

Академік НААН України В. П. Патика, Є. П. Копилов,
В. Г. Спиридонов, О. Б. Копилова

Характеристика мікоценозу кореневої зони пшениці ярої за функціональною дією на рослини

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

З кореневої зони пшениці ярої, вирощеної на лучно-чорноземному вилугованому ґрунті, в чисту культуру виділено 328 штамів мікроміцетів, які належали до 15 родів. Виділені гриби були охарактеризовані за дією на рослини: фітопатогенні (37,5%), фітотоксичні (13,7%), а також продуценти біологічно активних речовин (17,4% загальної кількості виділених грибів). Відібрано штами ґрунтових грибів, які можна вважати перспективними продуцентами фітогормональних речовин з ауксиною, гібереліною та цитокініною активністю. Ідентифікація за культурально-морфологічними ознаками, а також з використанням видоспецифічних праймерів дозволила віднести їх до виду *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries.

Ґрунтові гриби відіграють надзвичайно важливу роль у створенні родючості ґрунтів і активно взаємодіють з рослинами. Гриби істотно впливають на ґрунтоутворні процеси, що пов'язано із синтезом специфічних речовин (меланінів, фенолів, гумінових кислот), які входять до складу гумусу. Крім того, завдяки особливостям своєї будови гриби впливають на структуру ґрунту. Так, гіфи здатні адсорбувати на поверхні частинки ґрунту, утворюючи міцні агрегати, що сприяє обміну мінеральної частини ґрунту, перетворенню нерозчинних солей у розчинні, вимиванню деяких елементів.

У ризосфері рослин, де завдяки екзосмосу створюються сприятливі умови як для самих рослин, так і для мікроорганізмів, вміст грибів значно більший, ніж у ґрунті без рослин. Специфіка корневих виділень визначає видовий склад грибів у ризосфері. Так, наприклад, у ризосфері злакових переважають гриби родів *Fusarium*, *Alternaria*, у ризосфері бобових і хрестоцвітих — *Penicillium*. На склад грибних ценозів впливають фізіологічно активні речовини, які виділяються коренями рослин. Мікроорганізми ризосфери, у свою чергу, впливають на рослину через кореневу систему, продукуючи рістрегулювальні речовини [1].

Раніше було досліджено видове різноманіття грибів лучно-чорноземного вилугованого ґрунту кореневої зони такої важливої культури, як пшениця яра [2].

Наша мета — охарактеризувати склад грибного ценозу кореневої зони пшениці ярої за функціональною дією на рослини, виявити фітопатогенні і фітотоксичні форми мікроміцетів, а також гриби, що здатні продукувати рістрегулювальні речовини.

Матеріали і методи. Зразки ґрунту для виділення грибів відбирали з орного шару (0–20 см) ризосфери і ризоплани пшениці ярої сорту Рання 93, яку вирощували в польовому досліді на дослідному полі Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України, у фазу цвітіння. Ґрунт — чорнозем вилугований неглибокий легкосуглинковий на лесоподібних суглинках, який характеризувався такими агрохі-

мічними показниками: вміст гумусу в орному шарі становив 3,6%, рухомих форм фосфору (за Кірсановим) — 210–240 мг P_2O_5 , обмінного калію (за Кірсановим) — 160–170 мг K_2O на 1 кг ґрунту, pH_{H_2O} — 6,5.

Відбір ґрунтових зразків, виділення, облік і культивування грибів здійснювали за загальноприйнятими методиками [3]. Культурально-морфологічні ознаки грибів вивчали на сусло-агарі, агаризованому середовищі Чапека та картопляно-глюкозному агарі. Їх ідентифікацію проводили за відповідними для конкретної систематичної групи мікроміцетів визначниками [4–10].

Стимулювання коренеутворення у живців квасолі під впливом фітогормональних речовин ґрунтових грибів вивчали за методом Р. Х. Турецької [11]. Гіберелінову і цитокінінову активність визначали за методами, описаними в методичних рекомендаціях [12]. Фітотоксичні властивості ґрунтових грибів вивчали методом біотестів на насінні і проростках рослин [3], для чого гриби вирощували на пивному суслі з масовою часткою сухих речовин від 3 до 4% і середовищі Чапека протягом 10 діб при 26–28 °С.

Ідентифікацію грибів роду *Cladosporium* проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи видоспецифічні праймери.

Для виділення зразка ДНК колонії штамів мікроміцетів, вирощених на сусло-агарі, ресуспендували у 500 мкл лізис-буфера (гуанідинтіоціанат — 49%, трис-НСІ (рН 6,4) — 50 мМ, ЕДТА (рН 8,0) — 20 мМ, тритон X-100 — 1%).

