры прорастают в условиях оптимальной влагообеспеченности субстрата (70-100 %). Оптимальной для развития является температура 24 - 35°C, в зависимости от штамма. Также есть холодоустойчивые представители (температура 10 °C) [48,49].

Trichoderma выделяет различные метаболиты: факторы роста (ауксины, цитокины и этилен), органические кислоты, внутриклеточные аминокислоты, витамины и свыше 100 антибиотиков. Фитогормоны *Trichoderma* (цитокинины), отвечающие за стимуляцию физиологических процессов растений, поступают в растительный организм и приводят к более активному его развитию.

Использовали споры грибов *Trichoderma asperellum* штамм МГ-97. Ниже представлено описание данных грибов по Александровой А.В. [37].

Колонии на стандартной среде Чапека, при температуре 22 °C растут быстро, достигая краев чашки Петри за 4-5 дней. Мицелий бесцветный, стелющийся, паутинистый. Спороношение появляется на 4-6 день роста в виде выпуклых или плоских сливающихся подушечек разной формы и

величины, диаметром от 1 до 6 мм, расположенных равномерно, или концентрическими зонами, и в воздушном мицелии. Цвет от зеленого до темно-зеленого. Обратная сторона колонии бесцветная или слабо-желтоватая. Пигмент в среду не выделяется. Экссудат обычно отсутствует. Запах слабый, невнятный. Гифы бесцветные, гладкие 2-4 мкм в диаметре. Погруженный мицелий более толстый до 8 мкм шириной, с вздутиями и толстостенными клетками. Хламидоспоры обычно есть, обильные, терминальные или интеркалярные округлые, грушевидные до овальных, гладкостенные, светло-зеленые 8-15 мкм в диаметре [37].

Конидиеносцы древовидно разветвленные, фиалиды бутылевидные прямые, конидии округлые или яйцевидные 3,7 – 6,0×3,0 – 5,2 мкм бородавчатые. От остальных видов рода *Trichoderma* этот вид отличается крупными округлыми конидиями. Ветвление конидиеносцев частое, через более-менее, равные интервалы, веточки расположены по две-три, редко по одной, прямые. Длина ветвей сокращается по направлению от основания к вершине. Фиалиды расположены чаще на веточках мутовками по 2-5, реже по одиночке. Бутылевидные, ампуловидные или слегка вздутые в середине 7 – 10×3 – 4,5 мкм, терминальные немного длиннее до 12 мкм. Шейка вытянутая узкая, короткая, прямая, 0,5 – 1,5 мкм в длину. Конидии зеленые, собраны в слизистые головки, округлые или слегка вытянутые, крупные 4 – 6×3 – 5,5 мкм, бородавчатые. Орнаментация слабо заметна под световым микроскопом [37].

2.1.4 Описание психротолерантных микроорганизмов

Психротолеранты - организмы, способные к росту и размножению при низких температурах в пределах от -20 до +10 градусах цельсия. Психротолеранты являются истинными экстремофилами, так как способны адаптироваться не только к низким температурам, но и к другим экологическим ограничениям, такими как: высокая / низкая солености и pH, бескислородное окружения, а также повышенное воздействия УФ -

излучения вблизи северного и южного полюсов Земли. Кроме того, различия между мезофилами и психрофилами заключается в отсутствии подавления синтеза белка, в поддержании и наличии холодной акклиматизации [28,39,41].

Так как большая часть нашей планетарной поверхности поддерживает температуру ниже 15 градусов Цельсия, психротолеранты вездесущи на Земле. Они присутствуют в альпийских и арктических почвах, глубоких океанических водах, в полярных льдах, ледниках и снежниках [28,39,41].

