

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ М. И. Гладышев

подпись

« _____ » _____ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.04.01– Биология

Влияние грибов рода *Trichoderma* и психротолерантных бактерий на
физиологические показатели *Secale cereale*

Научный руководитель _____ д.б.н., профессор Голованова Т.И.

Выпускник _____ Ускова О.Н.

Красноярск 2017

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1. Микроорганизмы – антагонисты.....	7
1.1.1. Бактерии-антагонисты.....	8
1.1.2. Грибы-антагонисты	10
Глава 2. Объекты и методы.....	14
2.1. Объекты исследования	14
2.1.1. Описание штамма <i>Trichoderma asperellum</i>	15
2.1.2. Описание психротолерантных микроорганизмов.....	16
2.1.3. Описание сорта <i>Secale cereale</i>	18
2.1.4. Описание почвогрунта	21
2.2. Методы исследования.....	22
2.2.1. Обработка семян грибом рода <i>Trichoderma asperellum</i>	22
2.2.2. Обработка семян бактериальной суспензией:	22
2.2.4. Принцип работы модулирующего флуориметра.....	24
2.2.5. Статистическая обработка результатов.....	26
Глава 3. Результаты и обсуждения.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1. Влияние грибов <i>Trichoderma asperellum</i> и бактерий штамма УОЗК2 на энергию прорастания и всхожесть <i>Secale cereale</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.2. Влияние грибов <i>Trichoderma asperellum</i> и бактерий штамма УОЗК2 на физиолого-морфологические параметры <i>Secale cereale</i> ..	Ошибка! Закладка не определена.
3.3. Влияние грибов <i>Trichoderma asperellum</i> и бактерий штамма УОЗК2 на содержание фотосинтетических пигментов в растениях <i>Secale cereale</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.4. Влияние грибов <i>Trichoderma asperellum</i> и бактерий штамма УОЗК2 на скорость транспорта электронов и квантовый выход фотосинтеза..	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27
Список использованной литературы.....	28

Введение

Актуальность. Ключевыми условиями получения высоких урожаев являются борьба с болезнями и обеспечение полноценного минерального питания растений. В настоящее время в целях ограничения нагрузки на окружающую среду и повышения качества сельскохозяйственной продукции развитые государства вводят существенные ограничения на применение химических пестицидов и переориентируют сельхозпроизводителей на использование биологических средств защиты растений [48,49]. Кроме этого, все большее распространение получают микробиологические и бактериологические средства поддержания почвенного плодородия как альтернатива минеральным удобрениям.

Повышение продуктивности сельскохозяйственных растений и их устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам внешней среды является важнейшей проблемой современной агробиотехнологии [7]. Среди биотических факторов большое влияние на растительный организм оказывают почвенные микроорганизмы. Воздействие микроорганизмов может сказываться как отрицательно, так и положительно на ростовые процессы растений. Фитопатогенные микроорганизмы синтезируют фитотоксины, способные подавлять или задерживать рост растений, а иногда и вовсе приводить к их гибели. Растения взаимодействуют и с полезными микроорганизмами, которые являются продуцентами комплекса антибиотических веществ, обладающих высокой физиологической активностью и подавляют рост целого ряда фитопатогенных грибов и бактерий, что позволяет им достаточно быстро вытеснять из грунтов или субстратов патогенную микрофлору [6]. Их антагонистические свойства используются в сельскохозяйственной биотехнологии для разработки и производства биологических средств защиты растений против ряда

заболеваний. Микроорганизмы-антагонисты фитопатогенов способны оказывать положительное влияние на комплекс физиолого-биохимических программ, протекающих в растительном организме: повышать доступность для растений элементов питания за счет фиксации азота, улучшения водного и минерального статуса, что определяет формирование урожая; а также уменьшают стрессовое воздействие на растение неблагоприятных условий среды [6].

Популяции грибов рода *Trichoderma* являются природным резервуаром для поиска штаммов-продуцентов биологически активных соединений, для контроля широкой группы организмов: условно-патогенных и патогенных бактерий, фитопатогенных грибов, опухолевых клеток. На основе этих грибов создана группа биопрепаратов - триходерминов. Грибы рода *Trichoderma* могут выделять ауксин, гиббереллины, цитокинины, абсцизовую кислоту, являющиеся гормонами растений и отвечающими за рост и развитие растений, созревание цветов и плодов, увядание [33]. Большинство исследователей во всем мире отмечают их высокую эффективность в подавлении многих возбудителей болезней растений. В связи с широким применением грибов рода *Trichoderma* в самых разных странах накоплен огромный фактический материал, касающийся физиолого-морфологических, биохимических и генетических исследований грибов, а также технологии получения биопрепаратов и их успешное применение [21].

На сегодняшний день разработан биологический метод, который является основой для разработок экологически безопасных, экономичных и долговременных программ борьбы с вредными организмами. Сущность его заключается в уничтожении или торможении развития возбудителей болезни с помощью других живых организмов или продуктов их жизнедеятельности. Благодаря биологическим методам, возникает возможность сокращения числа химических обработок и восстановления численности природных популяций естественных врагов [35,36,37]. Однако 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 [38]. Выяснение механизмов формирования и функционирования ассоциаций растений и микроорганизмов является одним из актуальных вопросов биологии.

Новизна. Выяснение механизмов взаимодействия растений с грибами *Trichoderma asperellum* и бактериями УОЗК2 с учетом факторов окружающей среды позволит применять данные микромицеты и микроорганизмы для повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды и повысить продуктивность растений.

Практическая значимость. Изучение механизмов микроорганизмов-антагонистов бактериального и грибного происхождения позволит использовать их в сельском хозяйстве для борьбы с вредителями - патогенами совместно с использованием химических препаратов, и частично вытеснить использование пестицидов на сельскохозяйственную продукцию.

