

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 604.2:579.64

На правах рукописи

БРАЖНИКОВА ЕЛЕНА ВАЛЕРИЕВНА

**Микромицеты агроценозов и возможности их применения для
стимулирования роста сельскохозяйственных культур**

6D070100 – Биотехнология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:

Мукашева Т.Д., д.б.н., профессор

Зарубежный научный консультант:

Белимов А.А., д.б.н., профессор

Республика Казахстан
Алматы, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Микромицетные сообщества агроценозов: функциональная роль и особенности распространения.....	11
1.1.1 Мицелиальные грибы и дрожжи в почвах агроценозов.....	11
1.1.2 Эндوفитные микромицетные сообщества сельскохозяйственных культур.....	14
1.2 Механизмы стимулирования роста и защиты сельскохозяйственных растений микромицетами.....	16
1.2.1 Роль микромицетов в улучшении фосфорного питания растений.....	17
1.2.2 Синтез фитогормонов и сигнальных молекул как механизм стимулирования роста агрокультур.....	20
1.2.3 Участие микромицетов в защите растений от фитопатогенной микрофлоры.....	23
1.2.4 Обеспечение защиты растений от воздействия избыточных концентраций тяжелых металлов.....	27
1.3 Биопрепараты на основе микромицетов и их БАВ, применяемые в Казахстане и за рубежом.....	31
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Материалы исследования.....	35
2.2 Методы исследования.....	36
2.2.1 Выделение микромицетов и характеристика микромицетных сообществ.....	36
2.2.2 Определение фосфат-мобилизирующей активности.....	37
2.2.3 Определение фитогормонов и сигнальных молекул.....	39
2.2.4 Определение антагонистической активности.....	39
2.2.5 Определение устойчивости к тяжелым металлам.....	41
2.2.6 Определение активности АЦК-дезаминазы.....	42
2.2.7 Лабораторные вегетационные опыты.....	42
2.2.8 Молекулярно-генетическая идентификация.....	45
2.2.9 Получение композиций на основе микромицетов и их метаболитов.....	46
2.2.10 Статистическая обработка данных.....	46
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	48
3.1 Характеристика микромицетных сообщества агроценозов.....	48
3.1.1 Количественный состав и таксономическая структура микромицетных сообществ в почвах агроценозов.....	48
3.1.2 Количественный состав и таксономическая структура эндوفитных комплексов микромицетов.....	54

3.2	Исследование механизмов стимулирования роста агрокультур штаммами микромицетов.....	58
3.2.1	Скрининг перспективных штаммов с агрономически ценными свойствами.....	58
3.2.2	Исследование механизмов фосфат-мобилизирующей активности.....	62
3.2.3	Продуцирование метаболитов с гормональной и сигнальной функциями.....	74
3.2.4	Исследование механизмов защиты агрокультур от фитопатогенных грибов.....	76
3.2.5	Исследование механизмов устойчивости микромицетов к тяжелым металлам.....	82
3.2.6	Продуцирование микромицетами АЦК-дезаминазы как один из механизмов защиты растений в условиях стресса.....	87
3.3	Идентификация и депонирование отобранных штаммов.....	92
3.4	Применение штаммов микромицетов для улучшения роста сельскохозяйственных культур.....	97
3.4.1	Создание композиций на основе микромицетов и их метаболитов.....	98
3.4.2	Разработка способов применения композиций и оценка их эффективности.....	99
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	106
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	108
	ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	125
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	127
	ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	129

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

Настоящая диссертация написана в соответствии со следующими стандартами:

ГОСТ 7.32-2001 – Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.1-2003 – Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

α -КБ	– α -кетобутират
АЦК-дезаминаза	– 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминаза
БАВ	– биологически активные вещества
ГК	– гиббереллиновая кислота
ИИР	– индекс ингибирования роста
ИТ	– индекс толерантности
ИУК	– индоли-3-уксусная кислота
КОЕ	– колониеобразующая единица
МИК	– минимальная ингибирующая концентрация
СРРМ	– стимулирующие рост растений микромицеты
ТМ	– тяжелые металлы
ФМГ	– фосфат-мобилизирующие грибы

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационной работы. Работа посвящена исследованию особенностей распространения микромицетов агроценозов, изучению механизмов их положительного действия на растения и разработке способов применения этих микроорганизмов для улучшения роста сельскохозяйственных культур.

Актуальность темы исследования. Отрасль сельского хозяйства является стратегически важной и занимает одно из ведущих мест в экономике Республики Казахстан. В 2022 году посевная площадь всех агрокультур составила 22,9 млн га. Наибольшую долю занимали зерновые и зернобобовые культуры – 15,8 млн га. На масличные приходилось 2,9 млн га. Кормовые культуры были размещены на 3,7 млн га [1]. Современные технологии возделывания агрокультур предусматривают проведение мероприятий, направленных на улучшение роста и защиту растений и включающих в себя такие приемы, как: протравливание семян, внесение минеральных удобрений, применение пестицидов на разных этапах развития растений [2, с. 763]. На 2022 год в Казахстане зарегистрировано 1021 торговое наименование пестицидов различного назначения, разрешенных к применению на территории республики [3], из них 386 препаратов в своем составе содержат одно или несколько активных веществ, являющихся особо опасными и включенными в список Международной сети действий в отношении пестицидов (Pesticide Action Network, PAN) [4]. В 2022 году на посевных площадях Казахстана было внесено 626,5 тыс. тонн минеральных удобрений и применено 16,6 млн литров пестицидов [1]. Использование минеральных удобрений и химических средств защиты растений экологически небезопасно, влечет за собой нарушение биологического равновесия в агроценозах, загрязнение сельскохозяйственной продукции и грунтовых вод, что имеет целый ряд негативных последствий для окружающей среды и здоровья человека [2, с. 764; 5, с. 2].

В связи с этим актуальными направлениями как для развития сельского хозяйства, так и для решения экологических проблем и охраны окружающей среды являются повышение продуктивности сельскохозяйственных растений, снижение количества вносимых химических средств стимулирования и защиты агрокультур, а также увеличение устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным условиям. Особенно важными и перспективными представляются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала эндофитных и почвенных микроорганизмов. Для раскрытия этого потенциала необходимо исследование механизмов взаимодействия компонентов растительно-микробных систем [6]. Известно, что микроорганизмы способны обеспечить ряд положительных эффектов на растения, основными из которых являются: повышение доступности элементов питания и увеличение коэффициента использования питательных веществ из удобрений и почвы; продукция метаболитов с гормональными и сигнальными функциями; протекторное действие в условиях биотических и абиотических стрессов [2, с. 764].

Таким образом, актуальным и значимым направлением исследований является разработка препаратов, основу которых составляют микроорганизмы и их метаболиты. Применение таких микроорганизмов представляется привлекательной альтернативой химическим препаратам, способствует развитию интенсивного растениеводства и экологически сбалансированного земледелия.

Микромицеты представляют особый интерес, поскольку являются одним из главных неотъемлемых структурных и функциональных компонентов биоценозов. Также они имеют ряд преимуществ по сравнению с другими группами микроорганизмов. Так, микромицеты отличаются большой линейной скоростью роста (на 1-2 порядка выше, чем у бактерий), что дает им возможность распространяться на большие расстояния и более эффективно колонизировать субстрат. Кроме того, микромицеты характеризуются чрезвычайной пластичностью метаболизма и высоким адаптационным потенциалом к действию неблагоприятных факторов среды [7; 8, с. 12]. Известно, что микромицеты в почве формируют более стабильные межвидовые сети взаимодействия (interspecies networks) [9, 10]. Установлено, что применение микромицетов улучшает посевные качества семян, увеличивает ростовые показатели и урожайность агрокультур, повышает содержание питательных веществ [5, с. 6-10; 11; 12].

Несмотря на повсеместность распространения, полифункциональность и значимость данной группы микроорганизмов, сведения о почвенных и эндофитных микромицетах агроценозов Казахстана весьма ограничены. Мало изученными остаются и вопросы, касающиеся механизмов, лежащих в основе стимулирующего действия отечественных штаммов на рост и развитие растений. Отсутствуют полифункциональные препараты для растениеводства на основе отечественных штаммов микромицетов. Таким образом, характеристика микромицетов агроценозов, комплексное изучение процессов, обуславливающих их положительное действие на растения, а также разработка способов применения этих микроорганизмов являются актуальными и имеют важное теоретическое и практическое значение.

Цель исследования: обоснование возможности применения микромицетов для улучшения роста агрокультур и разработка эффективных способов их применения.

Задачи исследования:

1. Характеристика количественного состава и таксономической структуры почвенных и эндофитных микромицетных сообществ агроценозов.
2. Скрининг штаммов с агрономически ценными свойствами, перспективных для улучшения роста и защиты агрокультур.
3. Исследование прямых механизмов положительного действия микромицетов на растения.
4. Определение механизмов протекторного действия микромицетов на агрокультуры при биотических и абиотических стрессах.
5. Создание коллекции эффективных штаммов микромицетов сельскохозяйственного назначения.

6. Создание композиций на основе отобранных штаммов и разработка способов их применения для улучшения роста агрокультур.

Объект исследования: штаммы микромицетов, выделенные из семи сельскохозяйственных культур (соя, ячмень, люцерна, рапс, сафлор, донник, эспарцет) и почв агроценозов данных растений.

Предмет исследования: механизмы стимулирующего и протекторного действия микромицетов на агрокультуры с последующей разработкой эффективных способов их применения.

Методы исследования: в работе использованы современные микробиологические, биохимические, молекулярно-биологические, физико-химические и вегетационные методы. Статистическая обработка данных проведена с использованием лицензированного пакета программы Statistica версия 10.0 (TIBCO Software Inc., США).

Научная новизна результатов исследования:

Впервые охарактеризован количественный состав и таксономическая структура почвенных и эндофитных микромицетных сообществ агроценозов семи сельскохозяйственных культур Казахстана.

Впервые показано, что основными компонентами сообществ микромицетов являлись мицелиальные грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*, среди дрожжей преобладали представители родов *Aureobasidium*, *Rhodotorula* и *Metschnikowia*.

Получены оригинальные результаты, показавшие что положительное действие микромицетов на агрокультуры обусловлено улучшением фосфорного питания растений, продуцированием метаболитов с гормональной и сигнальной функциями, а протекторный эффект обеспечивается за счёт синтеза штаммами гидролитических ферментов и соединений с антимикробной активностью, а также поглощением и детоксикацией тяжелых металлов.

Впервые у микромицетов видов *T. pinophilus*, *B. bassiana* и *M. robertsii* выявлена АЦК-дезаминазная активность и установлено стимулирующее воздействие данных АЦК-утилизирующих штаммов на развитие растений в условиях абиотического и биотического стрессов.

Впервые созданы композиции на основе отечественных штаммов микромицетов, а также их метаболитов, и разработаны эффективные способы их применения для улучшения роста сельскохозяйственных культур.

Практическая значимость исследования связана с созданием обширной коллекции эффективных штаммов микромицетов сельскохозяйственного назначения, которая является ценным биологическим ресурсом для проведения исследований. Данные штаммы обладают высоким потенциалом использования в составе препаратов для решения отдельных и комплексных задач в области развития сельского хозяйства и защиты окружающей среды.

Наиболее эффективные 7 штаммов (*Aspergillus* sp. D1, *Beauveria bassiana* T7, *B. bassiana* T15, *Metarhizium robertsii* An1, *Metschnikowia pulcherrima* MP2, *Penicillium bilaiae* Pb14 и *Talaromyces pinophilus* T14) депонированы в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» (РКМ) (г. Астана, Республика Казахстан) и/или в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов

сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) (г. Санкт-Петербург, Российская Федерация). На 2 штамма (*B. bassiana* T7 и *P. bilaiae* Pb14) получены патенты на изобретения №34305 и №34350 (Приложение А).

Ряд наблюдений и выявленных в ходе исследования закономерностей могут быть использованы в качестве практических рекомендаций для разработки биопрепаратов на основе микроорганизмов и их применения в растениеводстве.

Практическая значимость работы обусловлена перспективами применения разработанных композиций на основе микромицетов и их метаболитов для улучшения роста агрокультур как в благоприятных, так и стрессовых условиях. Рекомендован наиболее эффективный вариант применения поученных композиций - прайминг семян путем замачивания в фильтрах в сочетании с инокуляцией штаммов в почву.

Теоретическая значимость исследования. Полученные результаты углубляют и расширяют знания о составе и свойствах почвенных и эндофитных микромицетных сообществ агроценозов, что является важным вопросом экологии микромицетов и функционирования наземных экосистем. Исследование механизмов положительного действия микромицетов на растения имеет первостепенное значение для понимания процессов, лежащих в основе улучшения роста агрокультур, а также обеспечивает фундаментальную платформу для разработки стратегий их применения. Поскольку исследование находится на стыке биотехнологии, микробиологии, биохимии и агробиологии, полученные результаты могут иметь влияние на развитие данных областей науки как в фундаментальном, так и прикладном аспекте.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- Почвенные и эндофитные микромицетные сообщества агроценозов являются перспективным источником эффективных штаммов сельскохозяйственного назначения.

- Выделенные штаммы микромицетов улучшают фосфорное питание растений, осуществляют биоконтроль фитопатогенов и оказывают протекторное действие на растения при воздействии тяжелых металлов.

- Применение созданных композиций на основе штаммов микромицетов и их метаболитов улучшает рост и развитие агрокультур как в благоприятных, так и стрессовых условиях.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках научного проекта 2198/ГФ4 «Разработка технологии использования микроорганизмов, обладающих ростстимулирующей и фунгицидной активностями для повышения урожайности агрокультур».

Апробация работы. Результаты работы были доложены и опубликованы на международных научно-практических конференциях:

Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы экологической генетики и экспериментальной биологии» (Алматы, 2018 г.)

Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых "Фараби Әлемі" (Алматы, 2018 г.)

23-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, 2019 г.)

XI Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2019 г.)

III International Symposium “Innovations in Life Sciences” (Белгород, 2021 г.)

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 14 печатных работах, включая 2 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 3 статьи в республиканских научных журналах, включенных в перечень ККСОН МОН РК, 2 патента РК, 1 статья в материалах международной конференции, 6 тезисов в материалах международных конференций.

