

УДК 631.46 : 632.4

© *И. Г. Широких, О. В. Мерзаева, Е. В. Товстик,  
Е. Г. Арзамасова, М. И. Тумасова*

### **ВЛИЯНИЕ ФУЗАРИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ЧИСЛЕННОСТЬ И ТАКСОНОМИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ МИКРОМИЦЕТОВ В РИЗОСФЕРЕ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО**

SHIROKIKH I. G., MERSAEVA O. V., TOVSTYK E. V., ARZAMASOVA E. G.,  
TUMASOVA M. I. INFLUENCE OF *FUSARIUM* INFECTION ON MICROMYCETES NUMBER  
AND TAXONOMIC STRUCTURE IN THE RHIZOSPHERE OF RED CLOVER

Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) — одна из важнейших кормовых культур, обогащающая почвы азотом и улучшающая их фитосанитарное состояние. Однако в последние годы из-за сильного поражения корневыми гнилями многолетний клевер все чаще становится накопителем фузариозной инфекции (Тумасова и др., 1998; Полякова, 2002). Фузариоз поражает корни клевера с первого года жизни, с возрастом растений болезнь сильно прогрессирует. Симптомы заболевания проявляются в виде пятен и язв на поверхности корня с последующей мацерацией внутренних тканей.

Одним из перспективных методов защиты растений от болезней является создание устойчивых сортов, в том числе путем проведения отборов на искусственном инфекционном фоне (Дьяков, 1971; Тумасова, Крылова, 2000). Несмотря на многочисленность работ по созданию и использованию в селекции инфекционных фонов, сведения о влиянии, оказываемом на микобиоту ризосферы искусственным внесением в почву инфекционного материала, в литературе ограничены (Широких, Шешегова, 2005). Между тем такие данные необходимы как для понимания механизмов возникновения и развития корневых инфекций, так и для оценки степени селекционной эффективности искусственно создаваемых фитопатогенозов.

Сочетание методов оценки численности микромицетов при помощи люминесцентной микроскопии с изучением качественного состава грибных комплексов, развивающихся в тканях корня и в прикорневом пространстве, при посеве на плотные питательные среды позволяет получить достаточно полное представление об особенностях взаимодействия растений с грибами на искусственном инфекционном фоне.

Целью данной работы было выявление и характеристика некоторых изменений, происходящих в комплексе микромицетов под посевами клевера лугового в результате искусственного внесения в почву фузариозной инфекции.

#### **Материал и методы**

Численность и родовой состав микромицетов в прикорневой зоне клевера лугового изучали в полевом опыте Отдела многолетних трав Зонального научно-исследовательского института сельского хозяйства Северо-Востока. Опыт был заложен на дер-

ново-подзолистой почве, характеризующейся следующими показателями: рН 4.2—4.4, гидролитическая кислотность — 5.5—5.9 мг-экв./100 г, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> — 161—196, K<sub>2</sub>O — 171—216 мг/кг почвы.

Для создания искусственного инфекционного фона в почву перед посевом вносили зерносмесь (60 г/м<sup>2</sup>), инфицированную грибами *Fusarium culmorum* (W. G. Smith.) Sacc., *F. oxysporum* Schldl.: Fr., *F. avenaceum* (Fr.: Fr.) Sacc. в равных соотношениях по массе (Методические рекомендации..., 1999). Контролем служил вариант без внесения инфекционного инокулюма.

Объектом исследований служил клевер луговой сорта Дымковский. Образцы корней с почвой для анализа отбирали из посевов клевера лугового 2005 г. — контрольного (вариант 1) и инфекционного фона (вариант 2); из посевов клевера лугового 2006 г. — контрольного (вариант 3) и инфекционного фона (варианты 4 и 5). В варианте 5 семена до посева дополнительно были обработаны суспензией (10<sup>7</sup> КОЕ/мл) штамма клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 348a. Количественный учет микромицетов проводили также в образцах, взятых из неризосферной почвы с глубины 0—3 см.