Цель: Изучить особенности развития растений *Secale cereale* в условиях их взаимодействия с грибом рода *Trichoderma asperellum* и психротолерантными бактериями штамма - УОЗК2.

Задачами данной работы является изучение влияния грибов *Trichoderma asperellum* и психротолерантных бактерий штамма УОЗК2 на:

- морфо-физиологические;
- биохимические;

- скорость транспорта электронов и квантовый выход фотосинтеза.

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. Микроорганизмы – антагонисты

Для создания альтернативных химическим методам защиты растений от болезней проводится интенсивный поиск бактерий, актиномицетов и грибов, способных служить агентами биологического контроля развития болезней растений, и применение их в виде либо концентрированных продуктов метаболизма (антибиотиков), либо живых культур.

В настоящее время разработаны некоторые биопрепараты, созданные на основе бактерий-антагонистов (алирин Б, бактофит, фитоспорин, ризоплан и др.), актиномицетов (фитобактериомицин, гризин, валидомицин, касугомицин и др.) и грибов - антагонистов (трихотецин, триходермин-БЛ, деструксин, боверицин, микоафидин-Т, вертициллин-М и др.) [8,9,10,18,23,24,26].

В настоящее время на мировом рынке существует более 50 препаратов и технологий, использующих различные штаммы рода *Trichoderma*. Большинство из них направлено на борьбу с болезнями растений, вызываемых фитопатогенными грибами [3].

Микробиологические средства из года в год находят все большее применение. При их разработке основной задачей является выделение из различных почв наиболее выносливых и часто встречающихся сапрофитных микроорганизмов, которые в состоянии вытеснить патогенные формы с минимальным отрицательным воздействием на окружающую среду [11,29].

Антагонизм – один из наиболее широко распространенных способов взаимодействия между микроорганизмами. В наибольшей мере это явление характерно для представителей сложных биоценозов, которые складываются в таких местообитаниях, как почва, водные экосистемы, ризосфера растений, желудочно-кишечный тракт человека и животных. Здесь неизбежно возникает конкуренция за питательные субстраты, которую «выигрывают» виды (штаммы), обладающие наиболее широким арсеналом

антагонистических свойств. Антагонизм выражается в образовании организмами одной популяции веществ, подавляющих развитие членов другой популяции. Одним из наиболее типичных и хорошо изученных примеров антагонизма является продукция антибиотиков. Кроме этого, в качестве антагонистических факторов микроорганизмы синтезируют бактериоцины, ферменты, токсины, а также разнообразные продукты метаболизма (органические и неорганические кислоты, спирты, сероводород, аммиак, жирные кислоты). Способность продуцировать антагонистические факторы – неременное требование для пробиотических бактерий, которые должны активно ограничивать развитие патогенной и другой нежелательной микробиоты в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека и животных [42].

Антагонисты - наиболее перспективные и надежные помощники человека при использовании биологического метода борьбы с вредителями. В настоящее время их изучению уделяется большое внимание [26, 12].

1.1.1. Бактерии-антагонисты

Использование бактериальных антагонистов основано главным образом на механизме антибиоза, регулирующем взаимоотношения полезных и вредных (с точки зрения производителя сельскохозяйственной продукции) микроорганизмов. Антибиоз играет наиболее важную роль в зоне ризосферы, окружающая корни и корневые волоски растения в пределах до 100 мкм. Использование регуляторных механизмов направлено не на полное уничтожение популяции фитопатогена, а на существенное ограничение ее развития и снижение вредоносности. Источником получения штаммов бактерий-антагонистов служат супрессивные почвы, в которых фитопатогены либо угнетены, либо элиминированы [26].

Высокая антагонистическая активность по отношению к патогенам выявлена у более десятка различных родов бактерий [19].

1.1.1.1. Психротолерантные бактерии

Психротолеранты - организмы, способные к росту и размножению при низких температурах в пределах от -20°C до $+10^{\circ}\text{C}$. 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 [23, 24]. Так как большая часть нашей планетарной поверхности поддерживает температуру ниже 15°C , психротолеранты вездесущи на Земле. Они присутствуют в альпийских и арктических почвах, глубоких океанических водах, в полярных льдах, ледниках и снежниках. Психрофильные микроорганизмы выделяют из различных объектов Антарктики, горных ледников, тундровых почв Арктики. Океаны также являются естественной средой обитания психрофильных бактерий [5]. Изучение микробиоты пещер Средней Сибири показало, что в пещерах региона присутствуют естественные микробные сообщества, представленные психротолерантными бактериями и грибами.

В последнее десятилетие в мире наблюдается растущий интерес к использованию психрофильных микроорганизмов в биотехнологии. Исследования показали, что карстовые пещеры Средней Сибири являются уникальным природным источником психрофильных и психротолерантных микроорганизмов, перспективных для использования в сельскохозяйственной биотехнологии в качестве безопасных для теплокровных и способных к функционированию в низкотемпературных условиях начала вегетационного периода биофунгицидов [25]. Среди выделенных в пещерах психрофильных 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. *Alternaria*. 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 [25].

1.1.2. Грибы-антагонисты

Принципы использования антагонистически активных микроорганизмов были разработаны Н. А. Красильниковым [13].

В настоящее время среди актиномицетов выделены штаммы, антагонистически активные в отношении возбудителей различных болезней. Так, в Турции для биологической борьбы с некоторыми видами почвенных патогенов рекомендована раса C/2-9 актиномицета *Streptomyces ochraceiscieroticus*, ею обрабатывают семена, рассаду, почву в целях защиты сельскохозяйственных культур. В Великобритании *S. griseus*, встречающийся на соломенных тюках и других субстратах с соломой, на которых выращивали огурцы в теплицах, также подавлял корневые гнили [1].

