

# НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Ф.К. Алимова, Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина

В Республике Татарстан биологический метод защиты растений занимает около 30% защитных мероприятий. Уже с 1960-х гг. во всех тепличных хозяйствах республики интенсивно применяют биопестицид Триходермин на основе гриба *Trichoderma*. Начиная с 1980-х гг. учеными кафедры микробиологии КГУ начаты исследования по изучению распространения *Trichoderma* в агроценозах и почвах республики и работы по организации коллекции наиболее перспективных для сельскохозяйственной биотехнологии изолятов. Наибольшие успехи достигнуты при использовании экологичных биопестицидов на основе аборигенных изолятов *Trichoderma* в тепличных хозяйствах Татарстана на различных овощных и декоративных культурах против широкого спектра фитопатогенов.

В практике применения биопрепаратов для защиты растений до настоящего времени часто бытуют неверные представления по данному вопросу. В частности, считается, что биопрепараты менее эффективны и доступны, чем химические пестициды, а биопрепарат, введенный в почву или ризосферу, не способен влиять на фитопатогены в течение длительного периода времени. Поэтому биопрепараты эффективны для защиты семян от болезней проростков, но бесполезны для защиты растений в период вегетации. Считается также, что один биоконтрольный агент не может быть эффективен в различных условиях, на различных культурах и против широкого спектра патогенов, поэтому лучше применять смешанные препараты, а механизм действия биоконтрольного агента очень прост и контролируется только одним или несколькими генами и генными продуктами. Некоторые специалисты уверены, что регистрация биопрепарата — процесс легкий, недорогой и простой.

Если исследователи принимают частично или полностью на веру такие утверждения, то они, несомненно, будут оказывать влияние на развитие систем биозащиты в сельском хозяйстве. Ниже мы опровергаем эти утверждения.

Мнение о том, что биопрепараты менее эффективны и доступны, чем химические пестициды, ошибочно. Действительно, сторонники биологического земледелия стремятся внедрить биопрепараты в систему, в которой пестициды занимают прочное положение и были более экономичными. Другими словами, они старались внедрить биопрепараты по схеме внедрения химических средств защиты. Но на международном рынке уже существует множество эффективных пестицидов для защиты семян, часто более дешевых; пестициды сохраняются на семенах дольше, чем биопрепараты, а химические средства более эффективно защищают семена при разных погодных условиях.

Однако в сельском хозяйстве существуют ситуации, в которых биопрепараты могут быть более привлекательными, чем химические пестициды. Например, биопрепаратами можно заменять фунгициды с низкой эффективностью, к которым у патогенов развилась резистентность и которые не могут заменить другие химические средства. Замена или частичная замена биопестицидами опасных для окружающей среды химических пестицидов, применение биопрепаратов там, где использование химических средств невозможно. Наконец, без биологической защиты невозможно ведение биологического (органического) сельского хозяйства. Следовательно, необходимо внедрять не только биопрепараты, но и новые концепции, которые бы заменили традиционные подходы. Однако на практике часто не ясно, как это сделать.

В нашей работе мы разрабатывали новые биопрепараты для защиты различных видов растений от широкого спектра фитопатогенов как на стадии семян, так и по вегетации на большом количестве культур, а также новые системы их применения. Нами разработана система получения и применения препарата, совмещающая в себе свойства био-пестицида, биоудобрения и препарата для биоремедиации. Особенно успешные результаты получены при добавлении в препарат твердых органических или неорганических сорбентов.

Первая ниша, указанная нами выше, наиболее очевидна, и подобная ситуация часто приводится в качестве причины использования биопрепаратов вместо слишком «тяжелых» пестицидов, т.е. как более привлекательная альтернатива. В качестве примера можно привести борьбу с гнилью растений, вызываемых *Botrytis cinerea*. Для контроля этого фитопатогена используют только несколько химических фунгицидов, к которым уже появились резистентные штаммы. На мировом рынке представлено несколько биопрепаратов, являющихся аналогами Триходермина, которые могут быть альтернативой химическим средствам: ТопШилд (на основе *T. harzianum* T-22) и Триходекс (*T. harzianum* T-39).