Адсорбування фрагментів ДНК проводили з використанням ДНК-сорбенту “Силіка”. Суміш фрагментів ДНК із сорбентом центрифугували 1 хв при 5000 об/хв та видаляли супернатант. До осаду, що залишився, додавали 300 мкл розчину для відмивання (гуанідинтіоціанат — 55% та трис-НСІ (рН 6,4) — 50 мМ), перемішували і центрифугували 1 хв при 5000 об/хв. Супернатант видаляли. Потім осад відмивали шляхом додавання 500 мкл розчину, який складався з 96%-го етанолу — 80%, трис-НСІ (рН 7,5) — 10 мМ, перемішували і центрифугували 1 хв при 10 000 об/хв. Супернатант видаляли і процедуру повторювали ще один раз. Осад, який залишився, підсушували протягом 5 хв при 65 °С, до нього додавали 100 мкл ТЕ-буфера (трис — 242,28 г, льодяна оцтова кислота — 57 мл, 0,5 М ЕДТА (рН 8,0) — 100 мл, дистильована вода — 1000 мл). Суміш перемішували і витримували в термостаті при 65 °С протягом 5 хв. Після термостатування суміш ще раз перемішували і центрифугували 15 хв при 14 000 об/хв. Одержаний розчин ДНК переносили в пробірки ємністю 0,5 мл і зберігали при –20 °С.

ПЛР здійснювали за допомогою видоспецифічних праймерів, які відповідали консервативним позиціям на 3'- і 5'-кінцях гена 16S рРНК.

Для підтвердження видової належності штамів грибів до виду *Cladosporium cladosporioides* використовували праймери Cclad1F1 : 5'-CATTACAAGTGACCCCGGTCTAAC (Forward primer), CcladR1 : 5'-CCCCGGAGGCAACAGAG (Reverse primer). Робоча концентрація праймерів становила 5 пМ/мкл. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою приладу Applied Biosystems з використанням робочих розчинів праймерів (10 мкл 16SF, 10,4 мкл 16SR та 29,6 мкл деіонізованої води). Реакційна суміш для ПЛР складалася з 5 мкл ПЛР-буфера, 2,5 мкл дНТФ, 1 мкл суміші праймерів, 0,2 мкл *Taq* ДНК-полімерази і 1 мкл зразка ДНК. ПЛР проводили протягом 35 циклів (94 °С — 20 с, 55 °С — 20 с, 72 °С — 30 с).

Визначення отриманих ПЛР-продуктів здійснювали за допомогою сиквенування на автоматичному капілярному сиквенаторі Applied Biosystems ABI Prism 3130.

Порівняння отриманих результатів сиквенсу 16S рРНК із даними сиквенсів, що знаходяться в базі даних Gen Bank, проводили за допомогою BLAST-аналізу.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень з кореневої зони пшениці ярої в чисту культуру було виділено 339 штамів грибів, які належали до 15 родів. За видовим різноманіттям домінував рід *Penicillium* (17 видів), у значно меншій кількості були представлені роди *Fusarium* (6 видів, 3 різновидності), *Trichoderma* (3 види), *Acremonium* (2 види), *Mucor* (2 види) і в найменшій (лише по одному виду) — *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Bionectria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Hypocrea*, *Mortierella*, *Phialophora*, *Rhizopus*.

Виділені з кореневої зони пшениці ярої ґрунтові гриби вивчали на здатність виявляти фітотоксичну активність. Аналіз одержаних даних показав, що утворення фітотоксичних речовин притаманне представникам різних родів грибів. Усього фітотоксична активність виявлена у 45 штамів грибів, які належали до 13 видів 8 родів, що становило 13,7% загальної кількості вивчених грибів (табл. 1).

За чисельністю і різноманіттям токсичних форм домінував рід *Fusarium* Link. Число фітотоксичних штамів цього роду становило 40,0% загальної кількості виділених грибів з фітотоксичною активністю. Наступними за кількістю токсинуотворювачів та їхнім видовим різноманіттям були *Penicillium* Link (33,3%), *Gliocladium* Corda (6,7%), *Mucor* Micheli ex Fries (4,4%), *Rhizopus* Ehrenb (4,4%) та ін. Найбільш високу фітотоксичну активність виявляли види *Acremonium charticola* (Lindau) W. Gams, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem., *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans., *F. oxysporum* var. *orthoceras* (Appl. et Wr.) Bilai, *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *Gliocladium viride* Matr., *Mucor circinelloides* van Tiegh., *Penicillium restrictum* Gilman et Abbott, *P. spinulosum* Thom. (Syn. *Penicillium corylophilum* Dierckx, *Penicillium citreovirens* S. Abe), *P. steckii* Zaleski, *P. variable* Sopp, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. (Syn. *Rhizopus nigricans* Ehrenb.).