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, анализе, интерпретации и оформлении полученных результатов, подготовке рукописей публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, списка использованных источников из 210 наименований. Содержит 30 таблиц, 26 рисунков, 3 приложения.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Микробиотные сообщества агроценозов: функциональная роль и особенности распространения

Микробиоты представляют собой неотъемлемый структурный и функциональный компонент естественных и антропогенных наземных и водных экосистем, в том числе агроэкосистем. Среди всех групп организмов микробиоты занимают второе место (после беспозвоночных животных) по количеству описанных видов [8, с. 10; 13, с. 7]. Сообщества мицелиальных грибов и дрожжей оказывают непосредственное влияние на продуктивность и устойчивость агроценозов, поскольку являются важным звеном детритных цепей и выполняют ряд ключевых функций: участие в разложении органического вещества и круговоротах биогенных элементов, в процессах почвообразования, а также регуляции видовой структуры и функциональной активности других организмов [7, с. 1-2; 8, с. 10-12; 13, с. 7-8]. Таким образом, исследования по определению численности и таксономической структуры почвенных и эндофитных сообществ микробиот в зависимости от типа растительности, степени окультуренности почв, агроиспользования и других факторов играют важную роль в рационализации систем земледелия, оптимизации способов возделывания агрокультур и методов защиты растений.

1.1.1 Мицелиальные грибы и дрожжи в почвах агроценозов

Почвенные микробиоты создают существенные запасы биомассы, содержащей высокие концентрации биогенных элементов К, S, P и т.д. Микробиоты, преимущественно мицелиальные грибы, принимают участие в важнейших почвообразующих процессах, в деструкции органических веществ, а также в различных процессах биогеохимической трансформации минеральных элементов. Микробиоты являются важнейшими звеньями пищевых цепей и наиболее важны как пища для почвенных беспозвоночных животных [7, с. 1-2; 13, с. 7-8]. Вследствие тесного взаимодействия с растениями в почве грибы образуют микоризу и участвуют в формировании ризосферы. Одна из ключевых ролей грибов заключается в формировании физико-химических свойств почв: создании почвенной структуры, в синтезе специфических гумусовых веществ, во влиянии на обмен ионов в почве, на ее водоудерживающую способность и т.д. Почвенные грибы и дрожжи оказывают воздействие не только на растения, но и на другие организмы в агроэкосистемах за счет продукции физиологически активных веществ: фитогормонов, сигнальных молекул, органических кислот, витаминов, антибиотических соединений, ферментов и т.д. [13, с. 7-8; 14].

Мицелиальные грибы находятся в почве главным образом в форме мицелия и спор, а также в виде таких структур, как хламидоспоры и склероции. Соотношение содержания мицелия и спор определяется типом почвы, а также экологическими условиями. Нахождение спор грибов в состоянии покоя (фунгистазис) обусловлено как биотическими (например, воздействие микробных метаболитов), так и абиотическими (недостаток питательных веществ, низкая влажность, наличие поллютантов и др.) факторами. Изменение

условий в благоприятную сторону способствует выходу спор из состояния покоя, прорастанию в ростковые трубки и последующему развитию мицелия [13, с. 14]. Для дрожжей характерно развитие преимущественно на субстратах с высоким содержанием легкодоступных питательных веществ (сахаров, сахароспиртов, органических кислот и т.п.), где численность популяции некоторых видов может достигать очень высоких показателей. Многие представители дрожжей, выявляемые на растениях и растительных остатках, также могут быть изолированы из почвы. В верхних почвенных горизонтах присутствуют типичные фито- и сапробионты, реже встречаются аскомицетовые дрожжи, характерные для субстратов с высоким содержанием свободных сахаров. Эти виды составляют группу аллохтонных почвенных дрожжей и зачастую представляют собой дрожжеподобные грибы базидиомицетового аффинитета, для цикла развития которых характерны дрожжевая анаморфная и мицелиальная телеоморфная стадии. Помимо аллохтонных, распространены также автохтонные почвенные дрожжи, которые проводят в почве весь жизненный цикл. Такими истинно почвенными дрожжами являются все виды рода *Lipomyces* [15, с. 92; 16, с. 372-373; 17, с. 1].

Известно, что численность микобиоты в почве, как и других групп микроорганизмов, постоянно изменяется. Однако в любом почвенном покрове существует определенный естественный количественный уровень микромицетов, который определяется свойствами почвы, а также обуславливается различными факторами среды. Численность и распределение микромицетов в почвах зависит от многочисленных географических и экологических факторов – типа почвы, почвообразовательных процессов, климатических условий, характера растительности и т.д., а также от биологических особенностей грибов, а именно от их способности к заселению и использованию субстрата. Такие факторы среды как рН, содержание органического углерода в почве, доступность N и P, практика землепользования и многие другие определяют численность и обуславливают особенности распределения микромицетов в почве. Формирование сообществ почвенных микромицетов соотносится во многом с водно-температурным режимом. Вместе с тем помимо этих основных факторов, обуславливающих как функциональное, так и пространственное распространение микромицетов, родовой и видовой состав микобиоты зависит от степени флористической насыщенности биоценозов, их пространственного положения, амплитуды вертикального и горизонтального распространения, характера свойственных отдельным видам жизненных форм, биохимической структуры доминирующих видов. Для каждого типа почвы и растительной ассоциации характерен специфический состав мицелиальных грибов, дрожжей и дрожжеподобных грибов [13, с. 27; 18, с. 106-121; 19, с. 2-3; 20, с. 3].

Тип и состояние растительного покрова оказывают непосредственное воздействие на микроорганизмы прикорневой зоны. Исследователи показали, что разные виды растений, произрастающие в одинаковых почвенных условиях, имеют отличающуюся структуру микромицетных сообществ. Более того, для некоторых видов агрокультур отмечена зависимость численного и

таксономического состава комплексов микромицетов от сорта одного и того же вида [19, с. 7-8; 21]. Это обусловлено главным образом специфическим составом корневых экссудатов данных растений. Известно, что корневые экссудаты состоят из соединений, действующих как аттрактанты для специфического микробного сообщества, и, таким образом, играют ключевую роль в определении структуры микробной популяции в прикорневой зоне. Корневые экссудаты, выделяемые растением-хозяином, включают широкий спектр соединений, которые позволяют ему модулировать (ать или подавлять) рост и колонизацию определенных видов микромицетов. Корневые экссудаты можно разделить на два класса соединений: 1) низкомолекулярная фракция, состоящая из аминокислот, органических кислот, сахаров, фенолов, и другие вторичных метаболитов; 2) высокомолекулярная фракция, включающая в основном полисахариды и белки. Некоторые корневые экссудаты также содержат микроэлементы, включая железо, цинк, марганец, медь, и хелатирующие агенты, образующие комплексы с металлическими соединениями [19, с. 8; 22, с. 244]. В составе корневых экссудатов присутствуют сигнальные молекулы, известные как «факторы, индуцирующие ветвление» [23]. Акиуама с соавт. [24] выделили такой фактор из корневых экссудатов *Lotus japonicus* и идентифицировали его как 5-дезоксистригол. Данное соединение в очень низких концентрациях вызывает интенсивное ветвление гиф в прорастающих спорах мицелиальных грибов. Nagahashi и Douds сообщили, что корневые выделения из растений, растущих в условиях дефицита фосфатов, имели высокую активность факторов ветвления по сравнению с растениями, растущими в условиях с достаточным содержанием фосфата [25].

Важным фактором, определяющим количественный и качественный состав почвенных микромицетов, является степень окультуренности почвы и типы применяемых агротехнических приемов, которые изменяют физическую структуру, влажность, воздушно-тепловой режим почвы, снижают макроагрегацию и воздействуют на скорость разложения пожнивных остатков [26]. В сельскохозяйственных системах такие методы, как вспашка и паровая обработка, возделывание монокультур и внесение удобрений, отрицательно влияют на обилие и разнообразие почвенных микроорганизмов [20, с. 3]. Применение минеральных удобрений в сбалансированных дозах не ведет к значимым перестройкам грибных сообществ окультуренных почв. В некоторых случаях отмечается лишь увеличение численности мицелиальных грибов и дрожжей. Наиболее отчетливые изменения структуры комплексов почвенных микромицетов отмечаются при внесении высоких доз удобрений или при их длительном воздействии, существенно влияющем на почвенные агрохимические показатели. При длительном применении НРК возможна родовая и видовая перегруппировка микромицетов. Рядом авторов выявлены индикаторные виды почвенных грибов на внесение отдельных минеральных удобрений: отмечена приуроченность *P. canescens*, к почвам, в которые вносили фосфорные удобрения, а *P. funicolusum* – к почвам, удобрённым азотом. При использовании минеральных удобрений отдельно или в парных сочетаниях наибольшее влияние оказывают, как правило, азотные удобрения. Длительное внесение азотных

удобрений отрицательно влияет на агрохимические характеристики почвы (увеличиваются все формы кислотности, уменьшается сумма поглощенных оснований), что ведет к снижению видового богатства и разнообразия микромицетов, кроме того меняется структура сообществ: выделяется большее число доминантных видов и меньшее количество редких [13, с. 67-71]. В целом, агроэкосистемы имеют более низкое разнообразие микромицетов по сравнению с природными экосистемами, кроме того уменьшение разнообразия коррелирует с интенсивностью агротехнологического воздействия [20, с. 3]

Многочисленные исследования демонстрируют зависимость численности микобиоты от глубины почвенного горизонта. Отдельные почвы существенно различаются по глубине их микробиологического профиля. Показано, что наиболее богаты микроорганизмами поверхностные слои почв [27-30].

Результаты исследований многих авторов свидетельствуют о том, что микроорганизмы, в том числе и микромицеты, имеют определенные ареалы распространения [31-33]. Многочисленные данные об особенностях распространения дрожжей [15, с. 99-110; 34], а также представителей таких крупных родов мицелиальных грибов, как *Penicillium* [35, с. 343-344; 36], *Aspergillus* [37], *Trichoderma* [38; 39, с. 100], *Fusarium* [40, с. 8-11], *Cladosporium* [41, с. 1-2; 42], подтверждают тот факт, что многие виды приурочены к определенным типам почв, растительности и широтным поясам. Вместе с тем, имеются и космополитные виды, встречающиеся повсеместно.

1.1.2 Эндوفитные микромицетные сообщества сельскохозяйственных культур

Помимо почвенных микромицетов, большой интерес представляют эндوفитные мицелиальные грибы и дрожжи, которые в течение части или всего жизненного цикла присутствуют в растительных тканях, не оказывая отрицательного влияния на развитие растений [43, с. 2; 44, с. 69].

Эндوفитные мицелиальные грибы и дрожжи выполняют важную роль в развитии растений и влияют на их физиолого-биохимические процессы. Это обусловлено способностью эндوفитных микромицетов синтезировать разнообразные биологически активные метаболиты, солибилизировать неорганические соединения фосфора и минерализовать органические, повышать доступность питательных веществ и улучшать их поглощение агрокультурами. Вследствие продуцирования эндوفитными микромицетами фитогормонов, летучих органических веществ, витаминов, антимикробных метаболитов, алкалоидов и других соединений улучшается рост и развитие растений, повышается их устойчивость к инфекциям и неблагоприятным условиям, обеспечивается защита агрокультур как от насекомых-вредителей, так и в определенной степени от травоядных млекопитающих [43, с. 4-11; 44, с. 72-73; 45, с. 24-25]. Рядом авторов продемонстрирована эффективность эндوفитных микромицетов в случае таких абиотических стрессов, как засуха, засоленность почвы, экстремальные температуры, а также загрязнение почв токсичными органическими поллютантами и тяжелыми металлами (ТМ). Помимо этого,

некоторые эндифиты способны переводить труднодоступные соединения калия и фосфора в легкоусвояемые для растений формы [46, 47].

Эндифитные мицелиальные грибы и дрожжи могут колонизировать вегетативные и генеративные органы растений: листья, стебли, корни, семена, плоды, почки, цветки. Эндифиты присутствуют как в пределах межклеточного пространства, где питаются апопластическими веществами, так и внутри клеток растительных тканей, а также в сосудистой системе [44, с. 70; 45, с. 23; 48, с. 1108-1110; 49, с. 668].

Микромицеты колонизируют эндосферу *de novo* из окружающей среды (горизонтальное распространение) или передаются вертикально последующим поколениям от семени к семени. На способ колонизации оказывают влияние экологические и эволюционные факторы взаимоотношений. Путь вертикальной трансмиссии обеспечивает передачу полезного эндифита от поколения к поколению в случаях, когда эндифитный микромицет выполняет важную функцию в растении-хозяине. Однако большинство эндифитов распространяются горизонтально, попадая во внутренние ткани растений из окружающей среды [44, с. 71; 45, с. 23-24]. Подавляющая часть эндифитных мицелиальных грибов и дрожжей проникает в растения из почвы через корневую систему. Другая часть эндифитов, заселяющая надземные органы растений, проникает преимущественно через устьяца, чечевички, гидатоды, микроповреждения кутикулы и эпидермы. Некоторые представители микромицетов выделяют липолитические и пектолитические ферменты, с помощью которых локально гидролизуют кутикулу и таким образом осуществляют проникновение во внутренние ткани растений [45, с. 23-24; 44, с. 71-72; 49, с. 668-669]. Эндифитные мицелиальные грибы могут попадать в растение с помощью апрессорий и гаусторий и впоследствии распространяться по сосудам ксилемы или по межклеточному пространству. В отличие от мицелиальных грибов дрожжи не способны распространяться за счет апикального перемещения по межклеточному пространству [49, с. 668-669].

Самая высокая численность эндифитных микромицетов наблюдается в корнях, и имеется тенденция снижения их количества от подземной части растения к листьям и другим надземным органам [50-53]. Таксономическое разнообразие микромицетных эндифитов зависит не только от вида, но и от сорта сельскохозяйственной культуры, а плотность заселения – от типа растительной ткани, фенологической фазы развития и физиологического состояния агрокультуры, факторов окружающей среды. В агроценозах внесение минеральных и органических удобрений является важной формой воздействия на колонизацию культур эндифитными микромицетами. Показано, что при длительном внесении азотных удобрений уменьшается концентрация сахарозы, используемой эндифитными мицелиальными грибами и дрожжами, вследствие чего их проникновение в растения ухудшается [43, с. 5; 48, с. 1108-1110; 54, с. 2-3].