Для анализа использовали свежие образцы. С помощью скальпеля и пинцета острожно в стерильных условиях счищали излишки почвы с корней из ризосферы, оставляя лишь слой, не превышающий 3 мм по толщине. Затем вырезали сегменты корней (на 2—3 см ниже шейки корня). Из каждого образца брали навеску корней (2 г) с прилипшей к ним почвой, помещали в 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывали 3—5 мин с металлическими отбойниками. Из полученной суспензии извлекали корни. Для получения образца из ризопланы отмытые корни стерильно растирали в ступке и доводили объем гомогената до 100 мл, добавляя стерильную воду. После фильтрования через бумажный фильтр и высушивания при 105 °С определяли гравиметрически сухую массу корней и почвы.

Длину мицелия грибов определяли с использованием люминесцентного микроскопа «Биомед 2». Препараты для микроскопии готовили по общепринятой методике (Методы..., 1991). Для окраски препаратов использовали 0.01%-й раствор калькофлуора белого. Каждый образец просматривали в 100 полях зрения микроскопа.

Качественный состав типичных микромицетов ризосферной почвы и ризопланы клевера лугового определяли при посеве суспензий на твердую среду Чапека со стрептомицином (100 мг/л), который добавляли для ингибирования роста бактерий. Чашки с посевами инкубировали в течение 10—14 суток при комнатной температуре. Для выявления патогенных грибов в пораженных тканях клевера лугового поверхностно обработанные спиртом сегменты корней помещали в чашки Петри с агаризованной средой и культивировали в течение 3—5 суток при 27 °С. Учитывали колонии по морфологическим типам. Из колонии доминирующего типа выделяли чистую культуру и изучали морфологические и культуральные признаки грибов в соответствии с определителями (Литвинов, 1969; Кириленко, 1977; Саттон и др., 2001). Грибы рода *Fusarium* определяли по ключу В. И. Билай (1977). Для каждого образца ризосферы и ризопланы рассчитывали показатели относительного обилия представителей рода в комплексе в процентах.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы EXCEL 5.

## Результаты и обсуждение

Внесение в почву зерносмеси, инфицированной грибами рода *Fusarium*, привело к снижению выживаемости растений клевера лугового во второй и в третий годы жизни (табл. 1). Продуктивность растений, выживших на искусственном инфекционном фоне, незначительно отличалась от таковой у контрольных растений, что может свидетельствовать о толерантности сорта Дымковский к корневым гнилям и его способности в условиях изреженности формировать высокопродуктивную травостой. Количе-

**Изменение выживаемости и продуктивности клевера лугового Дымковский на искусственном инфекционном фоне**

Показатель	Контроль	Инфекционный фон
Растения второго года жизни		
Выживаемость, %	90	82/85*
Продуктивность, г сухого веса /м <sup>2</sup>	2297	2228/2239*
Растения третьего года жизни		
Выживаемость, %	90	65
Продуктивность, г сухого веса /м <sup>2</sup>	2630	2560

Примечание. В знаменателе звездочкой отмечены данные после обработки семян клубеньковыми бактериями.

ство грибных колониеобразующих единиц (КОЕ) в прикорневой зоне растений на инфекционном фоне было в 2—6 раз выше, чем в ризосфере контрольных растений (табл. 2). Поскольку функциональная активность почвенных микромицетов и интенсивность колонизации ими корней и прикорневой зоны растений связана с мицелиальной стадией их развития, представлялось важным определить концентрацию грибного мицелия по вариантам. Использование люминесцентной микроскопии позволило выявить изменения в плотности мицелия грибов, обусловленные как возрастом растения, так и искусственным внесением в почву инфекционного материала. С увеличением возраста растений общая длина мицелия микромицетов в ризосфере возрастала. Если в ризосфере контрольных растений второго года жизни показатели длины мицелия (49.3 м/г), как и в свободной от корней почве (23.5—30.1 м/г), еще существенно не различались, то в ризосфере растений третьего года жизни длина мицелия была на порядок выше и составила 235.2 м/г (табл. 2).