Актиномицеты в процессе своей жизнедеятельности, помимо антибиотиков, способны синтезировать витамины, аминокислоты, ауксины, которые также применяются в растениеводстве для повышения урожайности и стимулирования прорастания семян [14,19]. Благодаря разнообразию своих клеток актиномицеты имеют большую возможность приспособиться к различным условиям среды. Кроме того, они неразборчивы в выборе пищи. Благодаря таким свойствам они широко распространены в природе, могут легко выращиваться в лабораторных условиях. Актиномицеты хорошо переносят высушивание. Так, некоторые культуры актиномицетов после девятилетнего пребывания в сухом виде, в лабораторных условиях не потеряли своей жизнеспособности. Следует добавить, что актиномицеты по количественному составу и разнообразию продуцируемых антибиотиков занимают первое место среди микроорганизмов [22].

Таким образом, можно сказать, что благодаря своим особенностям актиномицеты могут успешно конкурировать с фитопатогенными микроорганизмами в почве. В некоторых почвах можно обнаружить сравнительно небольшое количество актиномицетов, но почти все они оказываются антагонистами.

В последние годы круг грибных антагонистов, используемых в защите растений, значительно расширился. Показана высокая эффективность использования гриба *Gliocladium virens* Miller et ai., а также грибов р. *Chaetomium* против корневых гнилей [26].

В работах многих исследователей приведены факты успешного применения грибов-антагонистов из р. *Penicillium* для подавления развития возбудителей болезней сельскохозяйственных культур. Так, обработка семян ячменя перед посевом культуральной жидкостью грибов *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* S., S. et. H. (= *P. martensii*) и *P. bilai* снижала поражение растений каменной головней ячменя в 2-3 раза по сравнению с контролем; обработка семян яровой пшеницы культуральной жидкостью *P. Multicolor* - в 4 раза уменьшала поражение растений пыльной головней, а в варианте с *P. Cyclopium* болезнь совсем не развивалась [20]. *P. cyclopium* принадлежит к одним из самых сильных токсинообразователей в почве. *P. nigricans* образует антигрибной антибиотик гризеофульвин, который показал хорошие результаты в борьбе с некоторыми болезнями растений [16].

Важную роль в подавлении развития болезней растений играют грибы-антагонисты. Среди их представителей внимание исследователей и практиков привлекают грибы р. *Trichoderma* [8,26]. Продуцируя антибиотические вещества, они угнетают многие фитопатогены (преимущественно почвенные - грибов из р. *Fusarium*, *Pythium*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Alternaria* и др.) и одновременно являются стимуляторами роста растений [15,17]. Применение грибов р. *Trichoderma* давало обнадеживающие результаты в борьбе с болезнями плодовых, овощных и зерновых культур [27, 29]. Так, исследования показали, что внесение

антагониста *T. harzianum* в почву снижает численность фитопатогенных микромицетов, стимулирует рост и развитие растений [4].

Имеющиеся данные позволяют считать перспективным использование микробного антагонизма в защите злаковых культур. В XXI в. биологическая защита растений должна занять лидирующее положение, что не означает отказ от других методов. Биологический метод в сочетании с другими средствами и приемами являются компонентами интегрированной защиты растений, способной решить задачу сохранения как урожая, так и природной среды.

1.1.2.1. Грибы рода *Trichoderma*

Микроскопические грибы рода *Trichoderma* являются самым распространённым агентом биоконтроля патогенов растений. Это обусловлено высокой скоростью роста, способностью выживать в очень неблагоприятных условиях, сильным антагонизмом по отношению к большинству патогенных грибов и эффективностью в стимулировании роста растений и индукции защитных механизмов у растений [32].

Виды грибов рода *Trichoderma* - являются универсальными жителями почвы, они могут находиться в различных местах обитания. Они также присутствуют в гниющей древесине и овощах. Спорообразование у видов *Trichoderma* обильное, они являются агрессивно конкурентными микроорганизмами. *Trichoderma*, как правило, рассматриваются как сапрофитные грибы с минимальными потребностям в питании [21].

Грибы р. *Trichoderma* характеризуются бесцветным мицелием, образующим белые, желтые, чаще зеленые или темно-зеленые колонии. Конидии одноклеточные, почти шаровидные (2,5-3,7 мкм), собраны в головки по 10-20 штук на концах разветвленных конидиеносцев. Гриб образует шаровидные хламидоспоры размером 7,5-15 мкм. Оптимальная температура развития штамма этих грибов 25-27 °С, оптимальное значение рН 4 - 6 [8].

1.1.2.2. Влияние грибов рода *Trichoderma* на растения

Для отдельных видов *Trichoderma* показана способность к увеличению роста и массы корней растений, что приводит к повышению урожайности. Полезные грибы увеличивают потребление питательных элементов и эффективность усвоения азота. Генетическая и молекулярная основа этих эффектов неизвестна. У разных видов и сортов растений наблюдаются отличия в ответных реакциях на воздействие *Trichoderma*. Колонизация корней также увеличивает скорость роста корней и всего растения, что приводит к повышению продуктивности культуры и урожая репродуктивных органов. Колонизация корней также помогает растению преодолеть абиотические стрессы и увеличивает усвоение питательных элементов [3].

Штаммы *Trichoderma* способствуют увеличению размера корневой системы, роста и жизнестойкости растений путем контроля ризосферной микрофлоры и влияя на обмен веществ растения. Ризосферный эффект может проявляться как долговременная колонизация ризосферы, что влияет на количественное улучшение отдельных показателей развития растения. Увеличение плотности корневой системы на глубине чрезвычайно выгодно для растений, особенно в засушливые сезоны. В таких условиях колонизация корней штаммом *Trichoderma* снижает чувствительность растений к засухе [21].