Вторая ниша — это замена опасных для окружающей среды пестицидов. Сельскохозяйственные рынки различаются по приоритетам, с точки зрения продаж химических пестицидов. Для большинства современных хозяйств, производящих зерновые, несмотря на наметившийся переход к биологическому земледелию, более выгодно применять химические средства. Однако тепличные хозяйства придерживаются более строгих мер по отношению к пестицидам. Международным законодательством (ЕРА) и законом, принятым в РФ (от 1991 г.), введены строгие меры безопасности для рабочих тепличных хозяйств, в частности запрещающие в ряде случаев применение химических средств защиты растений. При использовании зарегистрированных биопрепаратов, не опасных для человека, поскольку они не обнаружены в продуктах питания, было показано, что время восстановления здоровья персонала составило 0 ч. Данный фактор сделал биопестициды привлекательными для многих растениеводов. В будущем, когда они будут стоить столько же, сколько и химические средства, но будут не менее эффективными, чем в закрытых системах (тепличные хозяйства, питомники), биопестициды полностью заменят химические препараты. Можно привести несколько примеров, когда потребители пестицидов чаще останавливают свой выбор на биопрепаратах. В России такими объектами могут быть производственные, коллективные и индивидуальные сады, водоохраные и санитарно-курортные зоны, государственный лесной фонд, природоохраные и припасечные территории, районы производства сельскохозяйственной продукции для детского питания и возделывания лекарственных растений, овощехранилища и элеваторы.

Третья ниша. Действительно показано, что биопрепараты могут иметь преимущества по сравнению с пестицидами. Лучшими примерами могут быть ризосфероконпетентные штаммы, которые колонизируют подземную часть растений и обеспечивают защиту, по крайней мере, однолетних растений. Более того, биологи могут производить

биопрепараты на местах, в биологических хозяйствах и станциях защиты растений непрерывно, например, с помощью доступного для каждого хозяйства оборудования. Химические пестициды надо заранее закупать, складировать и только потом вносить. За счет местного производства стоимость биопрепарата резко снижается. Так, предпосевная обработка клубней картофеля, проведенная нами в 2003—2005 гг. биопрепаратом на основе *Trichoderma*, обошлась в 50 руб./га, а обработка пестицидом для аналогичного участка — в 400 руб./га. Результаты по пораженности фитофторозом после обработки биопрепаратом и фунгицидом оказались сопоставимы. Однако после биопрепарата получена экологичная продукция, в агроценозах нами было отмечено снижение численности резистентных фитопатогенов и восстановление супрессивности.

Еще одна ниша предполагает использование биопестицидов для биологического земледелия и является конечной целью всех производителей биопрепаратов. Следует отметить, что биопестициды автоматически не квалифицируются в качестве пригодных для биологического земледелия и требуется сертификация каждого нового микроорганизма, используемого для защиты растений.

Следовательно, важно выбрать подходящую систему производства биопрепарата, если целью является его коммерциализация. Проигрышная ситуация для биопрепаратов складывается в нише, где доступны недорогие химические пестициды и отсутствуют дотации на биопрепараты.

Еще одно ошибочное представление состоит в том, что только один биоконтрольный агент, введенный в почву или в ризосферу, не способен влиять на широкий спектр фитопатогенов в течение длительного периода времени. В результате биопестициды эффективны для защиты семян и болезней проростков, но бесполезны для защиты растений по вегетации.

Действительно, во многих опубликованных работах отмечается, что биоконтрольные агенты «способны временно доминировать только в локальных зонах ризосферы только в определенных почвах и сезонах...», все коммерческие биопестициды активны как антагонисты только при внесении «прямо в зону инфекции, где они и нужны». Иными словами, если целью препарата является защита семян, то его применение будет обеспечивать только защиту семян и, возможно, благодаря этому будет увеличивать жизнеспособность проростков. Однако такое толкование помещает биопрепарат в ряд химических препаратов, с которыми трудно достичь коммерческого успеха.