На искусственном инфекционном фоне длина мицелия в ризосфере растений второго года жизни превосходила аналогичный показатель в контрольном варианте в 4 раза. Столь существенное увеличение его концентрации связано, очевидно, с дополнительным поступлением в почву растительных полимеров в составе инфицированной зерносмеси. Гибель растений на инфекционном фоне была выше по сравнению с контролем на 5—8 % (табл. 1).

В ризоплане контрольных растений клевера лугового второго и третьего года жизни длина мицелия составляла десятки метров на 1 г субстрата. Учитывая, что доступная для колонизации микроорганизмами площадь поверхности 1 г почвы существенно превышает таковую для 1 г корней (Звягинцев, 1987), можно заключить, что заселенность грибами корневой поверхности по крайней мере не уступает или даже выше, чем заселенность поверхности почвенных частиц и агрегатов. В ризосфере клевера лугового третьего года жизни дальнейшее увеличение концентрации мицелия под воздействием искусственно внесенной инфекции не наблюдалось (табл. 2).

В ризоплане клевера лугового, выращенного на инфекционном фоне, показатели длины мицелия превышали 100 м, причем у растений второго года жизни превышение оценивалось на уровне тенденции, а у растений третьего года жизни — как существенное по сравнению с контрольными растениями.

Сопоставление результатов определения длины мицелия в ризоплане (табл. 2) с данными выживаемости растений на инфекционном фоне (табл. 1) указывает на то, что максимальной плотности мицелия в ризоплане соответствует самая низкая выживаемость растений — на 25% ниже, чем в контроле.

Дополнительная обработка семян клевера перед внесением клубеньковых бактерий *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 348a (вариант 5) привела к увеличению в ризосферной почве количества грибных пропагул, обнаруженных методом посева, но существ-

**Изменение количественных показателей,  
характеризующих комплексы почвенных микромицетов в посеве клевера лугового**

Показатель	Растения второго года жизни					
	контроль		инфекционный фон		инфекционный фон + + бактериализация семян	
	1	2	1	2	1	2
Численность, тыс. КОЕ/г	415 ± 54	34 ± 5	918 ± 110	287 ± 34	4584 ± 596	1024 ± 133
Длина мицелия, м/г	49.3	79.6	199.1	105.7	119.1	51.6
Общее число родов	3	2	4	5	3	6

Таблица 2 (продолжение)

Показатель	Растения третьего года жизни			
	контроль		инфекционный фон	
	1	2	1	2
Численность, тыс. КОЕ/г	1034 ± 134	825 ± 91	6032 ± 724	887 ± 133
Длина мицелия, м/г	235.2	58.2	196.4	172.7
Общее число родов	3	4	4	5

Примечание. 1 — ризосфера, 2 — ризоплана.

венно не изменила концентрацию мицелия (табл. 2). В то же время в ризоплане клевера лугового с внесением бактерий плотность мицелия (51.6 м/г) была в 2 раза меньше, чем на инфекционном фоне без бактерий (105.7 м/г). Эти результаты говорят о возможности ограничивать проникновение патогенов в ризоплану растений клевера, воздействуя на мицелий, как функционально активный компонент грибной популяции. Отмечена тенденция к повышению показателей выживаемости и продуктивности растений под воздействием бактериализации семян (табл. 1).