В последнее время появилось множество новых разработок, касающихся использования *Trichoderma* в качестве агентов биоконтроля для болезнетворных микроорганизмов и растений, стимуляторов роста. Было предложено несколько механизмов для объяснения положительного воздействия этих микроорганизмов на растение-хозяин. Один из факторов, который способствует их полезной биологической деятельности, связан с широким разнообразием метаболитов, которые они производят. Эти метаболиты не только непосредственно подавляют рост и деятельность патогенных паразитов, но и повышают устойчивость к болезням, запуская

систему обороны в растении-хозяина. Кроме того, эти метаболиты также способны к усилению роста растений. В лабораторных опытах и многочисленных полевых испытаниях штамма Т-22 показано, что Т-22 улучшал развитие корневой системы у растений кукурузы и у других культур (рис. 1).

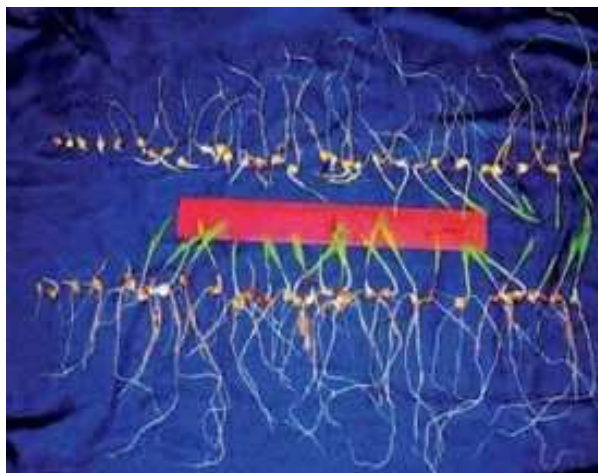


Рисунок 1- Эффект колонизации корней штаммом Т-22 *Trichoderma* (фото адаптировано из Harman et al., 2000) [31]

Колонизация корней штаммом Т-22 привела к развитию вторичных корней уже на глубине 25-75 см от поверхности почвы. Количество вторичных корней в опыте превышало контрольные показатели в 2 раза. В результате растения были устойчивее к засухе, и, возможно, приобрели устойчивость к уплотнению почвы. Не только штамм Т-22 и другие *Trichoderma* способны улучшать развитие корневой системы кукурузы и тепличных культур, но и другие полезные колонизирующие корни микроорганизмы также улучшают рост и развитие растений [45]. Вторичные метаболиты *Trichoderma*, которые влияют на метаболизм растений, могут играть важную роль в сложных взаимодействиях этого агента биоконтроля с растениями и микроорганизмами [31].

Глава 2. Объекты и методы

2.1. Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовали антагонически активный штамм *Trichoderma asperellum* МГ 97 (рис. 2) и психротолерантный штамм бактерий УОЗК2 (рис. 3).

2.1.1. Описание штамма *Trichoderma asperellum*

По своему систематическому положению *Trichoderma* относится:

отдел *Ascomycota*

семейство *Hypocreaceae*

род *Trichoderma*

вид *T. asperellum*

Trichoderma – это гриб-антагонист из отдела *Ascomycota* семейства *Hypocreaceae*. Грибы рода *Trichoderma* – типичные сапрофитные организмы. Они широко распространены в природе, основным местом их обитания является почва. Наиболее широко распространены грибы в черноземах, каштановых и других почвах, содержащих достаточное количество органического вещества. Также могут обитать на древесине, на шляпках культурных грибов, на лесных грибах, на влажных стенах зданий. В почве эти грибы развиваются на различных растительных остатках, богатых целлюлозой, на мицелии и покоящихся плодовых телах фитопатогенов [45],[46]. Мицелий грибов 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. Запах слабый, невнятный. Гифы бесцветные, гладкие 2-4 μm в диаметре. Погруженный мицелий более толстый до 8 μm шириной, с вздутиями и толстостенными клетками. Хламидоспоры обычно есть, обильные, терминальные или интеркилярные округлые, грушевидные до овальных,

гладкостенные, светло-зеленые 8-15 μm в диаметре. Оптимальная температура развития 25-27 $^{\circ}\text{C}$. [44].