Психротолеранты используют широкий спектр метаболических путей, в том числе фотосинтез, гетеротрофия и хемоавтотрофия, они образуют устойчивые и разнообразные общины. Психротолеранты характеризуются наличием в их клетках липидных мембран, химически стойких к ужесточению при температурах ниже точки замерзания воды. Многие считают, что такая холодная адаптация связана с активностью-гибкостью, полагая, что психротолерантные ферменты повышают гибкость их структуры, чтобы компенсировать "замораживание эффекта" холодных мест обитания. Примерами являются *Arthrobacter* зр., *Psychrobacter* зр. и штаммы родов *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Hyphomonas* и *Sphingomonas* [28,39,41].

Объектами исследования служили 2 штамма психротолерантных бактерий УОЗК2, выделенный к.б.н., доцентом Ланкиной Е.П. из карстовой известняковой пещеры Женевская и штамм ВДР5м, найденный в пещере Водораздельная. Штаммы предоставлены доктором биологических наук, профессором Хижняком С.В. из КрасГАУ.

Штамм УОЗК2, выделен из карстовой известняковой пещеры Женевская. По результатам секвенирования гена 16S рРНК – 99.1 процент уровень сходства с *Sporosarcina globispora*. Культуральные особенности: форма колонии круглая с фестончатым краем, профиль – слегка выпуклый, край – слабо фестончатый, размер – средний, поверхность – гладкая, цвет – пастельный, оптические свойства – непрозрачная, глянцевая, структура –

неоднородная, концентрически исчерченная, консистенция – пастообразная (рис. 3) [50].



Рисунок 3 – Колония изолята УОЗК2 на ПД-агаре (фото Ланкиной Е.П.,2012)

Морфологические особенности штамма: относительно крупные спорообразующие палочки, прямые и слабо изогнутые; одиночные или в парах; спора – круглая, терминальная или субтерминальная; диаметр споры, как правило, не превышает диаметра клетки (рис. 4) [50].

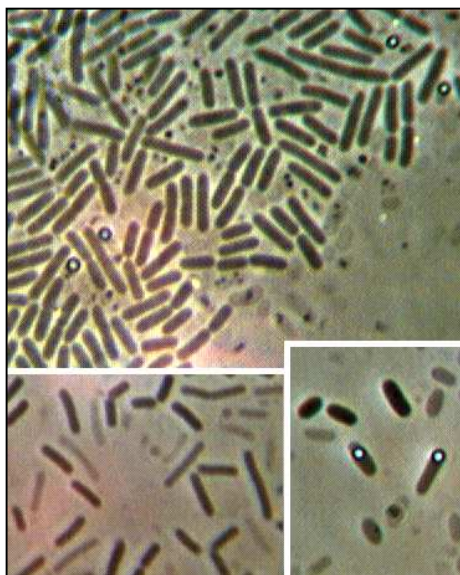


Рисунок 4 – Морфология клеток штамма УОЗК2 (вегетативные клетки и клетки со спорами), 24-часовая культура на ПД-агаре, объектив x100, фазовый контраст, масляная иммерсия (фото Ланкиной Е.П.,2012)

Изолят растёт в диапазоне температур от плюс 4 до плюс 26°C (верхний температурный предел роста), что позволяет отнести его к психротолерантным, близким к психрофильным, представителям аллохтонной микробиоты пещеры [50].

Штамм ВДР5м выделен к.б.н., доцентом Ланкиной Е.П. из карстовой известняковой пещеры Водораздельная. Культуральные особенности: колонии мелкие, форма колонии круглая, край - волнистый, гладкий, размер – средний, поверхность – гладкая, цвет – светло-серый, оптические свойства – непрозрачная, глянцевая, структура – однородная, консистенция – сметанообразная, маслянистая, профиль колонии слегка выпуклый (рис.5) [50].



Рисунок 5 – Колония изолята ВДР5м на ПД-агаре (фото Ланкиной Е.П.,2012)

Морфологические особенности штамма: короткие прямые или слегка изогнутые палочки неправильной формы. Клетки одиночные или в парах (рис. 6).