В настоящее время известно, по крайней мере, два механизма биологического контроля у грибов рода *Trichoderma*: ризосферная компетентность и индуцированная системная резистентность (SAR), которые обеспечивают долговременную защиту на значительном удалении от зоны инфекции.

Увеличение урожайности растений отмечается вследствие колонизации микроорганизмами корней растений. Нами было отмечено, что после обработки семян конидиями *Trichoderma* или внесения их непосредственно в почву интродуцированные конидии успешно колонизировали поверхность корней, увеличивая их всасывающую поверхность и создавая биологический барьер для фитопатогенов. Наблюдаемый эффект чаще всего не зависел от типа почвы или географической локализации испытываемой культуры. Количество жизнеспособных пропагул интродуцированного гриба *Trichoderma* и статус доминирующего вида сохранялся в течение всего сезона, а иногда и нескольких лет. Важно отметить, что исследуемый нами штамм *Trichoderma* был способен колонизировать корни растений в различных типах почв с различным pH и содержанием гумуса. Полная колонизация корней происходила, когда пропагулы *Trichoderma* вносили при обработке семян, или в гранулированном виде на поверхность вспаханной почвы, или при вспашке и рыхлении, а также при добавлении гранул препарата в почвенные смеси для теплиц, или в виде суспензии конидий в посадочную почву в теплице. Во всех случаях грибы проявляли хемотаксис и росли в сторону новой формирующейся корневой поверхности растения.

Вследствие колонизации ризосферы грибами рода *Trichoderma*, происходило подавление болезней растений, ускорение роста, увеличение урожайности, повышение устойчивости к заболеваниям. Возможно, что интродуцируемые штаммы *Trichoderma* воздействуют на метаболизм растений. Таким образом, можно сказать, что штаммы *Trichoderma* способствуют увеличению размера корневой системы, роста и жизнестойкости растений путем контроля ризосферной микрофлоры и влияя на обмен растения. На опытном поле урожайность кормовой кукурузы была в 1,7 раза выше, чем в контроле. Опыт показал, что ризосферный эффект является реальным фактом и может проявляться как долговременная колонизация ризосферы, что влияет на количественное улучшение отдельных показателей развития растения. Так, на глубине 25 см количество корневых отростков у кукурузы на корнях в опытном варианте в 2 раза превышало количество отростков в контроле. Увеличение плотности корневой системы на глубине чрезвычайно выгодно для растений кукурузы и других культур, особенно в засушливые сезоны. В таких условиях колонизация корней штаммом *Trichoderma* снижает чувствительность растений к засухе. Для достижения максимальной урожайности в присутствии биопрепарата на основе *Trichoderma* требуется на 38% меньше азота в почве, чем в контроле.

Биопрепарат на основе видов *Trichoderma* перспективен для интегрированной защиты в полевых условиях, т.к. практически ни один фунгицид не был особенно токсичен в производственных дозах или наблюдалась быстрая приобретенная резистентность, что во многих случаях позволяло применять смешанные препараты (пестицид — биопестицид) для интегрированной защиты семян. Нами было показано, что грибы рода *Trichoderma* с ризосферным эффектом могут обеспечивать долговременную защиту даже при однократном применении в начале сезона, сохраняются на корнях, способны пролиферировать вместе с растущей корневой системой и оставаться жизнеспособными, по крайней мере, во время всей вегетации культуры. Таким образом, биологические препараты могут быть более эффективны, чем химические, в защите корней и ускорении роста растений. Эффективность резко возрастала, если при весенней обработке яровых культур и сеянцев сосны в условиях, когда температура почвы не превышала 15°C, мы использовали местные психрофильные изоляты. В этом случае температурная, субстратная и другие ниши фитопатогенов и антагониста совпадали. Эффективность от протравливания в этом случае резко возрастала. Нами показано, что биопрепараты эффективны против широкого спектра фитопатогенов и снижают пораженность семян и корней, в т.ч. и в период вегетации.