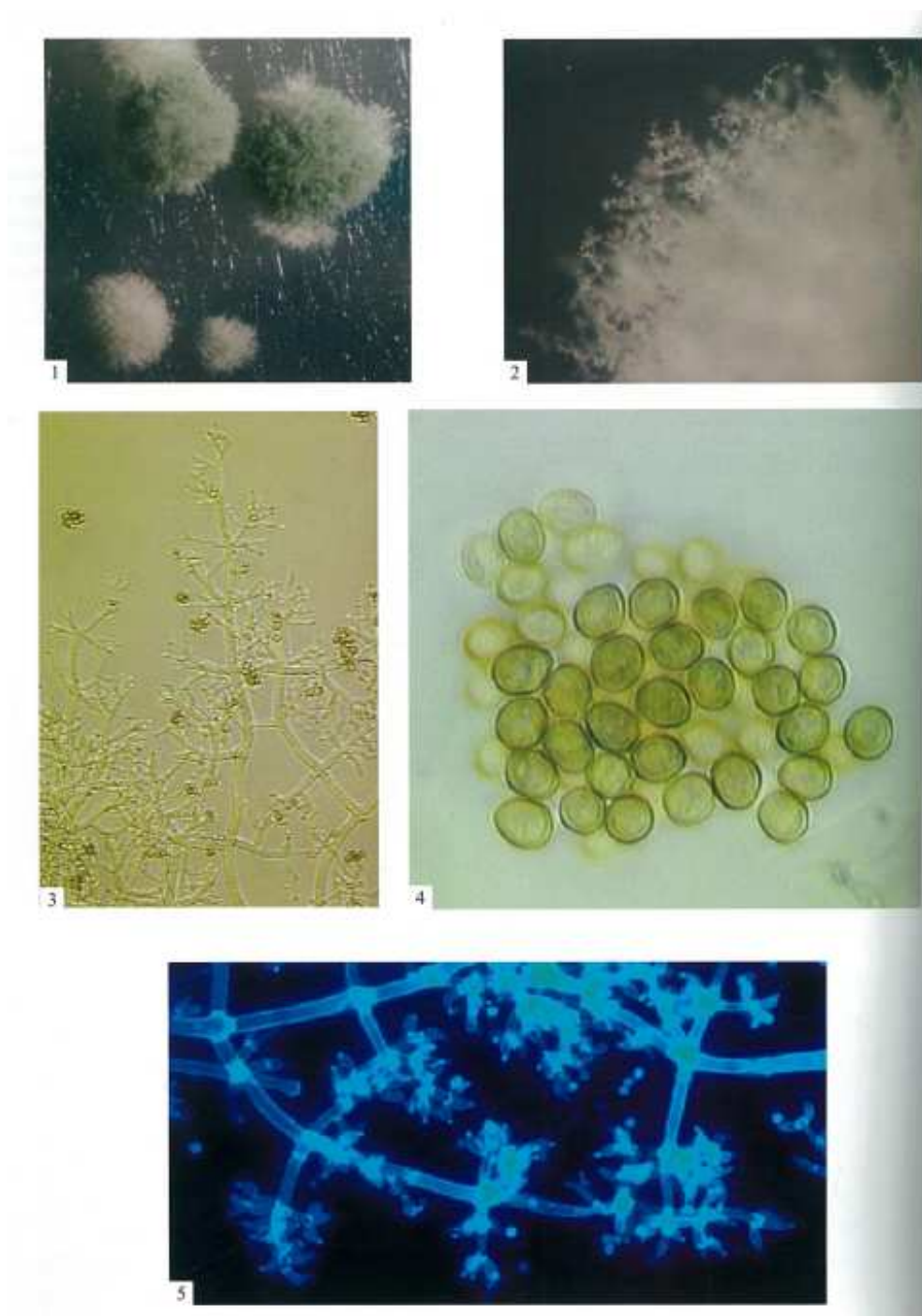


Рисунок 2 – *Trichoderma asperellum*. 1,2. Пустулы. 3. Конидиефоры. 4. Конидии. 5. Фиалиды (фото адаптировано из сайта Samuels G.J.& all *Trichoderma* Online, Systematic Botany&Micology) [45].

2.1.2. Описание психротолерантных микроорганизмов

Бактериальный штамм УОЗК2, выделен из карстовой известняковой пещеры Женовская. 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) [47].



Рисунок 3 – Колония изолята УОЗК2 на ПД-агаре (фото Ланкиной Е.П.) [47].

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) [47].

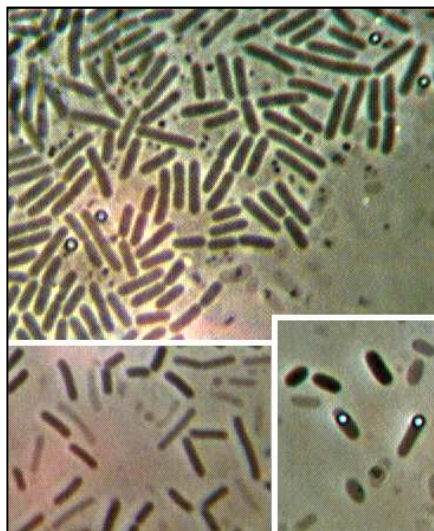


Рисунок 4 – Морфология клеток штамма УОЗК2 (вегетативные клетки и клетки со спорами), 24-часовая культура на ПД-агаре, объектив x100, фазовый контраст, масляная иммерсия (фото Ланкина Е.П.) [47]

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 [47].

2.1.3. Описание сорта *Secale cereale*

В качестве тест-объекта использовали семена растений семейства Злаковых (рис.5,6).



Рисунок 5 - Рожь посевная (фото автора, 2016)

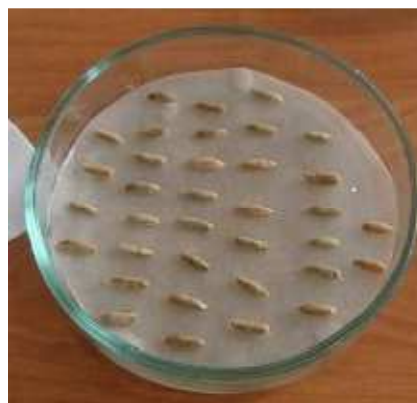


Рисунок 6 - Семена ржи посевной (фото автора, 2016)

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 [52].

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) [52].

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 [52].

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 [52].

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 [52].

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 рН 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 прорастать 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".

Растения выращивали на почвогрунте, который выбирался исключительно из-за требований рН показателя почвы (рожь лучше растет на слабокислых почвах рН 5,5 - 6,5).

2.1.4. Описание почвогрунта

Почвогрунт слабокислый, рыхлый. Содержит агроперлит. Содержание в нем азота, фосфора, калия – 120, 180, 280 мг/л, соответственно, рН солевой суспензии колеблется в пределах от 5,5 – 6,5.

Растения выращивали при комнатной температуре 25 °С в открытом грунте. Перед посадкой в грунт, семена проращивали в чашках Петри (рис.7), затем высаживали в грунт (рис.8).



Рисунок 7 - Пророщенные семена *Secale cereale* на 3 день (фото автора, 2016)



Рисунок 8 – Пророщенные семена *Secale cereale* в грунте (фото автора, 2016)

Семена брали в количестве по 40 штук в каждом варианте.

В качестве контроля использовали растения, семена которых не были обработаны спорами *Trichoderma asperellum* и бактериальной суспензией штамма УОЗК2.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Обработка семян грибом рода *Trichoderma asperellum*

Споры гриба *Trichoderma asperellum* вносили методом опудривания семян до полного их насыщения (титр 10^8 КОЕ/мл).