Рисунок 6 – Морфология клеток изолята ВДР5м, 24-часовая культура, объектив x100, фазовый контраст, масляная иммерсия, температура +20+22°C, ПД-агар (фото Ланкиной Е.П.2012)

Хорошо растёт в диапазоне +4°C..+22°C, максимальная температура роста составляет +23°C. Это позволяет отнести изолят к психрофильным бактериям, представляющим автохтонную микробиоту пещеры [50].

2.2 Методы исследования

2.2.1. Обработка семян психротолерантными бактериями

1. Готовую бактериальную суспензию с одной чашки смывали 5 мл стерильной дистиллированной воды, используя микробиологический шпатель.
2. Проводили разбавление бактериальной суспензии в 3 раза.
3. Семена погружали в раствор (15 семян на 15 мл раствора).
4. Суспензию с семенами взбалтывали и ставили в холодильник на 15 минут. Далее перемешивали и снова убирали на холод еще на 45 минут.
5. Семена помещали в стерильные чашки Петри (по 3 семечка в 1 чашку) с фильтром (3 слоя целлюлозы) и ставили на прораствание.
6. Остатки суспензии были вылиты в сосуды с почвой, заранее приготовленной для дальнейшей высадки семян. Сосуды помещали в холодильник.

2.2.2 Обработка семян спорами гриба рода *Trichoderma*

Семена растений подвергались обработке спорами гриба рода *Trichoderma* до их полного насыщения путем опудривания в стерильных условиях.

2.2.3 Условия выращивания растений

Проросшие семена помещали в почву на одинаковую глубину – 2,5 см. Для выращивания использовали почвенный субстрат, включающий: верховой и низовой торф, песок и доломитовую муку (рН 5.5-6.5; N - 30%; P - 30%; K - 40%). Выращивание проводили при естественном освещении,

интенсивность освещения составляла 14 клюкс. Влажность – 74-77 %, температура колебалась в пределах 26-30 °С. Растения поливали водопроводной отстоянной водой, поддерживая относительную влажность почвы на уровне 60%.

2.2.4 Определение количества микроорганизмов

Определяли содержание различных групп микроорганизмов в прикорневой зоне растения. Для анализа ризосферной микрофлоры использовали смывы с корней. Для этого в фазу всходов и кущения отбирали по 5 растений. Растение выкапывали с монолитом почвы. Стерильным пинцетом корни растения осторожно освобождали от прилипшей к ним почвы. С корневой системы растения стерильными ножницами срезали кусочки молодых корней и отвешивают 1 г на часовом стекле. Пинцетом переносили навеску корней в первую колбу с 99 миллилитрами стерильной дистиллированной воды и содержимое колбы взбалтывали в течение 2 мин. Стерильным металлическим крючком переносили корни во вторую колбу с 99 мл стерильной дистиллированной воды и вновь взбалтывали содержимое колбы 2 мин. Затем корни переносили последовательно в колбы № 3, 4, 5, отмывая их в каждой колбе по 2 мин. После чего осуществляли глубинные посеы из смыва с использованием микропипет-дозатора в питательные среды (по 2 мкл в каждую питательную среду): среда МПА, Чапека, КАА, Эшби.

На среде МПА определяли количество аммонифицирующих микроорганизмов, на Чапека - численность гетеротрофных микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, на КАА - олиготрофных микроорганизмов, на Эшби – азотфиксирующих и олигонитрофильных микроорганизмов. Разведение для сред было следующим: КАА – 10^3 , МПА – 10^5 , среда Чапека – 10^3 и среда Эшби – 10^4 . Чашки Петри с агаровыми пластинами помещали в термостат, при температуре 28-30°C. Через 3-7 дней приступали к анализу колоний, развившихся на агаровых пластинках в

чашках Петри методом подсчёта их количества. После этого подсчитывали суммарное количество колоний для каждой среды. Затем делали пересчёт на 1 г почвы по следующей формуле:

$$KOE = \frac{N_i \times k}{M \times V}$$

где N_i – сумма колоний в чашке Петри; k – разведение; M – влажность воздуха в отн. ед.; V – объем капли в мл.