Таким чином, основними продуцентами фітотоксичних речовин серед грибів, виділених з кореневої зони рослин пшениці ярої, були представники родів *Penicillium*, *Fusarium*, *Gliocladium*.

Результати вивчення видового складу грибів, виділених з уражених кореневими гнилями рослин пшениці ярої, засвідчили, що в патогенному комплексі переважали представники роду *Fusarium*, а саме: *Fusarium culmorum* (W. G. Sm) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans., *F. oxysporum* var. *orthoceras* (Appl. et Wr.) Bilai, *F. heterosporum* Nees: Fries, *F. sambucinum* var. *minus* Wollenw. Траплялися також *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (syn. *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram, *Helminthosporium sativum* Pammel, King et Bakke) і, зрідка, *Pseudocercospora herpotrichoides* (From) Deighton. Щодо фітотоксичних властивостей фітопатогенних грибів — збудників корневих гнилей пшениці ярої, то всі вони утворювали речовини, які пригнічували ріст і розвиток рослин.

Таблиця 1. Фітотоксичні властивості грибів, виділених з кореневої зони пшениці ярої

Рід грибів	Кількість виділених штамів	З них фітотоксичних	
		кількість	%
<i>Acremonium</i> Link	26	1	3,8
<i>Fusarium</i> Link	126	18	14,3
<i>Gliocladium</i> Corda	10	3	30,0
<i>Mucor</i> Micheli ex Fries	13	2	15,3
<i>Penicillium</i> Link	75	15	20,0
<i>Rhizopus</i> Ehrenb.	7	2	28,5
Інші	71	4	5,6
Всього	328	45	13,7

Важлива і різноманітна роль грибів в утворенні біологічно активних сполук, які сприяють росту і розвитку рослин. Серед стимуляторів росту рослин традиційно виділяють п'ять груп речовин: ауксини, гібереліни, цитокініни, етилен і абсцизову кислоту, які загалом розглядаються як фітогормони. Фітогормони беруть участь у координації різних фізіологічних процесів у рослин, регулюють стан спокою і проростання насіння, впливають на утворення коренів, цвітіння і дозрівання плодів. Вони підвищують резистентність рослин щодо несприятливих факторів навколишнього середовища, індукують або, навпаки, пригнічують експресію генів і біосинтез деяких ферментів, пігментів і метаболітів [13, 14].

Багато видів ґрунтових мікроорганізмів здатні синтезувати фітогормони. Інтерес до вивчення мікроорганізмів-продуцентів фітогормонів і гормоноподібних речовин викликаний як тим, що за допомогою утворюваних ними сполук здійснюється взаємодія клітин, тканин та органів рослинного організму, так і тим, що вони є специфічними посередниками у взаємодії між рослинами і мікроорганізмами, що важливо для становлення і розвитку відносин всередині природних угруповань [13].

Для мікроорганізмів, крім зазначених п'яти основних груп фітогормонів, характерна також здатність синтезувати й інші гормоноподібні речовини, а саме: брасиностероїди, олігосахарини, саліцилову і жасмонову кислоти. Гормони і гормоноподібні речовини, які синтезуються мікроорганізмами, не тільки впливають на рослини, стимулюючи або гальмуючи їхній ріст і фізіологічну активність, а й гармонізують формування і функціонування симбіотичної або асоціативної системи мікроорганізм-рослина.

Первинний скринінг культур грибів, здатних продукувати біологічно активні речовини, проводили за допомогою біотестів, використовуючи насіння та проростки сільськогосподарських культур (табл. 2).

Одержані за результатами скринінгу штами грибів — продуцентів рістстимулювальних речовин досліджували на здатність продукувати ауксини, гібереліни та цитокініни, використовуючи специфічні біотести. Встановлено, що за ауксиновою, гібереліновою і цитокініновою активністю представники роду *Cladosporium* значно переважали всі інші гриби. Найбільшою здатністю продукувати речовини фітогормональної природи відзначалися штами *Cladosporium* sp. 359 та *Cladosporium* sp. 495.

Наступний етап роботи полягав у проведенні ідентифікації отриманих перспективних штамів мікроміцетів.