Мнение, что один биоконтрольный агент не может быть эффективен в различных условиях, на различных культурах и против широкого спектра фитопатогенов и лучше применять смешанные препараты для защиты разных культур в различных условиях, ошибочно. Многие ученые придерживаются мнения о том, что биоконтроль высоко специфичен для каждого вредителя или болезни и не может быть эффективным в различных условиях, поэтому рекомендуется использовать смесь нескольких биоконтрольных агентов. Это мнение не подтверждается нашими и другими экспериментами, по крайней мере, для рода *Trichoderma*. Большое число научных работ показывает, что отдельные штаммы рода *Trichoderma* способны контролировать различные фитопатогены. Так, нами в опытах *in vivo* и *in vitro*

показано, что аборигенные штаммы *Trichoderma*, выделенные на территории Татарстана, эффективны более чем против 10 видов местных рас фитопатогенов (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Botrytis* и др.) и на широком спектре растений (различных сортах огурца, томата, капусты, перца и декоративных культур, семян сосны, зерновых и зернобобовых культур). Однако существует много фитопатогенов, устойчивых к действию *Trichoderma*. Результаты исследований по регуляции пораженности растений фитопатогенами в отдельных случаях были сопоставлены с действием пестицидов. Разработаны биопрепараты на основе одного вида и сообщества различных видов микроорганизмов: двух вегетативно совместимых видов *Trichoderma*, одного вида *Trichoderma* с фосфатрастворяющими и молочнокислыми бактериями, а также diaзотрофами (*Azotobacter* и *Rizobium*). Эффективны были биопрепараты на основе одного и смешанных культур. В биопрепаратах в качестве сорбентов использовали органические отходы растительного и животного происхождения. Нами получены и испытаны пестицидустойчивые штаммы для интегрированной системы защиты растений и биоудобрения на основе промышленно-бытовых и городских отходов с интродуцированными видами *Trichoderma*, разработана система биокомпостирования. Исследована возможность использования биопрепаратов на фоне различных агротехнических систем, и в частности No till технологий.

Смесевой препарат может быть очень выгоден по экономическим соображениям, т.к. его более выгодно регистрировать. Другими словами, можно достичь положительного эффекта при применении биопрепарата на основе одного микроорганизма.

Биопрепараты на основе *Trichoderma* способны подавлять возбудителей не только семенной, корневой и почвенной инфекции, но и развитие болезней плодов и листьев при нанесении препарата на поверхность этих структур. Препарат может быть эффективным против мучнистой росы (*B. cinerea*) в теплице, милдью, возбудителей болезней газонных трав, таких, как бурая пятнистость (*R. solani*), *Pythium spp.* и талерные бляшки (*S. homoeocarpa*). Для борьбы с такими фитопатогенами конидии *Trichoderma* следует вносить каждые 10 дн. При высокой заболеваемости *Trichoderma* может колонизировать новые здоровые листья, плоды и цветы, зрелые ягоды, прорасти на цветах, но не на листьях клубники. Получены интересные результаты о перенесении профаг *Trichoderma* пчелами, т.к. конидии *Trichoderma* меньше по размеру, чем пыльца, поэтому они прилипают к тельцу пчелы, как пыльцевые зерна. Пчелы при вылете из улья и входе в улей контактируют с материалом, содержащим споры *Trichoderma*. Они переносят достаточное количество конидий на цветы клубники, огурца и других растений. Нами также подтверждена эффективность применения такого способа распространения спор гриба в теплицах с целью обработки растений по вегетации против *B. cinerea* и мучнистой росы. Такой способ распространения *Trichoderma* был более эффективен, чем опрыскивание биопрепаратом или фунгицидом. Однако существуют некоторые ограничения для использования биопрепаратов на основе *Trichoderma*: они являются превентивными, т.к. чаще всего не способны контролировать уже развившиеся заболевания. Нами отмечено, что развитие изолятов *Trichoderma* подавляется при высоком популяционном уровне фитопатогенов. Биопрепараты можно использовать только в определенных границах или как часть общей стратегии. В этом случае рекомендуется применять системные фунгициды. Биопрепараты на основе *Trichoderma* менее эффективны против системных заболеваний, чем против местных (например, они эффективны против фузариозной корневой плесени, но не активны против фузариозного вилта), на фоне высокой инфекционной нагрузки. Биопрепараты на основе *Trichoderma* можно применять только как часть интегральной системы контроля (химико-биологической системы). Во всех случаях для получения максимального урожая требуется использовать как биологические, так и химические агенты. Например, протравливание семян одновременно фунгицидом и пестицидустойчивым биопрепаратом на основе *Trichoderma* приводит к колонизации корней растения и повышает эффективность биопрепарата. Создается общая картина положительного влияния *Trichoderma* на рост растений и урожайность, хотя это происходит не везде и не всегда. *Trichoderma* обеспечивает устойчивость к различным стрессам. В оптимальных условиях для роста растений визуальные эффекты от влияния изолятов *Trichoderma* не видны.