2.2.5 Определение морфобиологических параметров растений

В ходе эксперимента определяли энергию прорастания, всхожесть семян в соответствии с ГОСТ 12038-84 [51], длину надземной части и главного корня, сырую и сухую биомассу надземной и корневой систем. Биомассу сырых растений находили путем взвешивания на технических весах. Для измерения сухой биомассы растения предварительно высушивали в сушильном шкафу при 105°C, затем взвешивали на аналитических весах.

2.2.6 Определение содержания зеленых пигментов

Содержание зеленых пигментов определяли спектрофотометрическим методом по молярным коэффициентам экстинкции. Для этого, навеску сырого растительного материала заливали десятикратным количеством 96% этанола и ставили на водяную баню ($t=65^\circ\text{C}$) на 30 минут. После бани, полученный раствор помещали в холодильник на ночь для получения более полной экстракции хлорофилла.

Определение оптической плотности экстракта осуществляли на спектрофотометре (SPECOL), обладающем достаточной разрешающей способностью.

Концентрацию пигментов рассчитывали по формулам [52]:

$$C_a = (13,7 \times (D_{665} - D_{720}) - (5,7 \times (D_{649} - D_{720})))$$

$$C_b = (25,8 \times (D_{649} - D_{720}) - (7,6 \times (D_{665} - D_{720})))$$

где концентрации C_a – концентрация хлорофилла *a* (мкг/мл), C_b – концентрация хлорофилла *b* (мкг/мл), D – оптическая плотность раствора при заданной длине волны [55].

Оптическая плотность раствора при 720 нм выступала в качестве поправки для значений оптической плотности при 649 и 665 нм.

Содержание пигментов рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{C \times V \times P}{m}$$

где C – концентрация пигментов, V – объем раствора; P – разведение; m – сырая биомасса растений.

2.2.7 Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки экспериментальных результатов использовали специализированный пакет программы Microsoft Excel 2007. Оценку достоверности различий средних проводили на основе критерия Стьюдента, при уровне вероятности не менее 95 %. Достоверность действия фактора проводили с использованием дисперсионного анализа. В таблицах и рисунках приведены средние арифметические значения с двухсторонним доверительным интервалом из 3-5 независимых экспериментов, каждый из которых проведен в 3 биологических повторностях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Показано положительное влияние психротолерантных бактерий штаммов ВДР5м и УОЗК2 на рост и развитие растений и на структуру почвенных бактериальных комплексов *Zea mays*. Наибольший эффект на растения *Zea mays* оказал штамм УОЗК2.

2. Психротолерантные бактерии штамма УОЗК2 и грибы рода *Trichoderma* приводили к существенным изменениям в структуре ризосферного микробного комплекса растений *Secále cereále*. На начальных этапах развития растения *Secále cereále* действие *Trichoderma* существенно проявлялось на содержание гетеротрофов и аммонификаторов, а штамма УОЗК2 - на содержание олиготрофов и аммонификаторов, на стадии кущения *Secále cereále* грибы рода *Trichoderma* значительно увеличивали количество азотфиксаторов, а бактерии штамма УОЗК2 - количество гетеротрофных и аммонифицирующих микроорганизмов.

3. Грибы рода *Trichoderma* и психротолерантные бактерии штамма УОЗК2 оказывали влияние на рост *Secále cereále*. Показано, что наибольший эффект *Trichoderma asperellum* проявлялся на развитие корневой системы, а психротолерантных бактерий штамма УОЗК2 на развитие надземной части растения. Установлено, что эффект воздействия микроорганизмов проявлялся на более поздних стадиях вегетации *Secále cereále*.