Помимо этого, эндифитная колонизация зависит от физиологических изменений в растениях и может быть ограничена или замедлена вследствие продуцирования растениями биологически активных веществ (БАВ). Рядом

авторов показано, что у двудольных растений фитогормоны и гормоноподобные соединения (салициловая кислота, этилен, жасмоновая кислота) ограничивают колонизацию эндофитными микромицетами. Антимикробные пептиды, синтезируемые некоторыми сельскохозяйственными растениями, такими как рис и кукуруза, обуславливают уменьшение степени эндофитной колонизации данных растений [48, с. 1115-1116; 55; 56].

1.2 Механизмы стимулирования роста и защиты сельскохозяйственных растений микромицетами

В настоящее время в сельском хозяйстве все большее развитие получают агробιοтехнологии, направленные на снижение объема применяемых химических средств повышения урожайности растений и замену их на экологически чистые природные препараты на основе микроорганизмов (в том числе, микромицетов) и их БАВ. Интерес к таким стимулирующим рост растений микромицетам (СРРМ) обусловлен возможностью их применения для решения комплекса задач: повышение урожайности агрокультур, снижение себестоимости и улучшение качества сельскохозяйственной продукции, защита растений от болезней и вредителей, регуляция устойчивости растений к стрессовым факторам, развитие интенсивного растениеводства и экологически сбалансированного земледелия [2, с. 763-764; 5, с. 3-4; 43, с. 5-6; 57, с. 5-6]. Вступая в сложные ассоциативные и симбиотические взаимоотношения с растениями, данные СРРМ способны обеспечить ряд положительных эффектов (рисунок 1), основными из которых являются:

- биосинтез соединений с гормональными и сигнальными функциями (ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен, абсцизовая, жасмоновая и салициловая кислоты);

- изменение архитектуры корневой системы растений за счет удлинения основного и боковых корней, увеличения густоты корневых волосков и площади поверхности корней, повышения их биомассы;

- повышение доступности для растений элементов минерального питания и увеличение коэффициента использования питательных веществ из удобрений и почвы;

- защита растений от абиотических стрессовых факторов внешней среды (дефицит влаги, высокие температуры, загрязнение почв и др.);

- ограничение (биоконтроль) роста фитопатогенной микрофлоры за счёт таких механизмов, как: выделение метаболитов с антибиотической активностью, деградация клеточных стенок патогенных микроорганизмов и их токсинов с помощью гидролитических ферментов, конкуренция за нишу для колонизации, перехват питательных веществ;

- опосредованная защита растений от абиотических и биотических стрессов путем индукции системной устойчивости;

- снижение уровня этилена вследствие активности продуцируемой АЦК-дезаминазы [2, с. 763-764; 5, с. 3-4; 43, с. 5-6; 57, с. 5-6].

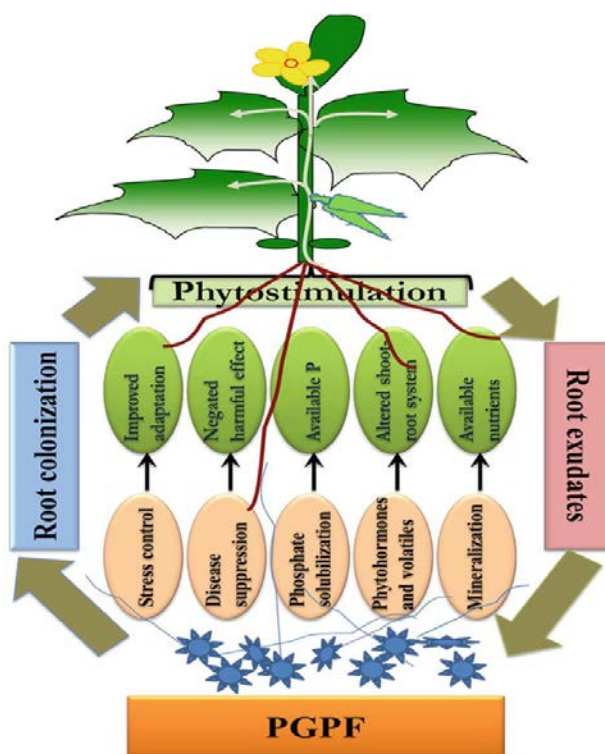


Рисунок 1 - Основные механизмы положительного действия микромицетов на растения [5, с. 3]

1.2.1. Роль микромицетов в улучшении фосфорного питания растений

Фосфор (P) является вторым (после азота) по важности макроэлементом, необходимым для многих физиологических и биохимических процессов растений на всех этапах их роста и развития, включая дыхание, фотосинтез, сигнальную трансдукцию, деление клеток, биосинтез макромолекул и развитие тканей. P составляет от 0,2 до 0,8% сухой биомассы растений, входя в состав нуклеиновых кислот, ферментов, коферментов и фосфолипидов [58, с. 1].

P присутствует в почве в неорганических и органических формах, соотношение которых варьирует в зависимости от стадии почвообразовательного процесса. Основным источником органического P, на долю которого приходится большая часть общего содержания P в почве, является биомасса. Неорганический P в сельскохозяйственные почвы попадает преимущественно с вносимыми фосфорными удобрениями. Большинство почв содержат достаточно высокое количество общего P, однако около 95-99% P находится в виде нерастворимых соединений и труднодоступно для растений [58, с. 2; 59, с. 170]. Концентрация подвижного P в почвенном растворе обычно очень низкая, и варьирует от миллиардных долей в очень бедных почвах до 1 мг/л в сильно удобренных почвах. Растительные клетки могут поглощать несколько форм P в зависимости от pH почвы, но большая часть усваивается в виде анионов фосфата (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-) [58, с. 2; 59, с. 170].

Проблема дефицита P в почве частично решается путем внесения минеральных удобрений. Однако от 70 до 90% P в составе фосфорных удобрений иммобилизуется такими катионами, как Ca^{2+} (в нейтральных и щелочных почвах

с рН выше 7,0), а также Al^{3+} и Fe^{3+} (в кислых почвах, особенно с рН ниже 5,0). Альтернативным экологически безопасным подходом для решения проблемы недостатка Р является применение фосфат-мобилизирующих микроорганизмов, способных минерализовать Р из органических соединений и солубилизовать Р из труднорастворимых неорганических форм [58, с. 2].

В почве доля микромикетов, мобилизирующих Р, составляют около 0,1–0,5% от общей численности микобиоты. По сравнению с микроорганизмами других таксономических групп, грибы имеют ряд преимуществ. Грибы в почве способны распространяться на большие расстояния по сравнению с бактериями. Как правило, фосфат-мобилизирующие грибы (ФМГ) продуцируют больше кислот, чем бактерии и актиномицеты, и, следовательно, проявляют более высокую фосфат-мобилизирующую активность. Помимо этого, ФМГ не теряют активность при субкультивировании в лабораторных условиях, как это зачастую происходит с фосфат-мобилизирующими бактериями [60, с. 3-4; 61, с. 2]. Среди мицелиальных грибов, способных мобилизовать Р, наиболее распространенными являются представители родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma*. Имеются сведения о высокой фосфат-мобилизирующей активности некоторых штаммов мицелиальных грибов, принадлежащих родам *Alternaria*, *Arthrobotrys*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cunninghamella*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Glomus*, *Helminthosporium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Myrothecium*, *Oidiodendron*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Populospora*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*. Дрожжи являются менее изученной группой микроорганизмов. Сообщается о фосфат-мобилизирующей активности дрожжей родов *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torula*, *Yarrowia* [60, с. 3-5; 61, с. 2]. Эндوفитные штаммы дрожжей *Meyerozyma caribbica* JYC358, *Candida* sp. JYC363, *Torulasporea* sp. JYC369, *Cryptococcus laurentii* JYC370, *Pseudozyma* sp. JYC372 и *Aureobasidium pullulans* JYC375, выделенные из листьев росянки (*Drosera spatulata*), обладали способностью солубилизовать фосфаты из труднорастворимых неорганических соединений [62, с. 1117].

Основным механизмом солубилизации неорганического Р является снижение рН почвы за счет продуцирования органических и неорганических кислот, а также вследствие выделения протонов H^+ (рисунок 2). ФМГ выделяют различные низкомолекулярные кислоты, которые, будучи анионами, мобилизуют Р в результате лигандного обмена, либо путем хелатирования ионов Ca^{2+} , Al^{3+} и Fe^{3+} . Основными органическими кислотами, выделяемыми ФММ, являются лимонная, молочная, глюконовая, 2-кетоглюконовая, щавелевая, уксусная, яблочная, фумаровая, янтарная, винная, малоновая, глутаровая, пропионовая, масляная, глиоксалева и адипиновая. Среди неорганических кислот наиболее важную роль играют серная, азотная и угольная. Известно, что три- и дикарбоновые алифатические кислоты, более эффективны в солубилизации Р по сравнению с одноосновными и ароматическими кислотами [58, с. 2; 59, с. 174-175; 63, с. 99]. Эффективность фосфат-солубилизации в значительной степени определяется физико-химическими характеристиками почвы, а также количеством, составом и соотношением кислот, продуцируемых микромикетами [59, с. 175]. Высвобождение протонов, происходящее в

результате дыхания и/или ассимиляции аммония NH_4^+ (рисунок 2), для многих микромицетов является единственным механизмом солубилизации Р. Данный механизм описан для грибов *Penicillium bilaii*, *Penicillium fuscum* и *Penicillium rugulosum* [59, с. 175-176; 60, с. 7].

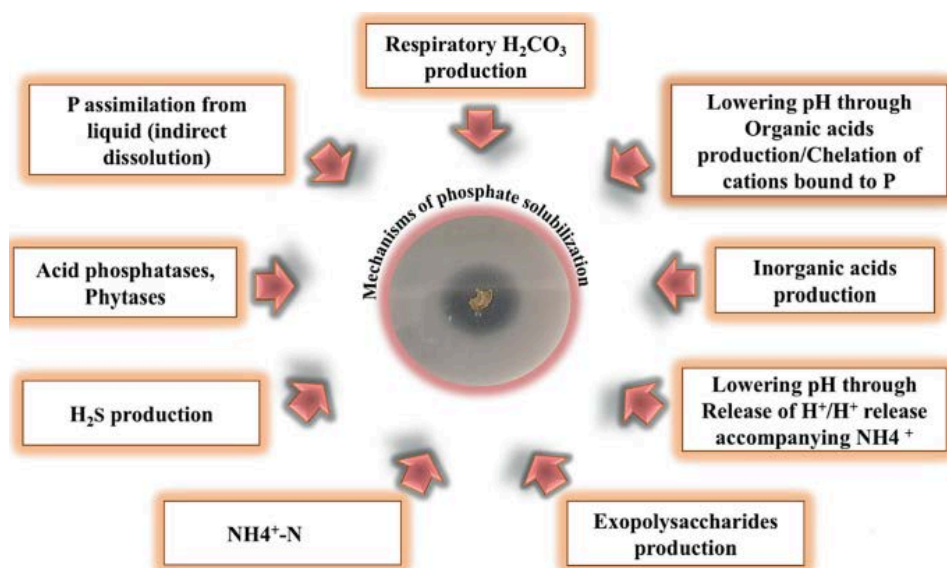


Рисунок 2 – Основные механизмы, вовлекаемые микромицетами для фосфат-мобилизации [63, с. 103]

Ключевым механизмом мобилизации органического Р в почве является его минерализация за счет продукции таких ферментов, как: фитазы и фосфатазы (рисунок 2). Фосфатазы гидролизуют фосфоэфирные и фосфоангидридные связи органического вещества и в зависимости от оптимума рН делятся на щелочные и кислые. Известно, что кислые фосфатазы выделяются не только микроорганизмами, но и растениями, в то время как щелочные фосфатазы в основном имеют микробное происхождение. Фосфатазы, выделяемые микроорганизмами, обладают большим сродством к соединениям Р, чем фосфатазы в составе корневых экссудатов растений. Фитазы мобилизуют Р в результате деградации фитата, который является основным компонентом органического Р в почве [59, с. 179-181; 60, с. 7-8]. Способность растений получать Р непосредственно из фитата крайне ограничена. Однако, было показано, что поглощение Р из фитата растениями арабидопсиса значительно повышалось, после их трансформации геном фитазы (*phyA*), полученным из гриба *Aspergillus niger*. В результате содержание Р в опытных растениях было эквивалентно контрольным растениям, получавшим неорганический Р. Таким образом продемонстрировано, что микроорганизмы являются ключевым фактором в минерализации фитатов в почве и их присутствие в ризосфере может компенсировать ограниченную способность растений поглощать Р напрямую из органических соединений [64]. Среди грибов, обладающих фитазной и фосфатазной активностями, известны различные штаммы *Aspergillus candidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus*

rugulosus, *Aspergillus terreus*, *Penicillium rubrum*, *Penicillium simplicissimum*, *Pseudeurotium zonatum*, *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma viride* [58, с. 4].

1.2.2 Синтез фитогормонов и сигнальных молекул как механизм стимулирования роста агрокультур

СРРМ способны синтезировать все основные растительные гормоны и гормоноподобные соединения: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовую, салициловую и жасмоновую кислоты [65, с. 1289]. Свойство микромицетов продуцировать вещества с гормональной и сигнальной функцией интенсивно используется при производстве биопрепаратов для стимуляции и регуляции роста растений. В сельском хозяйстве фитогормоны и гормоноподобные соединения находят широкое применение для активации прорастания семян и клубней, стимулирования процессов корнеобразования, регуляции роста и развития растений на разных стадиях, ускорения созревания и повышения урожайности. Кроме того, фитогормоны, являясь важными компонентами регуляторных систем растений, выполняют важную роль в формировании их адаптивных реакций в условиях стресса. Наибольшее число микроорганизмов-продуцентов фитогормонов и сигнальных молекул выявляется среди ассоциативных с растениями изолятов. Однако свободноживущие микромицеты также обладают способностью образовывать фитогормоны. Имеются многочисленные сведения о том, что фитогормоны микробного происхождения имеют строение, идентичное с растительными. Кроме того, механизмы синтеза и деградации фитогормонов у микроорганизмов и растений зачастую совпадают [66, с. 139-140].