За результатами морфолого-культуральних досліджень штамів *Cladosporium* sp. 359 і *Cladosporium* sp. 495 встановлено, що колонії грибів на суслловому агарі розпростерті, бар-

Таблиця 2. Ґрунтові гриби-продуценти біологічно активних речовин фітогормональної дії

Рід грибів	Кількість виділених штамів	З них продуцентів біологічно активних речовин	
		кількість	%
<i>Acremonium</i> Link	26	6	23,1
<i>Chaetomium</i> Kunze	2	1	50,0
<i>Cladosporium</i> Link	4	4	100,0
<i>Fusarium</i> Link	126	22	17,5
<i>Penicillium</i> Link	75	8	10,7
<i>Trichoderma</i> Pers.	6	6	100,0
Інші	100	12	12,0
Всього	339	59	17,4

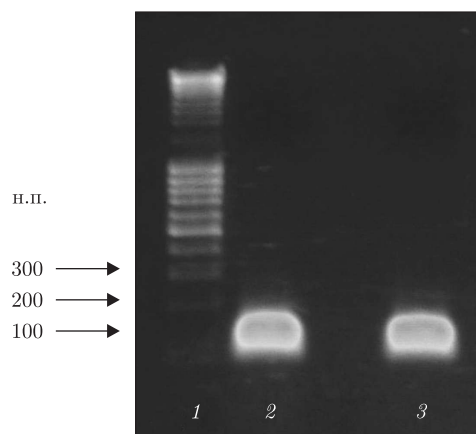


Рис. 1. Результати ПЛР з видоспецифічними олігонуклеотидними праймерами. 1 — маркер молекулярної маси MassRulerDNA Ladder Mix SM0403; 2 — *Cladosporium* sp. 495; 3 — *Cladosporium* sp. 359

хатисті, від маслиново-зелених до маслиново-коричневих, зворотна сторона колонії маслиново-чорна. Конідієносці різної довжини, до 350 мкм, 2–6 мкм завтовшки, середньомаслинові, коричневі, гладкі. Базальні конідії одноклітинні, трапляються з однією перегородкою, 18–22 мкм завдовжки, 3,0–4,0 мкм завтовшки, гладкі. Конідії у довгих гіллястих ланцюжках, одноклітинні, від еліптичної до лимоноподібної форми, 5–8 × 3–4 мкм, маслиново-коричневі, гладкі, трапляються слабошорсткуваті.

Отже, за морфолого-культуральними ознаками зазначені штами грибів можна віднести до виду *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries [4, 15].

Для підтвердження або відхилення висновків за результатами вивчення морфолого-культуральних ознак відібраних сапрофітних грибів і їх ідентифікації були проведені молекулярно-генетичні дослідження.

Відомо, що для ідентифікації видів грибів використовуються внутрішні ділянки транскрипції спейсерів ядерної рибосомальної РНК.

В результаті проведення ПЛР-реакції було одержано фрагменти РНК, які розділяли за допомогою електрофорезу в 1,2% агарозі (рис. 1). Використання маркера MassRulerDNA Ladder Mix SM0403 дало можливість встановити, що довжина всіх отриманих фрагментів була в межах від 80 до 100 н. п. В табл. 3 наведено результати порівняльного аналізу нуклеотидних послідовностей 18S рРНК виділених штамів *Cladosporium* sp. 359 та *Cladosporium* sp. 495 з аналогічними послідовностями референс-штамів з бази даних GenBank.

Аналіз одержаних даних щодо морфолого-культуральних ознак, а також результати молекулярно-генетичного вивчення виділених штамів ґрунтових сапрофітних грибів *Cladosporium* sp. 359 і *Cladosporium* sp. 495 свідчить про те, що зазначені штами належать до виду *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries.

Таким чином, виділені з кореневої зони пшениці ярої ґрунтові гриби охарактеризовані за дією на рослини. Виявлено фітопатогенні (37,5%), фітотоксичні (13,7%) мікроміцети, а також гриби-продуценти біологічно активних речовин (17,4% загальної кількості виділених грибів).