4. Грибы рода *Trichoderma* и психротолерантные бактерии штамма УОЗК2 оказывали влияние на общее содержание зеленых пигментов и на соотношение их форм в листьях *Secále cereále*. Отмечено стимулирующее влияние психротолерантных бактерий штамма УОЗК2 на общее содержание хлорофилла и хлорофилла *a*, особенно данный эффект проявлялся в поздние

сроки вегетации *Secále cereále*. Положительный эффект действия *Trichoderma* на содержание зеленых пигментов *Secále cereále* не был отмечен.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ланкина Е.П. Перспективы использования смешанных культур психрофильных и психротолерантных бактерий в биологической защите растений от болезней [Электронный ресурс] / Е.П. Ланкина, С.В. Хижняк, С.П. Кулижский // Вестник красноярского государственного аграрного университета – 2013 - №4 – С. 101-106. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=18967157>
2. Якуба Г.В. Перспективные микробиологические препараты для защиты яблони от парши [Электронный ресурс] / Г.В Якуба, Л.В. Маслиенко, Д.Н. Гусин // Плодоводство и виноградарство юга России – 2013 - №22. С. 81-88. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=19394074>
3. Islam M., Native Trichoderma strains isolated from Bangladesh with broad spectrum antifungal action against fungal phytopathogens [Электронный ресурс] / M. Islam, M. Delwar, M. Rahman, K. Suzuki, T. Narisawa, I. Hossain // Archives of Phytopathology and Plant Protection. – 2016 – Volume 49 – Issue 1-4. P. 75-93. Режим Доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03235408.2016.1147121>
4. Mbazia A.. Tunisian isolates of Trichoderma spp. and Bacillus subtilis can control Botrytis fabae on faba bean [Электронный ресурс] /A. Mbazia, N. Omri Ben Youssef & M. Kharrat//Journal Biocontrol Science and Technology. - 2016. - Volume 26 - Issue 7. P. 915-927 Режим Доступа <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09583157.2016.1168775>
5. Moosa A. Antagonistic Potential of Trichoderma Isolates and Manures Against Fusarium Wilt of Tomato [Электронный ресурс] / A. Moosa, S.T. Sahi, I.U. Haq, A. Farzand. // International Journal of Vegetable Science – 2016 - Latest Articles. P. 1-12. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19315260.2016.1232329>
6. El-Katatny M. Effects of Single and Combined Inoculations with Azospirillum brasilense and Trichoderma harzianum on Seedling Growth or Yield Parameters of

Wheat (*Triticum vulgare* L., Giza 168) and Corn (*Zea mays* L., Hybrid 310) [Электронный ресурс] / М.Н. El-Katatny & М/ М. Idres // Journal of Plant Nutrition – 2014 - Volume 37 - Issue 12. P 1913-1936. Режим доступа:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01904167.2014.911322>

7. Singh Meenakshi. Interactions among arbuscular mycorrhizal fungi, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger* and biocontrol of wilt of tomato [Электронный ресурс] / Meenakshi Singh // Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection – 2014 - Volume 48 - Issue 3. P. 205-211 Режим Доступа

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03235408.2014.884825>

8. Садыкова В.С. Оценка ростостимулирующей активности штаммов грибов рода *Trichoderma* на каллусах злаков [Электронный ресурс] / В.С. Садыкова, Т.И. Громовых, А.М. Сидаков, П.Н. Бондарь. // Вестник российской сельскохозяйственной науки – 2012 - №2 – С. 44-45. Режим доступа:

<http://elibrary.ru/item.asp?id=17664954>

9. Yu X. Biocontrol effect of *Trichoderma harzianum* T4 on brassica clubroot and analysis of rhizosphere microbial communities based on T-RFLP [Электронный ресурс] / X.X.Yu, Y.T.Zhao, J. Cheng & W.Wang // Biocontrol Science and Technology – 2015 - Volume 25 - Issue 12. P. 1493-1505. Режим доступа:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09583157.2015.1067762>