Ауксины представляют собой гормоны-производные индола, участвующие в процессах развития растений, таких как: растяжение и дифференцировка клеток, формирование органов, активация корне- и ксилемообразования, процессы грави-, хемо- и фототропизма, образование фотосинтетических пигментов. Ауксины также контролируют реакции растений на стрессы биотической и абиотической природы [65, с. 1289-1290]. Наибольшая физиологическая активность характерна для индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), в то время как другие ауксины являются прекурсорами ИУК или продуктами ее трансформации [65, с. 1289; 66, с. 133]. Для микромицетов известны триптофан-зависимый и триптофан-независимый пути биосинтеза ауксинов. Синтез ауксинов из предшественника триптофана через индол-3-ацетамидный путь описан для мицелиальных грибов *Fusarium* sp. и *Colletotrichum gloeosporioides*, через индол-3-пируватный путь – для *Ustilago* и *Rhizoctonia* [65, с. 1290]. Триптофан-независимая продукция ауксина исследована у почвенных грибов *Trichoderma asperellum* и *T koningiopsis* [67], у эндофитного гриба *Cyanoderma asteris* [68]. Способность образовывать ИУК и другие ауксины выявлена у дрожжей рода *Saccharomyces*, у мицелиальных грибов *Absidia*, *Aspergillus*, *Actinomyces*, *Montilia*, *Phoma*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, у микоризообразующих грибов родов *Amanita*, *Laccaria*, *Hebeloma*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon* [66, с. 134-135]. Имеются данные о том, что эпифитные и ризосферные микромицеты выполняют основную роль в

превращении триптофана, содержащегося в корневых экссудатах растений, в ИУК. В растениях ИУК связывается с углеводами, отдельными аминокислотами и белками, формируя таким образом запасные формы, переходящие в биологически активное состояние при необходимости. Показано, что некоторые представители мицелиальных грибов (*Pisolithus tinctorius* и *Paxillus involutus*) обладают способностью образовывать связанные формы ИУК [66, с.135]. Положительное действие ауксинов, продуцируемых СРРМ, обусловлено преимущественно активацией развития корневой системы вследствие ее удлинения и ветвления. Стимуляция роста корней позволяет растениям более активно поглощать воду и питательные вещества из почвы, что в свою очередь дает им возможность быстрее проходить чувствительные к фитопатогенам стадии своего развития и тем самым усиливает устойчивость растений к болезням [57, с. 7].

Цитокинины представляют собой гормоны-производные аденина, происходящих из АТФ/АДФ/АМФ или путем дегградации тРНК. Различное химическое строение цитокининов обуславливает их полифункциональность и позволяет им регулировать такие физиологические процессы, как: синтез РНК и трансляция, деление растительных клеток, формирование хлоропластов, увеличение стабильности фотосинтетического аппарата при биотических и абиотических стрессах. Цитокинины играют важную роль в дифференцировке клеток, формировании и ветвлении корней и побегов, выходе из покоя спящих почек, участвуют в замедлении старения и необходимы для распределения питательных веществ [65, с. 1290-1291; 66, с. 137; 69, с. 257]. Мицелиальные грибы и дрожжи способны образовывать такие цитокинины, как: кинетин, зеатин, изопентениладенин и др. Биосинтез цитокининов у микромицетов происходит главным образом двумя путями: синтез изопреноидных цитокининов *de novo* осуществляется через аденозинфосфат, в то время как ароматические цитокинины синтезируются путем модификации и катаболизма молекул т-РНК. Соединения с цитокининовой активностью выявлены у микоризообразующих мицелиальных грибов, принадлежащих родам *Suillus*, *Rhizopogon* и *Paxillus*. Из культуральной жидкости гриба *Dictiostellium discoideum* выделен цитокинин изопентениладенин. У мицелиальных грибов родов *Phoma*, *Fusarium* и *Trichoderma*, ассоциированных с тропическими орхидеями *Pholidota articulata* и *Paphiopedilum appletonianum*, были выделены соединения, по структуре близкие к зеатину и кинетину [66, с. 138]. Показано, что различные виды микромицетов, в том числе сапрофитные, патогенные и симбиотические, продуцируют цитокинины. Имеются сведения о том, что данные гормоны играют роль в некоторых физиологических процессах самих грибов, особенно в развитии гиф и поглощении питательных веществ. Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* активно используют цитокинины в качестве дополнительного источника азота. В растениях фитогормоны данной группы присутствуют в физиологически неактивной форме (гликозиды и рибозиды), а также в свободном виде [66, с. 139]. Продуцируемые микромицетами цитокинины накапливаются в корнях и побегах растения и

способствуют лучшему усвоению питательных веществ и усилению процесса фотосинтеза у растений [65, с. 1291].

Гиббереллины представляют собой производные терпеноидов. Это наиболее обширная группа фитогормонов, в настоящее время включающая в себя свыше 100 соединений [66, с. 136; 69, с. 258]. Действие гиббереллиновых кислот (ГК) направлено на деление и растяжение клеток интеркалярных меристем, активацию синтеза амилаз и мембран, стимулирование всхожести семян, цветения и созревания плодов. ГК образуются из ацетата через промежуточный метаболит – мевалоновую кислоту. Энт-каурен является циклическим дитерпеном в биосинтезе ГК. Среди мицелиальных грибов способность к образованию растительных гормонов данной группы выявлена у *A. niger*, *A. flavus*, *P. corylophilum*, *P. cyclopium*, *P. funicolusum*, *Verticillium sp.*, *Shizopillium commune*. Наиболее активными продуцентами ГК являются мицелиальные грибы, принадлежащие *Phaeosphaeria*, *Fusarium* и *Gibberella fujikuroi*. Известно, что *Gibberella fujikuroi* в значительных количествах продуцирует ГК₃ и ее предшественников – ГК₄ и ГК₇ [66, с. 136-137]. Имеются данные о том, что эндофитные микромицеты *Phoma glomerata* и *Penicillium sp.*, продуцирующие биологически активные гиббереллоновые кислоты, улучшали рост и активировали защитные механизмы растения-хозяина при стрессовых условиях. Корневой эндофит *Piriformospora indica* повышал толерантность риса путем изменения баланса между гибберелловыми и жасмоновой кислотами. У микоризообразующих грибов гиббереллины влияют на рост и развитие самих грибов после формирования симбиоза с растениями [69, с. 258].

Абсцизовая кислота представляет собой сесквитерпен, который синтезируется из изопентенилфосфата. Микромицеты (патогенные, симбиотические и сапрофитные) могут образовывать абсцизовую кислоту через мевалонатный путь в цитозоле. Абсцизовая кислота выполняет защитную роль от инфекций и является ключевой сигнальной молекулой в растении при росте в таких стрессовых условиях, как засуха, засоленность почв, экстремальные температуры, дефицит фосфора [69, с. 259]. Данный растительный гормон способствует закрытию устьиц, что препятствует проникновению патогенов в листья, а также снижает скорость испарения воды с листовой поверхности, что оптимизирует водный обмен растений в условиях засухи. Также действие абсцизовой кислоты в условиях дефицита влаги связано с ее влиянием на повышение поглотительной способности корней вследствие активации водных каналов и на увеличение соотношения массы корней к побегам [57, с. 8-10]. Помимо этого, данный фитогормон регулирует различные физиологические процессы растений, в том числе созревание и покой семян, предотвращая их преждевременное прорастание [69, с. 259]. Способность к синтезу абсцизовой кислоты у микромицетов впервые выявлена у *Cercospora risicola*. Микоризообразующий мицелиальный гриб *Glomus sp.* продуцировал абсцизовую кислоту, что приводило к повышению ее количества в ксилемном соке растений [65, с. 1292].

Основная роль салициловой и жасмоновой кислот заключается в запуске каскада защитных реакций, обеспечивающих устойчивость растений к

различным инфекциям. Жасмоновая кислота индуцирует экспрессию генов основных PR-белков (pathogen-related proteins), в то время как салициловая – кислых PR-протеинов [57, с. 12]. Имеются сведения об антагонистическом эффекте защитных реакций, индуцируемых данными сигнальными молекулами. В условиях биотического стресса, вызванного фитопатогенными грибами и насекомыми, эндогенное применение жасмоновой кислоты приводило к подавлению защитных реакций в растениях, запускаемых салициловой кислотой, и наоборот [70]. Среди микромицетов способность к синтезу салициловой кислоты выявлена лишь у некоторых штаммов мицелиальных грибов *Moniliophthora perniciosa* и *Oudemansiella mucidau*. Микромицеты также способны продуцировать производные салициловой кислоты, например, 6-метилсалициловую кислоту. Однако данное соединение не превращается в биологически активную салициловую кислоту. Мицелиальный гриб *Cochliobolus victoriae* синтезирует вторичный метаболит викторин, который влияет на сигнальные и регуляторные пути защитных реакций, запускаемых салициловой кислотой [69, с. 260].

Таким образом способность микромицетов к синтезу соединений с гормональной и сигнальной функцией способствует изменению эндогенного гормонального баланса растений. В отличие от патогенов, для которых характерен гиперсинтез фитогормонов, СРРМ вырабатывают необходимое для растений количество гормонов, тем самым оптимизируя их гормональный статус. Кроме того, фитогормоны и сигнальные молекулы микромицетов индуцируют ряд механизмов, вовлеченных в защиту растений от стрессов биотической и абиотической природы. Также продуцируемые микромицетами фитогормоны влияют на развитие и физиологическую активность микрофлоры агроценозов, таким образом определяя функционирование всего сообщества в целом [57, с. 5-6; 66, с. 133; 69, с. 254-255].

1.2.3 Участие микромицетов в защите растений от фитопатогенной микрофлоры

Защита растений от фитопатогенов реализуется микромицетами посредством следующих физиолого-биохимических механизмов (рисунок 3): синтез внеклеточных гидролитических ферментов, которые деградируют клетки патогенов и некоторые соединения-эффекторы патогенов; продуцирование растворимых нелетучих веществ с антибиотической активностью; выделение летучих соединений; конкуренция с фитопатогенной микрофлорой за питательные вещества и нишу для колонизации; элиситорная активность микромицетов и индуцирование системной устойчивости растений [2, с. 767; 71, с. 148; 72, с. 4-5; 73, с. 1].

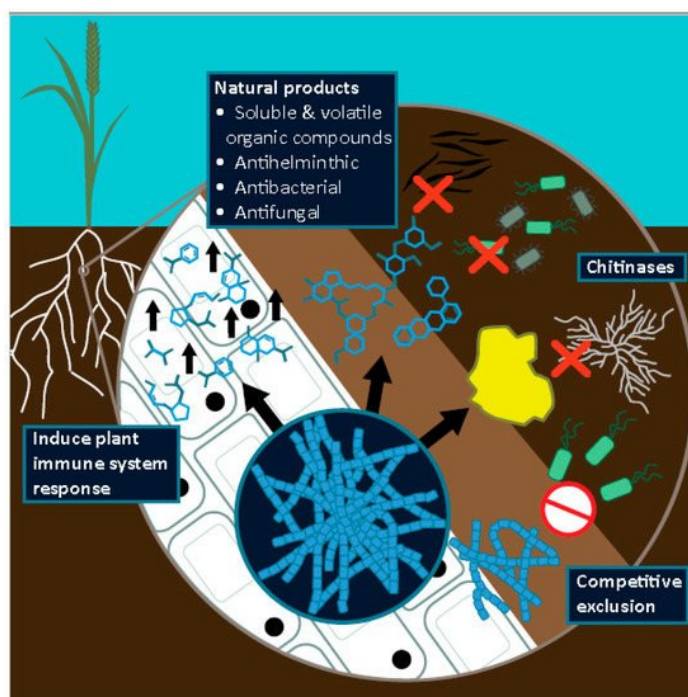


Рисунок 3 – Основные механизмы, вовлекаемые микромицетами для биоконтроля фитопатогенов [72, с. 5]

Способность продуцировать внеклеточные гидролазы (хитиназы, хитозаназы, глюканазы, целлюлазы, протеазы, липазы, ксиланазы, манназы и др.) штаммами микромицетов является важнейшим механизмом их антагонистического действия в отношении фитопатогенной микрофлоры. Данные ферменты способны разрушать структурные компоненты клеточной стенки, нарушать прорастание спор, лизировать ростковые трубки и гифы фитопатогенных грибов. Хитинолитическая активность, обуславливающая деградацию основного структурного полисахарида клеточной стенки патогенных грибов – хитина, является одним из значимых критериев, определяющих антагонистические свойства микромицетов. Это обусловлено тем, что в результате действия хитиназ не только ограничивается рост патогена, но и образуются хитоолигосахариды, которые являются эффективными элиситорами системной устойчивости растений [2, с. 768; 73, с. 12-13]. Эндо- β -1,3-глюканазы и экзо- β -1,3-глюканазы гидролизуют гликозидные связи в глюканах, которые являются вторым основным компонентом клеточной стенки грибов после хитина, а также выполняют важную роль во время деления клеток и вегетативного роста. Помимо хитина и глюкана клеточная стенка патогенов содержит целлюлозу, липиды и белки. Следовательно, целлюлазы, липазы и протеазы микромицетов в значительной степени обуславливают их антагонистические свойства. Среди мицелиальных грибов высокой активностью внеклеточных гидролаз характеризуются почвенные и эндофитные представители родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Piriformospora*, *Verticillium*, *Beauveria*, *Metarhizium*, а также эндо- и эктомикоризообразующих грибов *Glomus*, *Thelephora*, *Laccaria*, *Pisolithus* и *Suillus*. Имеются многочисленные сведения о способности биоконтрольных дрожжевых штаммов родов

Aureobasidium, *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Tilletiopsis* и *Wickerhamomyces* секретировать хитиназы, глюканы, пектиназы и протеазы [71, с. 150; 73, с. 12-15].