Таким образом, *Trichoderma* представляет собой эффективный биоконтрольный агент, который улучшает рост растений. В последние годы исследования многих ученых были посвящены изучению механизмов, посредством которых действуют *Trichoderma*.

Ошибочное мнение о том, что механизм действия биоконтрольного агента очень прост и контролируется только одним или несколькими генами и генными продуктами, опровергнуто последними исследованиями. Если механизмы действия *Trichoderma spp.* просты и ограничены, то каждый штамм способен контролировать только один специфический фитопатоген на специфическом растении. Однако биоконтроль обеспечивается многими генами, многими метаболитами и несколькими механизмами, и мы вправе ожидать, что каждый биоконтрольный механизм будет обладать разнообразными полезными свойствами. Такая концепция действия каждого биопрепарата будет оказывать влияние на его использование. Грибы рода *Trichoderma* широко представлены в почве, чаще в супрессивной, поскольку успешно размножаются в корневой зоне здоровых растений. При отсутствии здоровых корней популяция *Trichoderma* снижается. Вероятно, некоторые виды гриба этого рода являются оппортунистическими колонистами ризосферы или даже симбионтами растений. Если это так, то приходится признать, что грибы должны были разработать много механизмов, которые обеспечили их существование в данной экологической нише, т.е. на здоровых корнях. К этим механизмам относят: микопаразитизм, антибиоз, конкуренцию за питательные вещества и за пространство, устойчивость к стрессам благодаря улучшению состояния корневой системы всего растения, индуцированную резистентность, способность к переводу в растворимые и доступные для растений формы неорганических ионов, инактивацию ферментов фитопатогенов. Первые три механизма являются самыми важными для всех грибов, и они описаны достаточно полно. Другие механизмы описаны гораздо хуже.

Микопаразитизм считают самым важным механизмом действия биоконтрольных грибов рода *Trichoderma*. Показано, что регуляция микопаразитизма осуществляется многими генами и генными продуктами. Каждая функциональная ферментная группа представлена несколькими ферментами, различающимися по своим свойствам. Описано более 10 отдельных хитинолитических ферментов, установлена дивергентность и для  $\beta$ -1,3-глюканаз и протеаз. Регуляция каждой ферментной системы осуществляется по-разному, что делает регуляцию микопаразитизма чрезвычайно сложным процессом. Первый этап микопаразитизма обеспечивается более чем 20 генами и генными продуктами и регулируется сложными механизмами. Большинство генов синергичны друг другу. Сложный синергичный регуляторный механизм необходим только для осуществления атаки видов *Trichoderma* против других фитопатогенов. Неудивительно, что этот род объединяет много грибов, способных контролировать фитопатогенные грибы.

Описано более 100 антибиотиков, выделяемых грибами рода *Trichoderma*. Антибиотики действуют синергично со многими ферментами, разрушающими клеточную стенку грибов. Долгое время считали, что антибиотики, выделяемые

биологически активными видами *Trichoderma*, также обеспечивают их биоконтрольную активность. Однако получены мутанты, лишенные многих важных антибиотиков, но тем не менее сохранившие высокую биоконтрольную активность. Было сделано предположение, что «существуют молчащие метаболические пути, гены которых в норме не экспрессируются...». Мутации могут привести к «включению» регуляторных факторов, которые активируют молчащие пути. Штаммы могут обладать криптическими генами, которые не экспрессируются до тех пор, пока не произойдет мутация. Изменение экспрессии показывает, что биоконтрольные штаммы *Trichoderma* (и, несомненно, другие микроорганизмы) обладают генами, которые экспрессируются только при изменении регуляторных процессов.