10. Ahluwalia V. Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity [Электронный ресурс] / V. Ahluwalia, J. Kumar, V. S. Rana O. P. Sati & S. Walia // Formerly Natural Product Letters – 2015 - Volume 29 - Issue 10. P. 914-920. Режим

доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2014.958739>

11. Голованова Т. И. Изучение взаимоотношений растений с С4-типом метаболизма и грибов рода *Trichoderma* [Электронный ресурс] / Т.И. Голованова, А.Ф. Валиулина, Т.А. Симонова // Вестник красноярского

государственного университета – 2013 - №11. С. 154-159. Режим доступа:
<http://elibrary.ru/item.asp?id=21515373>

12. Патица В. П., Омелянец Т. Г., Гриник И. В., Петриченко В. Ф. Экологія мікроорганізмів. — Киев: Основа, 2007. — С. 84–91.
13. Благодатская Е. В, Ермолаев А. М., Мякшина Т. Н. Экологические стратегии микробных сообществ под растениями луговых систем / Изв. РАН. Сер. Биология. — 2004. — №6. — С. 740–748
14. Пономаренко С.П., Итинская Г.А. Биорегуляция микробно-растительных систем: Монография / Г.А. Иутинская, С.П. Пономаренко - Киев: Ничлава, 2010. - 30-41, 157-161, 332-338 с.
15. Попкова, К.В. Общая фитопатология: учебник / К.В. Попкова - Москва: Дрофа, 2005. - 74-125 с.
16. Громовых, Т.И. Возбудители фузариоза в питомниках Красноярского края / Т.И. Громовых, Ю.А. Литовка, О.П. Андреева, С.В. Прудникова, Т.А. Корянова // Лесоведение. – 2002. – № 6. – С. 68 – 71.
17. Литовка, Ю.А. Видовой состав грибов рода *Fusarium* и их роль в патогенезе сеянцев хвойных в лесопитомниках Средней Сибири / Ю.А. Литовка // Дис...канд. биол. наук.- Красноярск. – 2003. – 176 с.
18. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Микроорганизмы - продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) / Прикл. биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42, № 2. — С.133–143. 532.
19. Цавкелова Е. А., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с орхидными / Микробиология. — 2005. — Т. 74, № 1. — С. 55–62.
20. Нурмухаметов Н.М., "Микроорганизмы и растения"// Вестник Башкирского государственного аграрного университета №7, 2009г.
21. Тихонович И.А. Принципы селекции растений на взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами [Электронный ресурс] / И.А.

- Тихонович, Н.А. Проворов. // Вавиловский журнал генетики и селекции - 2005 - №3 - с.295-305. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=9127249>
22. Проворов Н. А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биологии. — 2001. — Т. 62, № 6. — С. 472–495.
 23. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. — 2 nd Ed.: Proteobacteria. Part C: The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilon proteobacteria / Ed. George m. Ciarrety. — N. Y.: Springer, 2005. — Vol. 2. — 1388 p.
 24. Broughton W. J. Roses by Other Names: Taxonomy of the Rhizobiaceae // J. of Bacteriol. — 2003. — Vol. 185, N 10. — P. 2975–2979.
 25. Lindstrom K., Martinez-Romero M. E. International Committee on Systematics of Rokaryotes: Subcommittee on the Taxonomy of Agrobacterium and Rhizobium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002. — Vol. 52, N 6. — P. 2337–2339.
 26. Van Berkum P., Fuhrmann J. J., Eardly B. D. Phylogeny of rhizobia / In F. O. Pedrosa, M. Hungria, G. Yates, W. E. Newton (ed.). Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. — Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands, 2000. — P. 165–169.
 27. Dehariya K.. Trichoderma and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Based Biocontrol of Fusarium udum Butler and Their Growth Promotion Effects on Pigeon Pea [Электронный ресурс] / K. Dehariya A. Shukla, I. A. Sheikh, D. Vyas // Journal of Agricultural Science and Technology – 2015 – Volume 17 – Issue 2. P. 505-517. Режим доступа: http://jast.modares.ac.ir/article_12246.html
 28. ЛанкинаЕ.П. Влияние психрофильных и психротолерантных штаммов бактерий-антагонистов на поражение яровой пшеницы корневой гнилью и листовой пятнистостью [Электронный ресурс] / Е.П. Ланкина //Материалы VII Международной научно-практической конференции молодых ученых. Издательство: Красноярский государственный аграрный университет (Красноярск) - 2015. С. 42-44. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=25712968>