Еще одним из ключевых механизмов биоконтроля фитопатогенов является синтез различных нелетучих метаболитов с антибиотическими свойствами. Данные метаболиты представляют собой химически гетерогенную группу органических низкомолекулярных соединений, вырабатываемых микромицетами, которые даже в низких концентрациях негативно влияют на рост и/или метаболическую активность других микроорганизмов [71, с. 150; 73, с. 6]. Циклические депсипептиды, синтезируемые мицелиальными грибами *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Penicillium* и *Rosellina*, известны своими цитотоксическими, фитотоксическими, противомикробными, противовирусными, антигельминтными, инсектицидными, противомаларийными, противоопухолевыми и ферментингибирующими свойствами [74]. Микромицеты выделяют сидерофоры класса гидроксаматов. Основной механизм действия данных низкомолекулярных пептидов обусловлен их сродством к ионам трехвалентного железа, что обеспечивает преимущество СРРМ перед фитопатогенами при конкуренции за железо. Сидерофоры феррихром и фузаринин, продуцируемые *Fusarium* sp., и копрогены, продуцируемые *Trichoderma* sp., обладают выраженными антифунгальными свойствами [73, с. 8]. В экстрактах из культуры *Trichoderma* выявлены различные соединения с антибиотической активностью: триходермин, триходермол, глиовирин, глиотоксин, виридин, герцианолид. Эктомикоризные грибы *Boletus edulis*, *Suillus grevillei*, *S. luteus*, *Chroogomphus rutilus*, *Xerocomus chrysenteron*, *Alnicola* sp., *Laccaria fraterna*, *Lycoperdon perlatum*, *Pisolithus albus*, *Russula parazurea* продуцируют широкий спектр соединений, обладающих антагонистической активностью в отношении фитопатогенов *Alternaria solani*, *Botrytis* sp., *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *R. solani*, *S. rolfsii* и *S. vesiculosa*. Эндифитный гриб *Cryptosporiopsis quercine*, обычно связанный с листовными породами, продуцирует уникальную тетрамовую кислоту с антифунгальными свойствами - криптоцин, который ингибирует рост нескольких фитопатогенных грибов [71, с. 150]. Глиотоксин, синтезируемый некоторыми штаммами *Gliocladium virens* и *Aspergillus fumigatus*, приводит к нарушениям в структуре ДНК фитопатогенов, а также ингибированию прорастания их спор и конидий [73, с. 7]. Дрожжи по сравнению с мицелиальными грибами в значительно меньшей степени производят антибиотические соединения. Имеются сведения об антифунгальных свойствах ауреобазидинов, пиразинового пигмента пульхерримина и родоторуловой кислоты, которые продуцируются дрожжами *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* и *Rhodotorula* sp. Также известны киллерные токсины дрожжей *S. cerevisiae* и *Pichia membranifaciens*, обладающие широким спектром антибиотического действия [73, с. 7].

Микроорганизмы, в том числе микромицеты, способны продуцировать большое количество летучих веществ, подавляющее большинство из которых относится к летучим органическим соединениям (ЛОС). Для ЛОС характерна

низкая молекулярная масса (в среднем 300 Да), высокое давление паров и низкая температура кипения. Данные свойства дают им возможность распространяться в воздушной и водной среде, легко диффундировать в почве сквозь заполненные воздухом поры, оказывать воздействие как на коротких, так и длинных дистанциях. Многие ЛОС, выделяемые микромицетами, содержат соединения с длиной цепи C₆-C₁₆, относящиеся преимущественно к алкенам, алифатическим спиртам и кетонам. Также обнаруживаются монотерпены, сесквитерпены, кислоты, сложные эфиры и др. ЛОС могут подавлять и стимулировать рост микроорганизмов, индуцировать системную устойчивость растений, оказывать влияние как аттрактанты или репелленты на насекомых, нематод и другие организмы [75]. В работе Hummadi и соавт. показано, что ЛОС, выделяемые штаммами энтомопатогенного гриба *Metarhizium brunneum*, проявляют антагонистическую активность в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и фитопатогенных грибов *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* [76]. Имеются сведения о ЛОС с антифунгальными свойствами в отношении фитопатогенных видов, выделяемых представителями грибов *Beauveria*, *Muscodor*, *Phoma* и *Trichoderma* [77, 78]. Некоторые дрожжи, такие как *W. anomalus*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* и *A. pullulans* проявляют антагонистическую активность против *B. cinerea*, обусловленную ЛОС, наиболее эффективным из которых является 3-метил-1-бутанол [73, с. 10].

Одним из механизмов биоконтроля фитопатогенов является конкуренция микромицетов за питательные вещества и место обитания посредством выработанных эффективных стратегий колонизации, адаптации и сохранения высокой плотности популяции. Так, у некоторых видов *Trichoderma* интенсивное заселение корневой системы растений связано с повышенной активностью генов гидрофобина (таких как *TasHyd1* и *tvhydi1*), что облегчает прикрепление гиф мицелия к гидрофобным поверхностям корней. Имеются сведения о наличии у *Trichoderma* соединений, участвующих в колонизации корней растений: ферменты, гидролизующие компоненты растительных клеток (например, эндополигалактуроназа), и экспансиноподобные белки, распознающие целлюлозу (например, сволленин *TasSwo*). Кроме того, штаммы *Trichoderma* устойчивы к противомикробным соединениям, продуцируемым растениями (фитоалексины, фенолы и флавоноиды), что дает им преимущество в колонизации корней и ризосферы [71, с. 148-149; 73, с. 16-17]. Ограниченный доступ патогенов к растительным тканям и питательным веществам может быть также обусловлен влиянием микромицетов на физиологию и анатомию растений. Так, некоторые виды эндофитных мицелиальных грибов модифицируют транскриптом растений, усиливают одревеснение корневой системы и утолщение клеточной стенки пектинами, что приводит к ограничению продвижения патогенов в межклеточное пространство эпидермиса и коры. Эктомикоризные грибы защищают растения от корневых патогенов с помощью таких механизмов, как формирование физического барьера внутри (сеть Гартига) и вокруг (гифальная мантия) корней, ограничивающих доступ патогенов к местам заражения. Продемонстрирована способность дрожжевого штамма

Pichia angusta ANY-67 образовывать биопленку, предоставляющую ряд преимуществ в конкуренции с фитопатогенным грибом *Botrytis*. Некоторые микромицеты образуют сидерофоры, которые хелатируют ионы железа, создавая дефицит данного микроэлемента для фитопатогенной микрофлоры. Углерод является ключевым ресурсом, на который распространяется конкуренция между микоризообразующими грибами и совместно обитающими патогенами. Эффективная конкуренция за место и источники углерода (глюкоза и фруктоза) была предложена в качестве одного из способов действия антагонистических дрожжей (*Cryptococcus laurentii* и *Sporobolomyces roseus*) в отношении *B. cinerea*. Микромицеты могут также конкурировать за метионин, лейцин, некоторые микроэлементы и другие питательные вещества. Таким образом, интенсивно заселяя общую среду обитания, микромицеты лишают болезнетворных грибов пространства и ограничивают количество доступных питательных веществ, что приводит к снижению процессов прорастания спор и развития ростковых трубок патогена и, следовательно, уменьшению их способности к инвазии растения [71, с. 148-149; 73, с. 16-17].

Микромицеты способны подавлять развитие болезней в растениях не только вследствие синтеза различных метаболитов с антифунгальной активностью, но и за счет опосредованного механизма – путем активации системной устойчивости растений, регулируемой сигнальными соединениями (салициловая, абсцизовая, жасмоновая кислоты, этилен). Метаболиты, продуцируемые микромицетами, выступают в качестве триггеров, запускающих каскад защитных реакций в растениях. Защитные реакции при развитии системной индуцированной устойчивости, опосредованной микромицетами, обуславливают быстрое и раннее накопление активных форм кислорода, которые активируют редокс-чувствительные транскрипционные факторы и гены PR-белков, обладающих антимикробной активностью, а также регулируют взаимодействие сигнальных путей этилена, салициловой и жасмоновой кислот. Механизм системной индуцированной устойчивости также может быть связан с формированием барьера для проникновения патогена вследствие отложения каллозы и укрепления клеточных стенок растений, а также синтезом соединений с антибиотической активностью (фитоалексинов). Показана роль сидерофоров микромицетов в индуцировании системной устойчивости растений [2, с. 768-770; 73, с. 16-17].

1.2.4 Обеспечение защиты растений от воздействия избыточных концентраций тяжелых металлов

Поступление ТМ в почву агроценозов осуществляется естественным и техногенным путями. К естественным источникам относятся ветровая эрозия горных пород, вулканическая деятельность, испарения с поверхности морей и океанов, лесные пожары. Техногенное загрязнение ТМ связано преимущественно с горнодобывающей, металлургической, энергетической и химической промышленностью. Существенную роль в поступлении ТМ в почвы сельскохозяйственного назначения играют такие агротехнические мероприятия, как: внесение минеральных и органических удобрений, применение пестицидов

[79, с. 9-10; 80, с. 231]. Используемые для орошения сточные воды также являются источником загрязнения почв сельхозугодий ТМ (таблица 1).

Таблица 1 – Источники поступления тяжелых металлов (мг/кг) 1 класса опасности в почвы сельскохозяйственного назначения [81]

Тяжелый металл	Орошение сточными водами	Применение пестицидов	Удобрения			
			фосфорные	азотные	известковые	органические
Кадмий	2-1500	-	0,1-170	0,05-8,5	0,04-0,1	0,3-0,8
Свинец	50-3000	60	7-225	2-27	20-1250	6,6-15
Цинк	700-40000	1,3-25	50-1450	1-42	10-450	15-250
Мышьяк	2-26	22-60	2-1200	2,2-120	0,1-24	3-25
Ртуть	0,1-55	0,8-42	0,01-1,2	0,3-2,9	0,05	0,09-0,2

Некоторые ТМ, являясь микроэлементами, участвуют в физиологических и биохимических процессах в растительной клетке: энергетический обмен, гормональная регуляция, сигнальная трансдукция, первичный (дыхание, фотосинтез, синтез нуклеиновых кислот, белков, липидов) и вторичный метаболизм. Микроэлементы в растениях содержатся в концентрациях не более 0,001% от сухой массы клетки и включают следующие ТМ: ванадий, кремний, марганец, железо, кобальт, никель, медь, цинк. Известно, что 25-50% белков растительной клетки функционирует в присутствии данных ТМ, причем значительная часть (свыше 1200 белков) функционально связана с ионами цинка. Некоторые из этих металлов являются кофакторами ферментов. Данные ТМ необходимы растениям в достаточно низких концентрациях и становятся токсичными при избыточном содержании. ТМ, не относящиеся к микроэлементам растений, являются высокотоксичными и отрицательно воздействуют на рост и развитие растений даже в невысоких концентрациях, представляя угрозу их жизнедеятельности. К данным ТМ относятся основные контаминанты окружающей среды: кадмий, свинец, ртуть, мышьяк [80, с. 232]. Согласно ГОСТу ТМ мышьяк, кадмий, ртуть, свинец и цинк относятся к первому классу опасности, т.е. высоко опасным веществам [82]. ТМ по степени их фитотоксичности образуют следующую последовательность: $Cd^{2+} > Ni^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cr^{3+} > Pb^{2+}$ [80, с. 233].

В присутствии повышенных концентраций ТМ нарушается жизнедеятельность растений: замедляется их рост и развитие, происходят структурно-функциональные изменения, нарушаются многочисленные физиологические процессы (фотосинтез, дыхание, транспирация, транспорт ассимилятов и минеральных веществ и др.). В результате такого воздействия снижается продуктивность как отдельных растений, так и целых агроценозов [79, с. 23; 80, с. 232-233]. В исследованиях ряда авторов показано, что содержание кадмия в ризосфере в концентрации 25 мкМ снижало продуктивность зеленой массы ячменя, а увеличение концентрации до 50 мкМ приводило к снижению урожая пшеницы, кукурузы и риса. В присутствии свинца в количестве 800 мг/кг почвы значительно уменьшалась биомасса

побегов у различных сортов риса. При воздействии меди в концентрации 160 мкМ показатели биомассы корня и побега у фасоли снижались до 70%. ТМ отрицательно воздействуют не только на продуктивность надземной биомассы агрокультур, но также и на урожай семян и плодов. Так, в работе ряда авторов показано, что в присутствии повышенных концентраций кадмия, свинца и цинка снижается урожай зерна у ячменя, пшеницы и бобовых культур. Помимо этого, повышенные концентрации ТМ в почве ухудшают качество урожая, уменьшая содержание микроэлементов, незаменимых аминокислот, витаминов, жирных кислот и других питательных веществ. Накапливаясь в больших количествах в органах растений, используемых в пищу, ТМ оказывают вредное воздействие на организм человека и создают тем самым угрозу для его здоровья [83, с. 45-46].

Накоплен большой экспериментальный материал о роли микромицетов в защите растений от воздействия избыточных концентраций солей ТМ. Известно, что мицелиальные грибы и дрожжи могут накапливать ТМ, являющиеся микроэлементами, в количествах, значительно превышающих их потребности. Помимо эссенциальных ТМ, микромицеты аккумулируют также и токсичные металлы, которые не используются в метаболизме. Способность к накоплению ТМ описана для многих представителей почвенных и эндофитных мицелиальных грибов: *Microsporium*, *Trichoderma* [84], *Aspergillus* [84, 85], *Alternaria*, *Microdochium*, *Bipolaris*, *Alternaria*, *Pleosporales*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Clonostachys*, *Epicoccum* [86], *Fomitopsis*, *Trichoderma*, *Rhizopus* [87], *Paraphaeos*, *Pyrenochaeta*, *Rhizopycnis* [88], *Penicillium* [85, 89]. Среди дрожжей такая способность выявлена у различных видов родов *Cryptococcus* [90], *Candida* [90, 91], *Rhodotorula* [92], *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* [93], *Aureobasidium* [94].