2.2.2. Обработка семян бактериальной суспензией:

1. Бактериальную суспензию с одной чашки смывали 5 мл стерильной дистиллированной воды, использовали микробиологический шпатель. Смыв производили 2 раза, далее добавлялось 5 мл воды в раствор суспензии.
2. Семена опускались в раствор (15 семян с 1 чашки).
3. Суспензия с семенами взбалтывалась и ставилась в холодильник на 15 минут. Далее перемешивалась и снова убиралась на холод еще на 45 минут (всего обработка семян на холоде проводилась 1 час).
4. Семена выкладывались в стерильные чашки Петри (по 3 семечка в 1 чашку) с фильтром (3 слоя целлюлозы) и ставились на проращивание.
5. Остатки суспензии были внесены в почву, заранее приготовленную для дальнейшей высадки семян. Почва ставилась в холодильник (титр 10^5 КОЕ/мл).

2.2.3. Методика определения пигментного состава растения

Содержание зеленых и желтых пигментов определяли спектрофотометрическим методом по молярным коэффициентам экстинкции [40]. Определение оптической плотности экстракта осуществляли на спектрофотометре SPECOL1300 (рис. 9).



Рисунок 9 - Спектрофотометр SPEKOL1300 (фото автора, 2017)

Концентрацию пигментов (мкг/мл) определяли по формулам [40]:

$$C_a(\text{мкг/мл}) = (13,36 * A_{664,1} - 5,19 * A_{648,6})$$

$$C_b(\text{мкг/мл}) = (27,43 * A_{648,6} - 8,12 * A_{664,1})$$

$$C_{\text{кар}}(\text{мкг/мл}) = (1000 * A_{470} - 2,13 * C_a - 97,64 * C_b)/209, \text{ где}$$

C_a - концентрация хлорофилла a ;

C_b - концентрация хлорофилла b ;

$C_{\text{кар}}$ - концентрация желтых пигментов.

Количество пигментов (мкг/г сырого вещества) определяли по формуле:

$$M = (C * V * \text{Разведение})/m, \text{ где}$$

C - концентрация пигментов (мкг/мл);

V - объем вытяжки (мл);

m - масса навески (г)

Для определения скорости электронного потока в листьях *Secale cereale* использовали «Флуориметр JUNIOR-PAM». PAM-флуориметр – это измерительный оптический прибор, действие которого основано на принципе пульс-амплитудной модуляции (Pulse Amplitude Modulation). Данный

флуориметр стал общепринятым мировым стандартом в научных и прикладных исследованиях процессов фотосинтеза (рис.10).



Рисунок 10 - Флуориметр JUNIOR-PAM [37]

Скорость электронного транспорта рассчитывали по формуле:

$$ETR = 0,5 * I_{PAR} * (ETR\text{- Factor}) * Y(II), \text{ где}$$

ETR- скорость электронного транспорта;

I_{PAR} - интенсивность света;

ETR- Factor равен 0,84 отражает эффективность поглощения фотонов пигментами;

Y(II)- эффективность квантового выхода ФС (II);

$Y(II) = \frac{F'_m - F'}{F'_m}$, где F'_m максимальный уровень флуоресценции в условиях насыщающей вспышки света при заданном уровне световой энергии, F' уровень непосредственно перед насыщающей вспышкой. [41].

2.2.4. Принцип работы модулирующего флуориметра

Название данного типа приборов связано с применением так называемого принципа импульсного модулирования, когда в качестве измеряющего излучения используют импульсный свет низкой интенсивности. Возникающая в результате вспышки измеряющего света разница в сигнале флуоресценции усиливается специальным селективным усилителем. Современный модулирующий флуориметр имеет 4 источника света, обеспечивающих 4 типа освещения объекта.

ML (measuring light) – измеряющий свет. Слабый импульсный свет, не вызывающий фотохимических реакций (интегральная плотность потока фотонов – 0,2 – 1 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, длительность импульсов – 1-3 мкс, частота – от 1,6 до 600 кГц в зависимости от режима записи и типа прибора).

AL (actinic light) – действующий (актиничный) свет, поддерживающий фотосинтез.

SP (saturation pulses) – короткие вспышки насыщающего света, интенсивность которого достаточна для быстрого восстановления пула Q_A (>2000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, длительность вспышки 0,8-2 с).

FR (far-red light) – дальний красный свет, возбуждающий только ФС I. Его применение при выключенном AL свете позволяет быстро окислить пул Q_A за счёт оттока электронов к ФС I.

При записи индукционных кривых соблюдают следующий порядок включения-выключения вышеперечисленных источников света. Включают источник измеряющего света (ML), в результате чего флуоресценция достигает значения F_o . Интенсивность ML настолько мала, что РЦ ФС II остаются при этом «открытыми». Затем применяют короткую вспышку света высокой интенсивности, который восстанавливает Q_A всех комплексов ФС II. Флуоресценция достигает максимального значения F_m (РЦ ФС II – «закрыты»). По разнице между уровнями флуоресценции F_o и F_m оценивают потенциальную эффективность фотохимии ФС II в адаптированном к темноте состоянии.

После того как флуоресценция релаксирует до уровня F_o (за счет оттока электронов от Q_A^- к пулу пластохинонов), включают актиничный свет (AL). Интенсивность флуоресценции в определенный момент времени в ходе индукции фотосинтеза обозначают F. Снижение уровня сигнала (тушение флуоресценции) вызвано окислением Q_A^- в результате активации реакций темновой фазы фотосинтеза (фотохимическое тушение флуоресценции) и увеличением тепловой диссипации в светособирающей антенне ФС II (нефотохимическое тушение флуоресценции) [50].