29. Кацы, Е.И. Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований/ Е.И. Кацы; - Москва.: Наука, 2007, С. 5-62.
30. Cook R. J. Advances in plant health management in the twentieth century // *Ann. Rev. Phytopathol.* — 2002. — Vol. 38. — P. 95–116.
31. Lia Rocque Jeinnie R., Bergholz P. W., Bagwell Ch. E., Lovell Ch. R. Influence of host plant-derived and abiotic environmental parameters on the composition of the diazotroph assemblage associated with roots of *Juncus roemerianus* // *Antonie van Leeuwenhoek.* — 2004. — Vol. 86, N 3. — P. 249–261.
32. Kloepper F. J. W., Schroth M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes / In: *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter (Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France).* — 1978. — Vol. 2. — P. 879–882.
33. Mac Millan S. Promoting growth with PGPR // *The Canadian Organic Growth Grower.* — 2007. — N 9. — P. 32–34.
34. Семенов А.В. Антагонизм как результат межмикробных отношений [Электронный ресурс] / А.В. Семенов // *Бюллетень оренбургского научного центра УРО РАН* – 2013 - №1 – С. 8. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=20421241>
35. Ширипова Д.А. Исследование антагонизма различных штаммов грибов рода *Trichoderma* и грибковых фитопатогенов [Электронный ресурс] / Д.А. Ширипова, М.А. Ветрова, Я.Н. Масютин, А.А. Новиков, П.А. Гушин, В.А. Винокуров // *Башкирский химический журнал* – 2013 - №4 – С. 83-85. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=21178025>
36. Dobereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // *Intern. symp. nitrogen fixation - interdisciplinary discussion* / Ed. E. Newton, C. J.Nijman - Pullman: Wash. State Univ. press, 1976. - Vol. 2. - P.518-538.

37. Алимова Ф.К. Trichoderma/Нупоcreа (Fungi, Ascomycetes, Нупоcreales): таксономия и распространение / Ф.К. Алимова - Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2005, с.
38. Долинская Е.В. Влияние грибов Trichoderma asperellum на физиолого-биохимические процессы растений пшеницы: Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Е.В. Долинская - Красноярск, 2011.
39. Хижняк С.В. Карстовые пещеры как источник психрофильных штаммов для ферментативной переработки сырья зерноперерабатывающей и плодоовощной отрасли и повышения пищевой биологической ценности продукции [Электронный ресурс] / С.В. Хижняк, И.Р. Илиенец И.Р., Л.П. Рубчевская, Л.Н. Меняйло // Вестник красноярского государственного университета – 2012 - №11. С. 411-415. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=17734749>
40. Lyutskanova D. Isolation, Characterization and Screening for Antimicrobial Activities of Psychrotolerant Streptomycetes Isolated from Polar Permafrost Soil [Электронный ресурс] / D. Lyutskanova, V. Ivanova, M. Stoilova-Disheva, M. Kolarova, K. Aleksieva, V. Raykovska // Biotechnology & Biotechnological Equipment – 2014 – Volume 23 – Issue 1. P. 305-309. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2009.10818425>
41. Lyutskanova D. Isolation and Characterization of a Psychrotolerant Streptomyces Strain from Permafrost Soil in Spitsbergen, Producing Phthalic Acid Ester [Электронный ресурс] / D. Lyutskanova, V. Ivanova, M. Stoilova-Disheva, M. Kolarova, K. Aleksieva, V. Raykovska // Biotechnology & Biotechnological Equipment – 2014 – Volume 23 – Issue 2. P. 1220-1224. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2009.10817642>
42. Ланкина Е.П. Влияние психротолерантных штаммов бактерий-антагонистов UOZK2 и UOZK7 на структуру бактериального сообщества в ризосфере яровой пшеницы [Электронный ресурс] / Е.П. Ланкина, С.А. Петрушина, С.В. Хижняк // Вестник красноярского государственного аграрного