Определение родовой структуры комплекса почвенных микроскопических грибов показало ее существенное отличие под посевами клевера лугового на инфекционном фоне и в контроле, в прикорневой зоне растений второго и третьего года жизни, а также между образцами ризосферы и ризопланы. Из всех образцов в результате посева на агаризованную среду Чапека было выделено 44 культуры микромицетов, относящиеся к 11 родам классов *Deuteromycetes*, *Zygomycetes* и *Ascomycetes*. В структуре комплекса микромицетов в варианте с растениями второго года жизни доминировали как в контроле, так и на инфекционном фоне виды рода *Penicillium* (табл. 3). В варианте с растениями третьего года жизни в комплексе микромицетов наряду с пенициллами отмечена высокая представленность видов рода *Aspergillus*. В ризоплане растений второго года жизни только на искусственном инфекционном фоне отмечены представители рода *Fusarium*, тогда как на третий год фузариоз присутствовал в микромицетном комплексе ризопланы как опытных, так и контрольных растений. Однако обилие фузариозов в комплексе на инфекционном фоне было в 3 раза выше, чем в контроле. В комплексе микромицетов ризосферной почвы представители рода *Fusarium* не выявлены. Разнообразие фузариозов в пораженных корнях клевера лугового ограничивалось видами *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichiella* Bilai, *F. avenaceum*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что создание искусственных инфекционных фонов путем внесения в дерново-подзолистую почву фузариозной инфекции привело к изменениям микромицетного комплекса в посевах

**Изменение структуры комплекса микромицетов в посеве клевера лугового под воздействием фузариозной инфекции (обилие представителей рода, %)**

Род	Растения второго года жизни						Растения третьего года жизни			
	контроль		инфекционный фон		инфекционный фон + бактериализация семян		контроль		инфекционный фон	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Aspergillus</i> Micheli : Fr.	—	—	—	—	—	—	41.8	—	4.7	21.9
<i>Chaetomium</i> Kunze: Fr.	—	—	—	—	—	—	20.0	7.4	—	—
<i>Chrizosporium</i> Corda	—	—	—	9.3	—	—	—	—	—	—
<i>Fusarium</i> Link : Fr.	—	—	—	30.8	—	11.0	—	14.8	—	46.5
<i>Gliocladium</i> Corda	—	—	—	—	—	12.8	—	—	—	—
<i>Mucor</i> Micheli	22.2	16.6	12.5	—	—	14.6	—	—	37.0	15.3
<i>Penicillium</i> Link : Fr.	72.0	83.4	71.4	38.5	71.4	26.2	38.2	55.6	52.6	—
<i>Rhizopus</i> Ehrenberg ex Corda	5.8	—	12.0	8.8	3.2	20.0	—	22.2	5.7	4.7
<i>Trichoderma</i> Pers.	—	—	—	—	25.4	—	—	—	—	—
<i>Tritirachium</i> Limber	—	—	4.1	12.6	—	15.4	—	—	—	—
<i>Verticillium</i> Nees ex Link	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.6

клевера лугового. В ризосферной почве на второй год жизни растений существенно по сравнению с контролем возросли общее количество грибных пропагул и длина грибного мицелия. В комплексе микромицетов ризопланы обнаружены представители рода *Fusarium*, отсутствующие в комплексе контрольных растений. Общее количество грибных пропагул было на порядок выше, чем в контроле, проявилась тенденция к увеличению длины мицелия в корневых тканях растений. По-видимому, более низкая (на 5—8 %), чем в контроле, выживаемость клевера лугового на инфекционном фоне была обусловлена изменениями микромицетного комплекса.

В ризосфере растений на третий год жизни под воздействием искусственно внесенной в почву инфекции существенно возрастало общее количество грибных пропагул, а в ризоплане значительно увеличивалась длина грибного мицелия в сравнении с контролем.

В таксономической структуре микромицетного комплекса доминирующую позицию заняли виды рода *Fusarium*, относительное обилие которых на инфекционном фоне было в 3 раза выше, чем в ризоплане контрольных растений. Выживаемость клевера лугового при этом, наоборот, была на 25 % ниже, чем выживаемость растений контрольного варианта. Полученные результаты позволяют считать, что выявленное в опыте снижение выживаемости клевера лугового на инфекционном фоне обусловлено поражением корневых систем растений грибами рода *Fusarium*.