Установлено, что микромицеты снижают поступление ТМ в растения из загрязненных почв путем различных механизмов: иммобилизация ТМ вне клетки, биосорбция на поверхности клеточной стенки, внутриклеточная аккумуляция, перевод в менее токсичные формы (рисунок 4). При этом один штамм может одновременно использовать несколькими механизмов [80, с. 236-237; 95, с. 10-11; 96, с. 9]. Некоторые ТМ (ртуть, кадмий, серебро и уран) сорбируются микромицетами преимущественно на поверхности клеток, лишь частично проникая внутрь. В то время как ионы меди, цинка, никеля, кобальта и марганца в большинстве случаев аккумулируются внутриклеточно [97, с. 17].

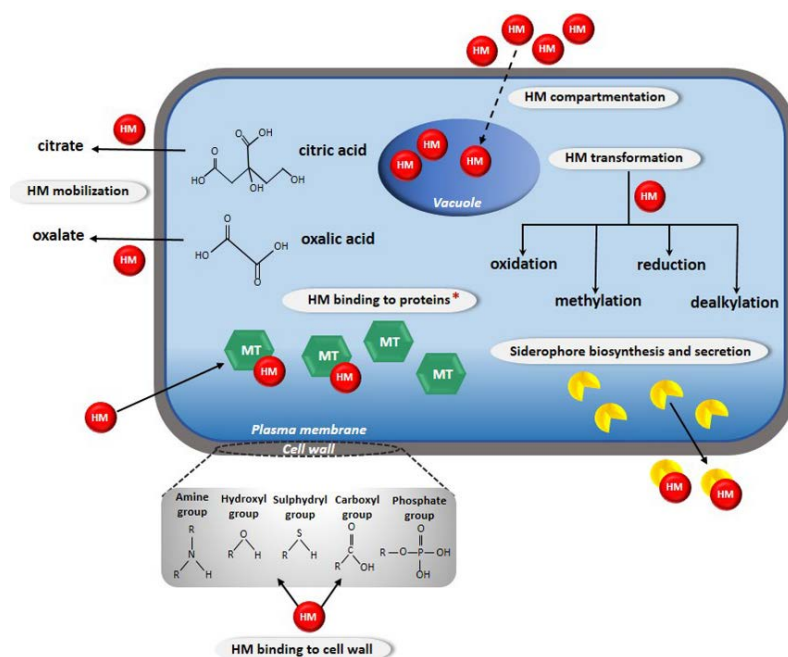


Рисунок 4 – Основные механизмы детоксикации тяжелых металлов микромицетами [96, с. 11]

Иммобилизация ТМ вне клетки осуществляется путем связывания их с хелатирующими соединениями, выделяемыми микромицетами: полисахаридами, белками и органическими кислотами. В результате из растворимых соединений ТМ образуются устойчивые комплексы и/или нерастворимые соли, что приводит к значительному снижению их биодоступности для растений. Среди органических кислот наиболее сильным хелатирующим агентом является щавелевая кислота, которая может взаимодействовать с ТМ как внутри-, так и экстраклеточно [80, с. 236; 95, с. 10-11; 96, с. 9]. Высокоэффективным соединением, связывающим и иммобилизующим широкий спектр ТМ является гликопротеин гломалин, который продуцируется в больших количествах на гифах и в спорах арбускулярных микоризообразующих грибов *Glomus* и *Gigaspora* [97, с. 29-30; 98].

Сорбция ионов ТМ на поверхности клеток происходит за счет их связывания с функциональными анионными группами клеточной стенки: карбоксильными, фосфатными, гидроксильными, сульфгидрильными и аминогруппами. В иммобилизации ТМ на поверхности клеток участвуют полисахариды хитозан и хитин, а также другие компоненты клеточной оболочки (меланины, глюканы и маннаны) [97, с. 29].

Внутриклеточная аккумуляция ТМ микромицетами осуществляется в два последовательных этапа: быстрая сорбция на поверхности клеток и последующее более медленное поступление ионов ТМ внутрь клетки путем активного транспорта. В цитоплазме глутатион и низкомолекулярные богатые цистеином белки металлотионеины хелатируют ТМ с формированием устойчивых комплексов. В исследованиях ряда авторов продемонстрировано участие фермента тирозиназы в связывании и детоксикации ТМ. Также показано

внутриклеточное связывание ТМ с полифосфатами. Кроме того, изоляция ТМ в клетках микромицетов осуществляется путем их компартментализации в вакуолях или цитоплазме [96, с. 11-12].

Еще одним механизмом является способность микромицетов к биотрансформации целого ряда ТМ посредством таких химических реакций, как: окисление, восстановление, метилирование и деалкилирование. Это обуславливает переход ТМ в менее токсичную для растений форму [96, с. 12].

Кроме прямого снижения поступления ТМ в растительные ткани микромицеты оказывают ряд опосредованных положительных эффектов, способствующих адаптации агрокультур при росте в стрессовых условиях, в том числе на загрязненных почвах. Важным механизмом антистрессового влияния микромицетов на растения является их способность продуцировать 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) дезаминазу. Этот фермент гидролизует аминокислоту АЦК, являющуюся предшественником этилена, биосинтез которого значительно увеличивается в стрессовых условиях, в том числе при воздействии ТМ. Превышение пороговой концентрации этилена в растительных тканях ускоряет процессы старения, вызывает гипертрофию, эпинастию и дефолиацию, приводит к ингибированию удлинения корня, подавлению нодуляции, нарушению транспорта ауксинов. Благодаря АЦК-дезаминазе, образуемой микромицетами, уровень этилена в растительных тканях заметно снижается, что ведет к увеличению устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам [95, с. 12-13; 99]. Кроме того, защитная деятельность микромицетов реализуется в улучшении минерального питания растений, которое нарушается под влиянием ТМ [95, с. 14].

Таким образом, инокуляция штаммами микромицетов является перспективным подходом для снижения токсического эффекта ТМ и улучшения роста растений на загрязненных почвах.

1.3 Биопрепараты на основе микромицетов и их БАВ, применяемые в Казахстане и за рубежом

Использование биопрепаратов как для защиты растений от неблагоприятных факторов окружающей среды, так и для стимулирования их роста является одним из приоритетных и перспективных направлений в биотехнологии и защите окружающей среды. Такие технологии предусматривают применение микробиологических препаратов, содержащих в своем составе БАВ и/или живые клетки микроорганизмов, которые находятся или в суспендированной форме, или адсорбированы на носителе. Положительный эффект биопрепаратов достигается благодаря комплексу факторов: усилению фиксации азота, стимулированию роста растений продуцируемыми метаболитами, улучшению усвоения элементов минерального питания и влаги, регуляции гормонального статуса растений, биоконтролю фитопатогенной микрофлоры и других механизмов [6, с. 4].

Применение биопрепаратов на стадии предпосевной обработки семян значительно повышает энергию прорастания и всхожесть, кроме того, обеспечивает защиту растений от корневых гнилей. Использование препаратов

в вегетативной стадии развития растений способствует поступлению доступных форм минерального питания, подавляет развитие патогенных микроорганизмов в начальных фазах развития, регулирует гормональный фон растений, способствует регуляции жизненно важных функций и защитно-приспособительных реакций. Однако степень положительного действия препаратов в значительной мере варьирует в зависимости от видовых и сортовых особенностей растений, вида микроорганизмов, почвенно-климатических условий и проводимых агротехнических мероприятий [100-102].

На текущий момент в Казахстане зарегистрировано и разрешено к применению 19 биопрепаратов казахстанского, российского и китайского производства. Все препараты предназначены для борьбы с болезнями бактериальной и грибной этиологии, а также с насекомыми-вредителями. Подавляющее большинство данных препаратов в качестве активного действующего вещества содержит споры и метаболиты различных штаммов бактерий видов *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*. Три биопрепарата разработаны на основе штаммов мицелиальных грибов: Биобовин, Миколар-М и Миколар-В [3].

Препарат Биобовин разработан отечественной компанией ТОО «Научно-аналитический центр «Биомедпрепарат», имеет жидкую препаративную форму, содержит споры *Beauveria bassiana*. Применяется на участках, заселенных саранчовыми (в частности, итальянский прус и азиатская саранча) в виде опрыскивания в период массового отрождения личинок младших возрастов [3].

Сотрудниками ТОО «КазНИИ защиты и карантин растений им. Ж. Жиёмбаева» совместно с ФГБНУ «Всероссийский институт защиты растений» разработаны препараты Миколар-М и Миколар-В на основе масляных суспензий споровых концентратов *Metarhizium anisopliae* и *Beauveria bassiana*. Данные инсектицидные биопрепараты на основе энтомопатогенных грибов применяются для борьбы с вредными саранчовыми: азиатская саранча (*Locusta migratoria migratoria* L.), мароккская саранча (*Doclostaurus maroccanus* Thnb.), итальянский прус (*Calliptamus italicus* L.) [103].

Помимо имеющихся зарегистрированных биопрепаратов, описанных выше, казахстанскими учеными активно ведутся научно-прикладные исследования в области создания биопрепаратов, повышающих плодородие почвы и урожай сельскохозйственных культур.

Группой сотрудников под руководством Заядан Б.К. созданы два микробных консорциума ZOB-1 (*Anabaena variabilis*– *Chlorella vulgaris*– *Azotobacter* sp) и ZOB-2 (*Nostoc caldicola*–*Chlorella vulgaris*–*Azotobacter* sp.) на основе цианобактерий, микроводорослей и азотобактерий. Данные консорциумы рекомендованы к применению в агробиотехнологии как биостимуляторы и биоудобрения для сельскохозйственных культур [104].

Разработан препарат «Олжа», эффективный в климатических условиях Южно-Казахстанской области. Препарат содержит консорциум термофильных штаммов мицелиальных грибов, бактерий и актиномицетов: *Aspergillus niger* MT-65, *Penicillium chrysogenum* MT-65, *Leuconostoc citrovorum* MT-55, *Lactobacillus bulgaricus* MT-65, *Lactobacillus acidophilus* MT-65, *Azotobacter*

chroococcum МТ-55, *Azotobacter vinelandii* МТ-55, *Azotobacter agilis* МТ-55, *Streptococcus lactis* МТ-60, *Actinomyces antocyaneus* МТ-65. Биопрепарат «Олжа» предназначен для обработки семян перед посевом, обработки растений путём опрыскивания, переработки пищевых и растительных отходов с последующим внесением компоста в почву в качестве биологического удобрения, для улучшения плодородия и повышения урожайности растений. Эффективность препарата продемонстрирована на растениях пшеницы [105].

Для повышения урожайности бобовых культур и обогащения почв азотом в Институте микробиологии и вирусологии МОН РК разработан биопрепарат «Ризовит АКС», авторами которого являются группа сотрудников под руководством А.К. Саданова. Биопрепарат «Ризовит АКС» получен на основе местных штаммов клубеньковых бактерий, выпускается в порошковом и жидком виде. Данный биопрепарат практически вдвое повышает урожай люцерны и донника, при этом обогащает почву легкодоступным для растений биологическим азотом. Применение биопрепарата позволяет получить прибавку урожая последующих культур в среднем на 30-40%. В 2008-2013 годах препарат «Ризовит-АКС» применен на полях в крестьянских хозяйствах Алматинской, Карагандинской, Северо-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областей на площади более 60 тыс. гектаров [106].

В международной практике широкое применение нашли препараты на основе микромицетов и их метаболитов. Имеются многочисленные данные о применении в составе препаратов грибов родов *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Coniothyrium*, *Fusarium* (непатогенные виды), *Gliocladium*, *Pythium* [11]. В составе коммерческих биопрепаратов, применяемых в странах ЕС и США, используют штаммы дрожжей *Metschnikowia fructicola*, *M. pulcherrima*, *Candida oleophila*, *C. tropicalis*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia anomala* [12].

Одним из перспективных агентов для включения в состав биопрепаратов являются различные виды рода *Trichoderma*, преимущественно *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride* и *T. asperellum*. Они способны осуществлять биоконтроль широкого спектра фитопатогенов, продуцируют БАВ, обладают рострегулирующей активностью, способствуют увеличению поглощения растением микро- и макроэлементов, стимулируют развитие на корнях азотфиксирующих бактерий и т.д.) [107]. Различные виды *Penicillium* широко известны как продуценты БАВ, эффективные фосфат-мобилизаторы (в частности *P. bilaiae*) и регуляторы роста растений [108]. В качестве инсектицидных и фунгицидных средств защиты различных видов растений наиболее часто используют грибы родов *Beauveria* (в частности, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *B. felina*) и *Metarhizium* (*Metarhizium anisopliae*, *M. acridum*, *M. robertsii* и *M. brunneum*), а также родов *Cordyceps*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* [109].

Несмотря на подтвержденную эффективность действия и крупномасштабное применение грибных препаратов, в Казахстане разработка и использование биопрепаратов на основе штаммов микромицетов крайне ограничены. Разработка препаратов с включением аборигенных штаммов

является более предпочтительной по сравнению со штаммами другого происхождения, поскольку местные изоляты приспособлены к почвенно-климатическим условиям Казахстана, что значительно повышает их приживаемость и конкурентоспособность и, как следствие, эффективность. Всё это обосновывает актуальность, новизну и перспективность проведения представленной работы.

2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследований

Материалом исследования служили штаммы микромицетов, выделенные из 7 сельскохозяйственных культур и почв агроценозов данных растений. Место сбора растений и почвенных образцов: Алматинская обл., частная агропромышленная фирма «Турген» (43°27'N 77°34' E, 817 м над ур.м.). Общая характеристика агрокультур и почв представлена в таблице 2. Анализ почвенных образцов проведен в ТОО «Казахский научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии имени У.У.Успанова». Согласно международной классификации [110] все исследуемые почвенные образцы отнесены к легкосуглинистым темно-каштановым почвам.