Для того, чтобы оценить вклады фотохимических и нефотохимических процессов, необходимо исключить влияние одного из них. Как правило, это делается по отношению к фотохимическому компоненту путем быстрого восстановления первичных акцепторов ФС II, Q_A . Для этих целей существует подход, основанный на применении коротких вспышек света высокой интенсивности [51]. В результате вспышки насыщающего света (SP) также происходит восстановление всех Q_A в образце, сопровождающееся увеличением интенсивности флуоресценции до уровня F_m' , который заметно ниже F_m из-за нефотохимического тушения флуоресценции. Наличие фотохимического тушения обуславливает разницу между F_m' и F .

После вспышки SP выключают актиничный свет (AL) и включают источник дальнего красного света (FR), возбуждающий только ФС I. При этом пул переносчиков электронов быстро и полностью окисляется. Уровень флуоресценции достигает значения F_o' . Зная величины параметров F_o' и F_m' , можно определить реальный квантовый выход фотохимии ФС II (в адаптированном к свету состоянии) [51].

В ходе исследования определяли энергию прорастания и всхожесть в соответствии с ГОСТ 12038-84 [39], длину корневой и наземной части, сырую и сухую биомассу.

2.2.5. 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 экспериментов, каждый из которых проведен в 5 биологических повторностях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Грибы рода *Trichoderma asperellum* штамм МГ-97 и психротолерантные бактерии штамм УОЗК2 снижали энергию прорастания, лабораторную и грунтовую всхожесть *Secále cereále*.
2. Грибы рода *Trichoderma* и психротолерантные бактерии штамма УОЗК2 оказывали наибольшее влияние на развитие надземной части растений, на развитие корневой системы положительный эффект микромицет и бактерий проявлялся на начальных этапах развития *Secále cereále*.
3. Психрофильные бактерии оказывали достоверное положительное влияние на накопление сырой биомассы растения на 7 сутки развития *Secále cereále*. Штамм УОЗК2 и *T. asperellum* не способствовали накоплению сухого вещества в растительном организме.
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*. На начальных этапах развития растения отмечено положительное влияние психротолерантных бактерий и микромицет на общее содержание хлорофилла, увеличение которого связано с увеличением хлорофилла *b*, на накопление каротиноидов влияния микроорганизмов не было обнаружено. На более поздних этапах бактерии резко снижали содержание каротиноидов.
5. Грибы рода *Trichoderma asperellum* штамм МГ-97 и психротолерантные бактерии штамм УОЗК2 влияли на скорость электронного потока и квантовый выход фотосинтеза растений *Secale cereale*. Эффект их действия зависел от времени их воздействия.

Список использованной литературы

1. Бондаренко, Н. В. Биологическая защита растений / Н. В. Бондаренко. - М. : Агропромиздат. 1986. - 276 с.
2. Барахтянская, Н. Г. Биологические препараты для защиты зерновых / Н. Г. Барахтянская, Н. Г. Зубов // Защита растений. - 1986. - № 3. - С. 13.
3. Бабицкая В.Г. Грибы - эффективные деструкторы лигноцеллюлозных субстратов: их морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика / В.Г. Бабицкая. - М.: Новая Волна, 2003. - 38 с.
4. Громовых, Т. И. *Trichoderma Harzianum* Rifal Addr. Как фактор повышения устойчивости томатов к возбудителям корневой гнили / Т. И. Громовых, В. М. Гукасян, Т. И. Голованова // Микология и фитопатология. - 1990. - Т. 32. - Вып. 2. - С. 73-78.
5. Громов, Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях. – 1981.
6. Долинская Е.В Влияние грибов *Trichoderma Asperellum* на физиолого-биохимические процессы растений пшеницы [Книга]. - Красноярск : [б.н.], 2011.
7. Захарченко, Н.С. Влияние ассоциативных микроорганизмов на устойчивость томатов к фитопатогенам *in vitro* и *in vivo* [Статья]. - Тула : [б.н.], 2010 г.. - Известия Тульского государственного университета Естественные науки.
8. Король, И. Т. Биологическая защита растений. - Минск : Ураджай, 2000. - 414 с.
9. Кобзарь, В. Ф. Биологические и биорациональные средства защиты растений: Краткий справочник - Краснодар, 1995. - 42 с.
10. Коробова, Л. Н. Применение бактофита: и прибавка урожая, и оздоровление почвы / Л. Н. Коробова, Т. В. Гаврилец // Защита и карантин растений. - 2006. - № 4. - С. 47-48.
11. Кипрушкина, Е. И. Биологическая защита сельскохозяйственной // Вестник защиты растений. - 2003. - Вып . 3. - С . 17-24.

12. Караджова, Л. В. Фузариозы полевых культур / Л. В. Караджова. - Кишинев : Штиинца, 1989. - 255 с.
13. Красильников, Н. А. Актиномицеты-антагонисты и антибиотические вещества / Н. А. Красильников. - М. : Изд-во АН СССР, 1950. - 303 с.
14. Красильников, Н. А. Микробы, стимулирующие рост растения / Н. А. Красильников // Вестник с.-х.н. - 1958. - №7. - С. 52-62.
15. Красильников, Н. А. Современное состояние вопроса о применении антибиотиков и других метаболитов микробов в растениеводстве / Н. А. Красильников // Применение антибиотиков в растениеводстве: Тр. 1 Всесоюз. конф. по изучению и применению антибиотиков в растениеводстве. - Ереван, 1961. - С. 7-19.
16. Красильников, Н. А. Жизнь растений. В 6 т. Т. 1. Бактерии и актиномицеты / Н. А. Красильников. - М. : Просвещение, 1974. - 474 с.
17. Лысак, Л. В. Микроорганизмы - стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных / Л. В. Лысак // Микробиология. - 1990. - Т. 59. - Вып. 4. - С. 715.
18. Мелентьев, А. И. Влияние температуры и влажности почвы на колонизацию ризосферы пшеницы бактериями *Bacillus Cohn.*, антагонистами фитопатогенов / А. И. Мелентьев, Л. Ю. Кузьмина, Н. Ф. Галимзянова // Микробиология. - 2000. - № 3. - С. 426- 432.
19. Мазунина, В. И. Образование витаминов и стимулирующих веществ актиномицетами ризосферы кукурузы / В. И. Мазунина // Антибиотики, витамины и стимуляторы микробного происхождения : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии и вирусологии. - Алма-ата, 1974. - С. 134-137.
20. Мелентьев, А. И. Использование микроорганизмов для защиты сельскохозяйственных растений от болезней / А. И. Мелентьев, А. П. Кочемасова, Н. Ф. Галимзянова // Актуальные вопросы биотехнологии. - Уфа, 1990. - С. 4-13.
21. Попова А.Д. Изучение Анагонических свойств штаммов *Trichoderma asperellum* в отношении токсинобразующих грибов рода [Книга]. - 2014. - стр. С. 328-330.
22. Попкова, К. В. Общая фитопатология / К. В. Попкова. - М. : Агропромиздат, 1979. - С. 210.