Відібрано перспективні штами ґрунтових грибів, що позитивно впливають на ріст і розвиток рослин і які можна вважати перспективними продуцентами фітогормональних речовин з ауксиною, гібереліною та цитокініною активністю. Ідентифікація відібраних

Таблиця 3. Ідентичність сиквенованих фрагментів 18S рРНК виділених штамів роду *Cladosporium* із сиквенсами референс-штамів грибів з бази даних GenBank

Досліджуваний штам	Вид гриба та його номер у GenBank	Ідентичність, %
<i>Cladosporium</i> sp. 359	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , FJ556911.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain M1, FJ556908.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain T4B1c.9P, FJ490621.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain T3B1c.10P, FJ490620.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain NIOCC F8, EU729712.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain MD-2, EU375523.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain STE-U 3683, AY251074.2	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain MUCC552, EU301111.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain MUCC217, EU301110.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain ST1, DQ780410.1	100
<i>Cladosporium</i> sp. 495	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , FJ556911.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain M1, FJ556908.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain T4B1c.9P, FJ490621.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain T3B1c.10P, FJ490620.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain NIOCC F8, EU729712.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain MD-2, EU375523.1	100
<i>Cladosporium</i> sp. 495	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain STE-U 3683, AY251074.2	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain MUCC552, EU301111.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain MUCC217, EU301110.1	100
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain ST1, DQ780410.1	100

штамів за культурально-морфологічними ознаками, а також з використанням видоспецифічних праймерів дозволила визначити їх належність до виду: *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries.

1. Мирчинк Т. Г. Почвенные грибы как компоненты биогеоценоза // Почвенные организмы как компоненты биогеоценоза. – Москва: Наука, 1984. – С. 114–130.
2. Копилов Є. П. Видове різноманіття мікроміцетів лучно-чорноземного вилугованого ґрунту кореневої зони пшениці ярої // Агроекологіч. журн. – 2010. – № 3. – С. 55–59.
3. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В. И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 549 с.
4. Пидопличко Н. М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель: В 3 т. – Киев: Наук. думка, 1977. – Т. 1. – 295 с.
5. Билай В. И. Фузариин. – Киев: Наук. думка, 1977. – 444 с.
6. Пидопличко Н. М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель: В 3 т. – Киев: Наук. думка, 1978. – Т. 3. – 296 с.
7. Милько А. А. Определитель мукоральных грибов. – Киев: Наук. думка, 1974. – 303 с.
8. Пидопличко Н. М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель: В 3 т. – Киев: Наук. думка, 1977. – Т. 2. – 300 с.
9. Пидопличко Н. М. Пеницилли (Ключи для определения видов). – Киев: Наук. думка, 1972. – 150 с.
10. Кириленко Т. С. Определитель почвенных сумчатых грибов. – Киев: Наук. думка, 1978. – 264 с.
11. Турецкая Р. Х. Физиология корнеобразования у черенков и стимуляторы роста. – Москва: Наука, 1961. – 318 с.
12. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – Киев, 1988. – 78 с.
13. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – 42, No 3. – С. 161–168.
14. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Там же. – 2006. – 42, № 2. – С. 133–143.

15. De Hoog G. S., Guarro J., Figueras M. J., Gené J. Atlas of clinical fungi. – 2nd ed. – Utrecht; Reus, 2000. – 1126 p.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ
Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН України, Чернігів
Національний університет біоресурсів
і природокористування України, Київ

Надійшло до редакції 03.04.2012

Академик НААН Украины В. Ф. Патыка, Е. П. Копылов, В. Г. Спиридонов,
О. В. Копылова

Характеристика микоценоза корневої зони ярової пшениці по функціональному воздействию на растения

*Из корневой зоны яровой пшеницы, выращенной на лугово-черноземной выщелоченной почве, в чистую культуру было выделено 328 штаммов микромицетов, относящихся к 15 родам. Полученные штаммы охарактеризованы по действию на растения: фитопатогенные (37,5%), фитотоксические (13,7%), а также продуценты биологически активных веществ (17,4% общей численности выделенных штаммов). Отобраны штаммы почвенных грибов, которые можно считать перспективными продуцентами фитогормональных веществ с ауксиновой, гиббереллиновой и цитокининовой активностью. Идентификация по культурально-морфологическим признакам, а также с использованием видоспецифических праймеров позволила отнести их к виду *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries.*

Academician of the NAAS of Ukraine V. P. Patyka, E. P. Kopilov,
V. G. Spiridonov, O. V. Kopilova

Description of spring wheat root zone mycocenosis by its functional impact on plants

*328 fungi strains related to 15 genera are isolated into pure culture from the spring wheat root zone grown up on leached chernozem meadow soil. The obtained strains are described by their impact on plants. Among soil fungi in the spring wheat root zone, 37.5% of strains have been identified as phytopathogenic, 13.7% — as phytotoxic, and 17.4% — as producers of biologically active substances. The selected strains of soil fungi are considered as perspective producers of phytohormonal substances with the auxin, gibberellin, and cytokinin activities. Identification of the strains by morphological and cultural features with the use of species-specific primers allows us to rank them to *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries.*