Таблица 2 – Общая характеристика агрокультур и почвенных образцов, используемых для выделения микромицетов

Сельскохозяйственная культура		Характеристики почвы							Валовое содержание тяжелых металлов, мг/кг		
		рН	Гумус, %	Общий N, г/кг	Валовый P, г/кг	Подвижный P, мг/кг	Cd	Zn			
Вид	Целевое назначение										
Соя (<i>Glycine max</i>) сорт Алматы	Продовольственная, кормовая	8,3 ± 0,2	2,61± 0,1	1,9 ± 0,05	1,9 ± 0,07	12,2 ± 0,5	1,9± 0,05	152,5± 6,2	24,9± 1,1		
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>) сорт Байшешек	Продовольственная	8,4 ± 0,3	2,76± 0,12	1,7 ± 0,03	1,7 ± 0,08	12,1 ± 0,4	1,2± 0,04	148,3± 7,3	22,1± 0,1		
Люцерна (<i>Medicago sativa</i>) сорт Семиреченская	Кормовая	8,4 ± 0,2	2,57± 0,1	1,9 ± 0,07	1,9 ± 0,06	12,5 ± 0,3	1,3± 0,05	127,2± 5,5	18,8± 0,7		
Рапс (<i>Brassica napus</i>) сорт Юбилейный	Масличная, кормовая	8,1 ± 0,1	2,44± 0,05	1,8 ± 0,05	1,8 ± 0,07	12,7 ± 0,5	1,1± 0,04	115,2± 4,2	15,5± 0,4		
Сафлор (<i>Carthamus tinctorius</i>) сорт Центр 70	Масличная	8,2 ± 0,2	2,55± 0,08	1,4 ± 0,02	1,7 ± 0,05	11,9 ± 0,5	1,7± 0,04	154,4± 7,1	23,5± 0,9		
Донник (<i>Melilotus officinalis</i>) сорт Сарайчик	Кормовая	8,5 ± 0,3	2,68± 0,1	1,6 ± 0,03	1,6 ± 0,06	11,8 ± 0,4	1,2± 0,03	134,5± 5,4	13,4± 0,5		
Эспарцет (<i>Onobrychis viciifolia</i>) сорт Шабындык	Кормовая	8,3 ± 0,2	2,78± 0,14	1,9 ± 0,06	1,6 ± 0,05	12,2 ± 0,3	0,9± 0,03	128,3± 4,5	15,2± 0,6		
Целинная почва		8,3 ± 0,2	2,65± 0,1	1,7 ± 0,06	1,4 ± 0,05	11,9 ± 0,3	0,8± 0,03	107,3± 5,5	12,2± 0,4		

2.2 Методы исследований

2.2.1 Выделение микромицетов и характеристика микромицетных сообществ

Отбор почвенных образцов. С трех участков площадью 100 м² стерильными инструментами отбирали почвенные образцы методом «конверта» с глубины 0-10, 10-20 и 20-30 см, снимая верхний слой толщиной 2 см. Среднюю почвенную пробу получали смешиванием отдельных образцов. Из почвы вынимали корни растений, различные включения, подсушивали на воздухе и просеивали через сито с отверстиями 2 мм. Почвенные образцы хранили при 4 °С [111, с. 11].

Сбор растений. В вегетативную фазу роста собирали по пять растений каждого вида, расположенных на расстоянии 10 м друг от друга. Корневую систему каждого растения осторожно встряхивали для удаления почвы. Каждый образец помещали отдельно в стерильный полиэтиленовый пакет.

Выделение микромицетов из почвенных образцов проводили методом посева разведений (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6}) почвенной суспензии на питательные среды Сабуро и Чапека с последующим выделением индивидуальных колоний в чистую культуру. Посевы инкубировали при температуре 25 °С в течение 14 дней [111, с. 24 - 25].

Выделение эндофитных микромицетов из органов растений (корней, стеблей и листьев) проводили методом посева фрагментов [112, с. 63] с использованием картофельно-декстрозного агара (КДА). От каждого вида растений было получено двадцать зрелых листьев, пять зрелых стеблей и пять главных корней, за исключением ячменя, с которого было собрано десять листьев. Собранные органы растений промывали под проточной водопроводной водой, затем разрезали на фрагменты размером 0,5 см (по 50 штук на каждый орган растения каждого вида). Поверхность этих фрагментов стерилизовали погружением в 70% этанол на 1 мин и 3% гипохлорит натрия на 2 мин с последующим промыванием в стерильной дистиллированной воде в течение 2 мин для удаления эпифитных микроорганизмов. Стерилизованные фрагменты помещали в чашки Петри, содержащие КДА с добавлением 50 мг/л стрептомицина и 50 мг/л тетрациклина, чтобы избежать контаминации эндофитными бактериями. Культуры инкубировали при 25 °С в течение 14 дней и ежедневно проверяли. Для проверки стерилизации поверхности растительных фрагментов 100 мкл воды, использованной для окончательного промывания, также высевали на КДА.

Количественный учет почвенных микромицетов осуществляли путем подсчета выросших колоний. Численность жизнеспособных клеток микроорганизмов выражали количеством колониеобразующих единиц (КОЕ) с последующим пересчетом на 1 г почвы [111, с. 25].

Количественный учет эндофитных микромицетов осуществляли по следующим показателям: количество изолятов, уровень колонизации и коэффициент выделения. Уровень колонизации определяли как количество фрагментов растительных образцов, колонизированное одним или несколькими эндофитными микромицетами, деленное на общее количество инкубированных фрагментов, выраженное в процентах. Коэффициент выделения эндофитов

рассчитывали как количество изолятов, полученных из растительных фрагментов, деленное на общее количество фрагментов [112, с. 64].

Определение таксономического состава сообществ микромицетов. Выросшие колонии мицелиальных грибов и дрожжей разделяли на макроморфологические типы, затем подсчитывали число колоний каждого типа на чашке. Идентификацию микромицетов осуществляли классическими микробиологическими методами по совокупности морфологических признаков и культурально-физиологических свойств, используя современные определители для соответствующих групп и родов микромицетов [113-116].

Таксономическую структуру сообществ микромицетов оценивали по относительному обилию и пространственной частоте встречаемости представителей различных родов. Относительное обилие рода определяли как отношение колоний данного рода к общему количеству колоний в данном варианте, выраженное в процентах. Пространственная частота встречаемости определялась как доля образцов, в которых обнаружен данный род, от общего числа проанализированных образцов. По частоте встречаемости в образцах роды микромицетов были ранжированы по трем группам: 1 -доминирующие (частота встречаемости составляет более 60%); 2 - частые (от 30% до 60%); 3 - редкие (менее 30%) [18].

2.2.2 Определение фосфат-мобилизирующей активности

Фосфат-мобилизирующую активность выявляли по способности штаммов расти на плотной питательной среде Пиковской, содержащей труднорастворимые соединения Р (Са-фосфат и Са-фитат) и формировать зоны гало вокруг колоний. Способность к фосфат-мобилизации оценивали путем определения индекса солубилизации (ИС), который вычисляли по отношению диаметра колонии с зоной просветления к диаметру колонии [117, с. 91-92]. Для количественного определения содержания растворимого фосфора штаммы микромицетов выращивали на жидкой среде Пиковской с добавлением Са фосфата и Са фитата при 180 об/мин при 25 °С в течение 14 дней. В качестве контроля использовали неинокулированную среду. Биомассу отделяли путем фильтрования культуры через бумажный фильтр (Whatman №2), высушили в течение 48 ч при 80 °С и взвешивали. Для удаления нерастворимых соединений фосфора фильтраты центрифугировали при 9000 ×g в течение 20 мин. Полученные супернатанты использовали для определяли содержания растворенного Р колориметрическим методом с аскорбиновой кислотой и молибденовым синим при 405 нм [118]. рН супернатантов измеряли с помощью иономера И-160М (Антех, Беларусь). Эффективность солубилизации рассчитывали как процент мобилизованного Р от начального количества нерастворимого Р [119, с. 156-157]. Количественная оценка солубилизации/минерализации фосфора пятью отобранными штаммами грибов проводилась в течение 14 дней с двухдневным интервалом. Пять наиболее перспективных штаммов были дополнительно испытаны на способность мобилизовать труднорастворимые источники фосфора: $AlPO_4$ и $FePO_4 \cdot 4H_2O$.

Активность внеклеточных фосфатаз. Штаммы грибов выращивали в жидкой среде Пиковской с добавлением Са фосфата или Са фитата в течение 7 дней при 180 об/мин и 25 °С, после чего культуры центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 мин. Фосфатазную активность измеряли в супернатантах спектрофотометрическим методом при 405 нм с использованием 23 мМ п-нитрофенилфосфата в качестве субстрата. Для определения активности кислой фосфатазы использовали 0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 5,5), щелочной фосфатазы - 0,1 М универсальный буфер (рН 9,0). Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М NaOH. За единицу ферментативной активности (Ед) принимали количество фермента, продуцируемого на грамм сухого мицелия, гидролизующего 1 мкмоль п-нитрофенилфосфата в минуту в 1 мл супернатанта [119, с. 156-157].

Определение органических кислот. Штаммы грибов инкубировали в жидкой среде Пиковской с добавлением Са фосфата в течение 7 дней при 180 об/мин и 25 °С, после чего культуры центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 мин. Супернатанты и незасеянные среды (в качестве контроля) упаривали досуха при 45 °С на роторном вакуумном испарителе Heidolph Hei-VAP Precision (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия) и суспендировали в 1 мл воды Milli-Q. Полученные образцы перед хроматографическим анализом фильтровали в микропробирках Costar® Spin-X® (Sigma-Aldrich Int.) с нейлоновыми мембранными фильтрами с диаметром пор 0,22 мкм. Количественный состав органических кислот определяли с помощью системы УЭЖХ ACQUITY UPLC H-Class (Waters, США). Органические кислоты разделяли в 10 мМ ортофосфорной кислоте на колонке ACQUITY CSH C18 (2,1×75 мм, диаметр частиц сорбента 1,7 мкм) при скорости потока подвижной фазы 0,1 мл/мин и температуре 24 °С. Детектирование выходящего из колонки элюента осуществляли на детекторе с фотодиодной матрицей eλ PDA при длине волны 220 нм.

Мобилизация фосфора штаммами микромицетов в почве. Нестерильную почву (300 г) помещали в пластиковые сосуды размером 65×65×100 мм. В каждый сосуд добавляли по 20 мл инокулюма и тщательно перемешивали с почвой. В качестве контроля использовали стерильную дистиллированную воду. Схема опыта включала шесть вариантов обработок: 1) контроль (вода), 2) *P. bilaiae* Pb14, 3) *P. bilaiae* C11, 4) *P. rubens* EF5, 5) *T. pinophilus* T14 и 6) *Aspergillus* sp. D1. Сосуды с почвой были расположены в соответствии с полностью рандомизированным дизайном для одного изменяемого параметра (тип обработки) с пятью повторами для каждого варианта. Влажность почвы поддерживали на уровне 60% путем взвешивания сосудов и восполнения потерянной влаги стерильной дистиллированной водой. Образцы почвы (10 г) отбирали из верхнего слоя стерильным шпателем и определяли содержание свободного фосфора и рН каждые 10 дней в течение 50 дней. Для экстракции растворимого Р использовали 0,5 М раствор бикарбоната натрия (рН 8,5). Экстрагированный Р измеряли колориметрическим методом с аскорбиновой

кислотой и молибденовым синим [118]. рН почвы измеряли с помощью иономера И-160М (Антех, Беларусь).

2.2.3 Определение фитогормонов и сигнальных молекул

Штаммы микромицетов выращивали в жидкой среде Сабуро с добавлением 1% L-триптофана в качестве предшественника в течение 7 дней при 180 об/мин и 25 °С, после чего культуры центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 мин.

При проведении скрининга наличие ауксинов в супернатанте выявляли с помощью высокоспецифичной качественной реакции Сальковского на индольные вещества [120]. К 1 мл супернатанта добавляли 1 мл реагента Сальковского, выдерживали в течение 30 мин и отмечали изменение окраски.

Для количественного определения фитогормонов (ауксины, абсцизовая кислота, салициловая кислота, гибберелловая кислота ГКЗ) супернатанты подкисляли 0,4N соляной кислотой до рН 3,0 и экстрагировали равными объемами этилацетата. Органическую фазу, содержащую фитогормоны, упаривали досуха при 35 °С на роторном вакуумном испарителе Hei-VAP Precision (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия) и образовавшийся осадок суспендировали в 0,5 мл 18% ацетонитрила. Полученные образцы перед хроматографическим анализом фильтровали в микропробирках Costar® Spin-X® (Sigma-Aldrich Int.) с нейлоновыми мембранными фильтрами с диаметром пор 0,22 мкм. Фитогормоны разделяли на колонке ACQUITY UPLC BEH RP18 Shield (2,1×50 мм, диаметр частиц сорбента 1,7 мкм) в смеси 0,1 % муравьиной кислоты (раствор А) и ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислоты (раствор Б) при скорости потока 0,3 мл/мин с изократной элюцией 18 % раствором Б в течение 5 мин с последующей промывкой 80 % раствором Б в течение 2 мин и кондиционированием колонки 18% раствором Б в течение 3 мин. Ауксины и салициловую кислоту определяли с помощью флуоресцентного детектора ($\lambda_{ex} = 280$ нм, $\lambda_{em} = 350$ нм для ауксинов, $\lambda_{ex} = 300$ нм, $\lambda_{em} = 405$ нм для салициловой кислоты). Гибберелловую кислоту ГКЗ и абсцизовую кислоту определяли с помощью детектора с фотодиодной матрицей eL PDA при длине волны 208 и 265 нм, соответственно [121, с. 4].

2.2.4 Определение антагонистической активности

Изучение антагонистической активности методом двойных культур [122, с. 575]. Штаммы микромицетов и фитопатогенных грибов (*Phytophthora infestans*, *Fusarium graminearum* и *Alternaria alternata*) выращивали сплошным газоном на поверхности плотной питательной среды Сабуро в течение 5 суток, затем вырезали блоки 5 мм в диаметре. В чашке Петри на поверхности среды с одного края располагали блок с культурой фитопатогена, с другого края помещали блок исследуемого штамма-антагониста. Контролем служили чашки только с культурой фитопатогена.

Индекс ингибирования роста (ИИР) фитопатогенных грибов рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ИИР} = (R1 - R2)/R1 \times 100\%, \quad (1)$$

где ИИР - индекс ингибирования роста, %; R1 - размер колонии фитопатогена в контрольном варианте, мм; R2 – размер колонии фитопатогена в варианте с антагонистом, мм [122, с.575].