Конкуренция за местообитание и питательные вещества с фитопатогенами — один из «классических» механизмов биоконтроля у видов рода *Trichoderma*. Во многих случаях, когда очевидный микопаразитизм или антибиоз отсутствует, предполагается механизм конкуренции.

Одним из возможных механизмов, привлекающих особое внимание, является устойчивость биоконтрольного агента к стрессам благодаря улучшению корневой системы и повышению жизнеспособности растений. Толерантность к высушиванию и повышенная усвояемость азота являются примерами этого механизма. Улучшение состояния корневой системы благодаря *Trichoderma*, возможно, приводит к появлению устойчивости к патогенам, которые непосредственно не контролируются. Например, грибы рода *Trichoderma* не способны контролировать *Phytophthora* spp., поскольку не имеют механизмов разрушения или атаки на зооспоры. Однако имеются сведения о том, что растений, пораженных фитопфторой, было больше в контроле (без применения *Trichoderma*), чем в опытных вариантах с обработкой антагонистом. Единственным объяснением может быть то, что, по-видимому, колонизация корней *Trichoderma* привела к более развитой корневой системе, что снижало проявление отрицательного влияния фитопатогенов.

В почве многие ионы постоянно переходят из нерастворимой в растворимую форму, что в значительной степени влияет на усвоение этих элементов корнями. Виды *Trichoderma* способны в значительной степени положительно влиять на переход многих ионов (фосфаты, цинк,  $Mn^{4+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) из нерастворимых в растворимую форму, и показано влияние этого процесса на развитие болезни растений.

Некоторые штаммы *Trichoderma* являются мощными индукторами системной резистентности растений (SAR). Исследуемый нами штамм *T. harzianum*, инокулированный на корни или листья, защищал растения от *B. cinerea*, независимо от места введения. Анализ листьев, устойчивых к фитопатогенам, показал, что на них нет *Trichoderma*. Установлено, что способность к контролю мучнистой росы связана с индукцией резистентности растений. В растениях огурца, выращенного с использованием биопрепаратов, отмечено увеличение размеров растения и урожайности. Показано, что мицелий гриба проникает в кортекс корней. В растениях, обработанных спорами *Trichoderma*, увеличена активность хитиназы и пероксидазы и обнаруживаются фитоалексины, что является показателем SAR.

Инфекционность и способность поражать растения у многих фитопатогенов зависит от продукции пектинолитических, хитинолитических и целлюлолитических ферментов, сериновых протеаз, деградирующих клеточные стенки растительных клеток. Механизм биоконтроля, который могут реализовать виды *Trichoderma* — разрушение ферментов фитопатогенов, что приводит к снижению их инфекционности.

В заключение можно сказать, что существует множество механизмов, посредством которых грибы *Trichoderma* осуществляют контроль фитопатогенов. Неудивительно, что разные штаммы обладают различными биоконтрольными способностями. Даже мутанты этих штаммов реализуют различные механизмы контроля фитопатогенов. Кроме того, что эти грибы вооружены самым разным «биологическим оружием», они относятся к высокоадаптивным к различным стрессовым факторам организмам и не специфичным по отношению к контролируемым ими фитопатогенам. Штаммы, лишенные одного механизма, быстро адаптируются и используют другой механизм.

Существует ошибочное мнение, что регистрация биопрепарата — процесс легкий, недорогой и простой. Коммерциализация биопрепаратов включает в себя несколько этапов, начиная с научных исследований, проверки эффективности штамма и методов производства, лабораторного и промышленного, и заканчивая полевыми испытаниями, токсикологическими и биологическими тестами и маркетингом. Для того чтобы один биоконтрольный штамм приносил прибыль и продавался на рынке, требуются весьма высокие денежные затраты и несколько лет испытаний.