23. Смирнов, О. В. Многоцелевое действие биопрепаратов / О. В. Смирнов // Защита и карантин растений. - 2006. - № 2. - С. 20.
24. Семынина, Т. В. Биопрепараты и регуляторы роста растений для обработки семян зерновых культур / Т. В. Семынина // Защита и карантин растений. - 2006. - № 2. - С. 24-25.
25. Хижняк, С. В. Микробные сообщества карстовых пещер Средней Сибири. - 2009.
26. Штерншис, М. В. Биологическая защита растений / - М. : Колос, 2004. - 264 с.
27. Contreras-Cornejo, H. A. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis* [Журнал] // *Plant Physiology*. - 2009 г. - стр. 1579-1592.
28. Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Rev. Microbiol.* 9 (10): 749–759.
29. Jacobsen, B. J. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems / B. J. Jacobsen, A. Backman // *Plant Disease*. - 1993. - V. 77. - N. 3. - P. 311-315.
30. Harman G.E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. // *Phytopathology*. 2006. V. 96. 1. 2. P. 191-194.
31. Keswani C. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. / C. Keswani, S. Mishra, B.K. Sarma.
32. Tahia Benitez Ana M. Rincon, M.Carmen Limon, Antonio C. Codon. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains [Журнал] // *International microbiology*. - [б.м.] : *International microbiology*, 2004 г. - стр. 249-260.
33. Villarreal Sanchez, J.A. Rodriguez Martinez Isolation of microbial groups from a seaweed extract and comparison of their effects on a growth of pepper culture (*Capsicum annuum* L.). [Журнал] // *Химия*. - [б.м.] : Вестник Моск. ун-та. Сер.2., 2003 г. - 1 : Т. 44.
34. Vinale F. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism/ F. Vinale, K. Sivasithamparan, E.L. Ghisalberti, S. Wood, M. Lorito // *Nat Prod Commun.* - 2012. - Vol. 11, №7. - P. 50-52.

35. Биопрепараты в защите растений / *М.В. Штерншис, Ф.С. Джалилов, И.В. Андреева* [и др.]. – Новоси-бирск, 2003. – 140 с.
36. *Cook R.J.* Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens // *Annual Rev. Phytopathology*. – 1993. – № 31. – P. 53–80.
37. *Hoda A.H., Yomna A. Moustafa and Shadia M. Abdel-Aziz.* In vivo Efficacy of Lactic Acid Bacteria in Biological Control against *Fusarium oxysporum* for Protection of Tomato Plant // *Life Science Journal*. – 2011. – № 8.P. 462–468
38. Ланкина Е.П., Хижняк С.В. Влияние пещерных штаммов бактерий VDR5M и VDR5K на поражение яровой пшеницы корневой гнилью и листовой пятнистостью [Журнал]// *Растениеводство*.
39. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур: методы определения всхожести : Стандартинформ. Москва, 2011. - 64с.
40. Lichtenthaler (1987) Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
41. Walz H. Imaging- PAM M-series Chlorophyll.
42. Бондаренко В. М. // *Фарматека*. 2005. Т. 20, № 115. С. 46–54.
43. 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.
44. Алимова Ф.К. *Trichoderma/Нурокреа (Fungi, Ascomycetes, Нурокреаляс)*: Таксономия и распространение / Ф.К.Алимова. - Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2005. - 328с
45. Алимова, Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*: учебное пособие / Ф. К. Алимова. – Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2006. -209с.
46. 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– 58.
47. 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.

48. Effects of Nitrogen Fertilization and Soil Inoculation of Sulfur-Oxidizing or Nitrogen-Fixing Bacteria on Onion Plant Growth and Yield / *M. Awad Nemat, A.A. Abd El-Kader, M. Attia* [et al.] // International Journal of Agronomy. – 2011. – Vol. 2011. – 6 p.

49. Effect of Using Agro-fertilizers and N-fixing Azotobacter Enhanced Biofertilizers on the Growth and Yield of Corn / *S.H. Peng, W.M. Wan-Azha, W.Z. Wong p*[et al.] // Journal of Applied Sciences. – 2013. – №13. – P. 508–512.

50. Корнеев, Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла/ Д.Ю. Корнеев. – К.: «Альтерпрес», 2002. – 188 с.

51. Bradbury, M. Analysis of the slow phases of the in vivo chlorophyll fluorescence induction curve. Changes in the redox state of photosystem II electron acceptors and fluorescence emission from photosystems I and II. / *M. Bradbury M, N.R. Baker* // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – P. 542–551.

52. Майсурян Н.А. Растениеводство:лабораторно-практические занятия / Н.А.Майсурян - Москва: Колос, 1964, с.64-70.