- университета – 2014 - №8. С. 84-87. Режим доступа:
<http://elibrary.ru/item.asp?id=21989487>
43. Ланкина Е.П. Влияние пещерных штаммов бактерий VDR5M и VDR5K на структуру бактериального сообщества в ризосфере яровой пшеницы [Электронный ресурс] / Е.П. Ланкина, Е.Н. Баженова, С.В. Хижняк // Вестник Красноярского государственного аграрного университета – 2014 - №10. С. 85-88. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=22538085>
44. Шерстобоева Е. В., Дудинова И. А., Крамаренко С. Н., Шерстобоев Н. К. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: проблемы и перспективы применения /Мікробіол. журн. — 1997. — Т. 59, № 4. — С. 109–117
45. Сафронова Г. В., Суховицкая Л. А., Короленок Н. В. Влияние инокулянтов и пестицидов на развитие бобово-ризобияльного симбиоза и продуктивность зернобобовых растений // С. г. мікробіол: міжвід. тем. наук. зб. — Чернігів, 2007. — Вип. 5. — С. 62–73
46. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Электронный ресурс] Taxonomy browser. Режим доступа:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4577&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
47. Майсурян Н.А. Растениеводство:лабораторно-практические занятия / Н.А.Майсурян - Москва: Колос, 1964, с.64-70
48. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода Trichoderma: учеб. пособие / Ф.К. Алимова, Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова. - Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2007. - 234 с.
49. Бабицкая В.Г. Грибы - эффективные деструкторы лигноцеллюлозных субстратов: их морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика / В.Г. Бабицкая. - М.: Новая Волна, 2003. - 38 с.
50. Ланкина Е.П., Хижняк С.В. Бактериальные сообщества пещер как источник штаммов для биологической защиты растений от болезней: монография / Е.П. Ланкина, С.В. Хижняк. - Красноярск: Краснояр. гос. аграр. ун-т., 2012 - 67-78 с.

51. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Взамен ГОСТ 12038-66. Введ. 1.07.86. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – С. 45.
52. Wintermans J.F. G.M., De Mots // J.F. Wintermans, G.M., De Mots *Biochim. et biophys. acta*, - 1965. - С. 109, 448.
53. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Электронный ресурс] Taxonomy browser. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4550&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
54. Mastouri F. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings / F. Mastouri, T. Bjorkman, G. E. Harman // *Phytopathology*. – 2010. – P. 1213-1221
55. Shores M., The relationship between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes [Электронный ресурс] / M. Shores, G. E. Harman // *Plant Signaling & Behavior*. - 2008 - Volume 3 - Issue 9. P. 737-739. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.3.9.6605?scroll=top&needAccess=true>
56. Esposito E., Systematics and Environmental Application of the Genus *Trichoderma* [Электронный ресурс] / E. Esposito, M. Silva // *Critical Reviews in Microbiology*. - 2008 - Volume 24 - Issue 2. P. 89-98. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408419891294190?needAccess=true>
57. Мелентьев, А.И. Аэробные спорообразующие бактерий *Bacillus Cohn* в агроэкосистемах: монография / А.И. Мелентьев - Москва: Наука, 2007. - 6-18 с.