В обычных условиях в ризосфере и на корнях клевера лугового также накапливалось значительное количество грибных пропагул, в корневых тканях на третьем году жизни была обнаружена фузариозная инфекция, не связанная с ее искусственным внесением в почву. Несмотря на то что продуктивность клевера лугового при этом снижалась незначительно, выявленные изменения в микромицетном комплексе свидетельствуют о способности данной культуры накапливать в прикорневой зоне значительный пул грибной инфекции, включая фузарию, которые, учитывая низкую видовую специфичность этих фитопатогенов, может представлять реальную опасность для последующих культур в севообороте (Свистова, Бабьева, 1990; Васютин и др., 1996).

Внесение клубеньковых бактерий перед посевом семян клевера лугового может при выращивании на инфекционном фоне способствовать ограничению активного развития в прикорневой зоне микроскопических грибов, и в частности фузариумов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Билай В.И. Фузариин. Киев: Наук. думка, 1977. 442 с.
- Васютин А. С., Будынков Н. И., Рудаков О. Л. Корневые гнили — опаснейшие болезни зерновых // Зерновые культуры. 1996. № 2. С. 19—20.
- Дьяков Ю. Т. Учение об иммунитете растений к инфекционным заболеваниям и селекция // Генетические основы селекции растений. М.: Наука, 1971. С. 313—342.
- Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М.: МГУ, 1987. 328 с.
- Литвинов М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов. М.; Л.: Наука, 1969. 302 с.
- Методические рекомендации по изучению устойчивости кормовых культур к возбудителям грибных болезней на полевых искусственных инфекционных фонах / Сост. Н. М. Пуц, Н. В. Разгуляева, Н. Ю. Костенко, Л. Ф. Соложенцева. М.: ВНИИК им. В. Р. Вильямса, 1999. 39 с.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии: Уч. пособие / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. 304 с.
- Полякова Н. Ю. Возбудители корневых гнилей клевера и их антагонисты // Защита и карантин растений. 2002. № 8. С. 34—35.
- Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М.: Мир, 2001. 486 с.
- Свистова И. Д., Бабьева Е. Н. Сукцессии микромицетов в выщелоченном черноземе при чередовании агрофитоценозов // Микология и фитопатология. 1990. Т. 24, вып. 6. С. 529—535.
- Тумасова М. И., Крылова Л. М., Ефремова З. Г. Селекция клевера лугового на устойчивость к корневым гнилям // Новые методы селекции и создания адаптивных сортов с.-х. культур: результаты и перспективы. Киров, 1998. С. 80—81.
- Тумасова М. И., Крылова Л. М. Создание селекционного материала клевера лугового, устойчивого к корневым гнилям // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2000. № 1. С. 41—44.
- Широких И. Г., Шешегова Т. К. Комплекс почвенных микромицетов озимой ржи и его изменение под воздействием фузариозной инфекции // Почвоведение. 2005. № 8. С. 988—993.

Зональный научно-исследовательский  
институт сельского хозяйства Северо-Востока  
им. Н. В. Рудницкого  
Киров  
irgenal@mail.ru

Поступила 18 IX 2008

#### РЕЗЮМЕ

С использованием методов посева и люминесцентной микроскопии изучена структура комплексов микроскопических грибов в прикорневой зоне клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) при искусственном создании фитопатогенозов на дерново-подзолистой почве. Выявлены существенные различия в плотности заселения корней и ризосферной почвы грибами, обусловленные воздействием внесенной в почву фузариозной инфекции. Показана принципиальная возможность направленной регуляции плотности заселения грибами корней клевера лугового путем бактеризации семян клубеньковыми бактериями.

Ключевые слова: фузариозная инфекция, почва, ризосфера, клевер луговой, бактериальная инокуляция.

## SUMMARY

The micromycetes complexes in the rhizosphere of red clover (*Trifolium pratense* L.) on soddy podzolic soil were investigated using the methods of luminescence microscopy and cup sowing. The differences in the number and composition of genera between the micromycetes complexes were related to impact of *Fusarium* infection. It was established, that mycelial density of microscopic fungi in the rhizosphere of red clover depended on the seed inoculation with bacterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Key words: fusarium infection, soil, rhizosphere, red clover, inoculation with bacterium.