Способность продуцировать ЛОС определяли методом двойных чашек [122, с.575]. В одну чашку Петри на поверхность среды Сабуро сеяли штрихом штамм-антагонист и инкубировали при 25 °С в течение 2 суток. В другую чашку на поверхность среды помещали блок 5-суточной культуры фитопатогенного гриба размером 5 мм. Обе чашки совмещали таким образом, чтобы избежать прямого соприкосновения культур, и заклеивали края двумя слоями парафильма. Контролем служила пара чашек, из которых одна была засеяна фитопатогеном, а вторая содержала только среду Сабуро. Чашки инкубировали при 25°С в течение 3 дней. Затем определяли ИИР по формуле, описанной выше.

Определение активности гидролитических ферментов. Штаммы микромицетов выращивали в жидкой среде Сабуро с добавлением хитина (при определения хитиназы) или Na-КМЦ (при определении глюканазы) в течение 7 дней при 180 об/мин и 25 °С, после чего культуры центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 мин. Супернатант использовали для определения хитиназной и β-1,3-глюканазной активности.

Активность хитиназы определяли спектрофотометрическим методом с динитросалициловой кислотой [122, с. 576] по количеству N-ацетилглюкозамина, высвободившегося из коллоидного хитина, используемого в качестве субстрата. За единицу активности (Ед) хитиназы принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкг N-ацетилглюкозамина в минуту.

Активность β-1,3-глюканазы определяли спектрофотометрическим методом с динитросалициловой кислотой [122, с. 576] по количеству редуцирующих сахаров, образовавшихся в результате гидролиза Na-КМЦ, используемой в качестве субстрата. За единицу активности (Ед) -1,3-глюканазы принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкг редуцирующих сахаров в минуту.

Экстракция метаболитов из культуры M. robertsii An1 и оценка антагонистической активности экстрактов. Штамм мицелиального гриба *M. robertsii* An1 выращивали на жидких питательных средах Сабуро и Чапека в течение 7 суток при 180 об/мин и 25 °С. По окончании инкубации отделяли биомассу путем фильтрования культуры через бумажный фильтр (Whatman №2). Экстракцию метаболитов осуществляли в ультразвуковой ванне в течение 10 мин: из фильтрата - этилацетатом, из сухого измельченного мицелия - гексаном, а затем этилацетатом. Растворитель отгоняли при 40°С на роторном вакуумном испарителе Hei-VAP Precision (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия), определяли массу сухого остатка. Полученный сухой остаток суспендировали в стерильной воде для получения растворов с концентрацией 5 мг/мл [123]. Оценку антагонистической активности полученных экстрактов проводили методом бумажных дисков на культурах фитопатогенных грибов *P. infestans*, *F.*

graminearum и *A. alternata*. Через 5 дней измеряли зону лизиса фитопатогенов и вычисляли ИИР.

Хроматографический анализ экстрактов. Разделение экстрактов проводили с помощью системы ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ) ACQUITY UPLC H-Class (Waters, США) и с быстросканирующим (диодно-матричным) УФ-детектором на обращенно-фазной колонке Acquity UPLC VEN C8 (50x2.1 мм, диаметр частиц сорбента 1.7 мкм). Элюирование проводили в системе ацетонитрил–0.1% муравьиная кислота в следующем градиенте: 10–30% ацетонитрила в течение 2 минут, 30% ацетонитрила – 2 минуты, 30–100% ацетонитрила – 3 минуты, 100% ацетонитрила – 2 минуты. Скорость потока составляла 300 мкл/мин, температура колонки 40°C, объем вводимой пробы – 1 мкл экстракта. Пробы экстрактов готовили растворением сухого остатка в ацетонитриле до концентрации 5 мг/мл. Детектирование веществ осуществляли сканированием в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм (с использованием функции MaxPlot программы Empower 3, Waters). Вещества сравнивали по времени удерживания и их УФ-спектрам.

2.2.5 Определение устойчивости к тяжелым металлам

При проведении скрининга устойчивость микромицетов к ТМ определяли по способности штаммов расти на плотной питательной среде Сабуро с добавлением солей цинка, кадмия и свинца в концентрации 1 мМ. Устойчивость к ТМ оценивали путем вычисления индекса толерантности (ИТ) по соотношению диаметра колонии в опыте и контроле [87, с. 31].

Определение минимальной ингибирующей концентрации Cd. Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) исследуемые микромицеты высевали на агаризованную среду Сабуро с добавлением солей Cd в концентрациях от 100 до 2500 мкг/мл. МИК определяли как наименьшую концентрацию, при которой не наблюдалось жизнеспособных колониеобразующих единиц (КОЕ) после 14 дней инкубации при 25 °С [86, с. 1099].

Биоаккумуляция Cd штаммами микромицетов. Культуры выращивали на жидкой среде Сабуро с добавлением Cd в концентрации 100 мкг/мл при 160 об/мин и 25 °С в течение 7 сут. Биомассу мицелиальных грибов отделяли путем фильтрования через бумажный фильтр с размером пор 3,0-3,5 мкм, дрожжей – путем центрифугирования при 11 000 ×g в течение 15 минут. Полученную биомассу высушивали при 80 °С и взвешивали. Высушенную биомассу ресуспендировали в течение 30 мин в 20мМ растворе ЭДТА для десорбции Cd с поверхности клеток и центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 минут. Полученный осадок использовали для определения количества Cd, аккумулярованного внутриклеточно, а супернатант – для Cd, аккумулярованного на поверхности клеток. Пробоподготовку осуществляли путем кислотного разложения. Для этого клетки и супернатанты обрабатывали 67% HNO₃, после чего раствор HNO₃ выпаривали, а твердые вещества повторно растворяли в 0,1М HCl. Концентрацию Cd измеряли на атомно-абсорбционном спектрометре Analyst 400 (PerkinElmer, Германия) в воздушно-ацетиленовом

пламени. Использовали следующие условия: аналитическая линия поглощения Cd 228,8 нм; ширина щели 0,5 нм; сила тока 4 мА [124].

Степень извлечения Cd (R) и сорбционную емкость микромицетов (Q) вычисляли по формулам (2), (3):

$$R = (1 - C/C_0) \times 100, \quad (2)$$

$$Q = (C_0 - C)V/W, \quad (3)$$

где R – степень извлечения Cd из среды, %; Q – сорбционная емкость микромицетов, мг/г; C – конечная концентрация Cd в среде, мг/л; C₀ – начальная концентрация Cd в среде, мг/л; V – объем жидкой среды (0,05 л); W – сухая биомасса, г [124].

2.2.6 Определение активности АЦК-дезаминазы

Для выявления АЦК-утилизирующих штаммов микромицетов использовали 3 варианта среды: с АЦК в качестве единственного источника азота, с NH₄NO₃ (положительный контроль), без добавления источника азота (отрицательный контроль). Чашки Петри с засеянными культурами инкубировали при 25 °С в течение 7 сут, после чего проводили визуальную оценку интенсивности роста исследуемых штаммов микромицетов. Штаммы, обладающие способностью расти на среде с АЦК и проявившие более интенсивный рост на данной среде по сравнению с положительным и отрицательным контролем, были отобраны для дальнейшего определения активности АЦК-дезаминазы.

АЦК-утилизирующие штаммы выращивали на среде с добавлением АЦК при 25 °С и 180 об/мин в течение 5 сут. После инкубации культуры центрифугировали 15 мин при 14000 ×g и 4 °С, отмывали 0,1М Tris-HCl буфером (pH 7,5), ресуспендировали осадок в 0,1М Tris-HCl буфере (pH 8,5). Гомогенизацию проводили на ультразвуковом дезинтеграторе UD -20 (3 чередующихся периода обработки ультразвуком в течение 60 с при 150 Вт) при 4 °С. Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 14000 ×g и 4 °С, супернатант использовали для определения активности фермента колориметрическим методом по образованию α-кетобутирата (α-КБ) [125]. В качестве субстрата использовали 0,5М АЦК, инкубировали 30 мин при 28 °С. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,56 М HCl и центрифугировали 5 мин при 14000 ×g. К 0,6 мл супернатанта добавляли 100 мкл 0,56 М HCl и 150 мкл 0,2% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 М HCl, инкубировали 30 мин при 28 °С. Реакционную смесь нейтрализовали 2М NaOH и измеряли оптическую плотность при 540 нм. Содержание белка определяли колориметрическим методом Бредфорда [126]. Активность фермента выражали как количество (в μМ) α-КБ, образовавшегося на 1 мг клеточного белка в течение часа.

2.2.7 Лабораторные вегетационные опыты

Приготовление инокулюма. Для приготовления инокулюма штаммы микромицетов (каждый штамм отдельно) выращивали в жидкой среде Сабуро в течение 7 дней при 180 об/мин и 25°C. По окончании инкубации в среду добавляли Твин-80, споры собирали в пробирку со стерильной водой. Споровую суспензию центрифугировали при 9000 ×g в течение 1 мин, после чего полученный осадок ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде. Концентрацию спор доводили до 10⁷ спор/мл.

Для проведения вегетационных опытов использовали семена ярового ячменя (*Hordeum vulgare* сорт Байшешек), которые предварительно стерилизовали путем их замачивания в 75% этиловом спирте в течение 5 мин, в 1% гипохлорите натрия в течение 10 мин с последующим тщательным промыванием в стерильной дистиллированной воде.

Опыт с фосфат-мобилизующими штаммами микромицетов. Сухую нестерильную почву (300 г) помещали в пластиковые сосуды размером 65×65×100 мм и увлажняли до 60% дистиллированной водой. Поверхностную стерилизацию семян ячменя помещали в сосуды (15 семян на сосуд, 5 сосудов на каждый вариант) и каждое семя инокулировали 1 мл споровой суспензии, содержащей 10⁷ спор/мл. Контрольные семена обрабатывали стерильной водой. Схема опыта включала шесть вариантов обработок: контроль, *P. bilaiae* Pb14, *P. bilaiae* C11, *P. rubens* EF5, *T. pinophilus* T14 и *Aspergillus* sp. D1. Сосуды располагали в соответствии с полностью рандомизированным дизайном для одного изменяемого параметра (тип обработки) с пятью повторами для каждого варианта. Все сосуды равномерно увлажняли каждые три дня. После инкубации в течение 14 дней растения собирали и определяли длину и сухую массу корней и стеблей. Концентрацию фосфора в побегах определяли колориметрическим методом с аскорбиновой кислотой и молибденовым синим [118].

Опыт с АЦК-утилизирующими штаммами и растениями, выращенными в условиях стресса. Сухую нестерильную почву (300 г) помещали в пластиковые сосуды размером 65×65×100 мм и увлажняли до 60% дистиллированной водой. Семена помещали в сосуды (15 семян на сосуд, 5 сосудов на каждый вариант) и каждое семя инокулировали 1 мл споровой суспензии, содержащей 10⁷ спор/мл. Контрольные семена обрабатывали стерильной водой.

Условия стресса для растений моделировали путем повышения инфекционного фона (внесение в почву суспензии фитопатогенного гриба *F. graminearum* с титром 10⁹ спор/мл), а также путем загрязнения почвы кадмием (внесение раствора хлорида кадмия в концентрации 25 мг Cd/кг почвы).

Схема опыта в условиях биотического стресса, вызванного повышенным инфекционным фоном, включала 6 вариантов: 1) стерильная почва без инокуляции, 2) почва с *F. graminearum* без инокуляции АЦК-утилизирующими штаммами микромицетов, 3) почва с *F. graminearum* + инокуляция *M. robertsii* An1, 4) почва с *F. graminearum* + инокуляция *B. bassiana* T15, 5) почва с *F. graminearum* + инокуляция *B. bassiana* T7, 6) почва с *F. graminearum* + инокуляция *T. pinophilus* T14.

Схема опыта в условиях загрязнения почвы кадмием включала 4 варианта: 1) почва без Cd без инокуляции, 2) почва с Cd без инокуляции, 3) почва с Cd + инокуляция *B. bassiana* T15, 4) почва с Cd + инокуляция *B. bassiana* T7.

Сосуды располагали в соответствии с полностью рандомизированным дизайном для одного изменяемого параметра (тип обработки) с пятью повторами для каждого варианта. Все сосуды равномерно увлажняли каждые три дня. После инкубации в течение 14 дней растения собирали и исследовали следующие параметры: ростовые характеристики (длину и массу корней и стеблей), биохимическую защитную реакцию (содержание пролина), активность фотосинтетической системы (содержание и соотношение пластидных пигментов).

Определение содержания фотосинтетических пигментов [127]. Навеску сырых листьев (0,5 г) гомогенизировали путем растирания в ступке со стерильным песком, экстрагировали в 5 мл 96% этанола, выдерживали в темноте в течение 1 ч, затем центрифугировали при 11000 ×g в течение 5 минут. Полученные вытяжки использовали для спектрофотометрического измерения поглощения при 649, 665 и 450 нм. Содержание хлорофилла и каротиноидов выражали в мг на г сырого веса, рассчитывая по следующим формулам (4) – (7):

$$\text{Хл } a = (13,7 \times \text{ОП}_{665} - 5,76 \times \text{ОП}_{649}) \times V / 1000 \times W, \quad (4)$$

$$\text{Хл } b = (25,8 \times \text{ОП}_{649} - 7,60 \times \text{ОП}_{665}) \times V / 1000 \times W, \quad (5)$$

$$\text{Хл } (a+b) = (6,10 \times \text{ОП}_{665} + 20,4 \times \text{ОП}_{649}) \times V / 1000 \times W, \quad (6)$$

$$\text{Каротиноиды} = (4,695 \times \text{ОП}_{450} - 0,268 \times \text{Хл } (a+b)) \times V / 1000 \times W, \quad (7)$$

где ОП - оптическая плотность; V – объем вытяжки пигментов, мл; W – навеска растительного материала, г [127].

Определение содержания пролина. Навеску сырых листьев (0,5 г) гомогенизировали, экстрагировали в 10 мл 3% сульфосалициловой кислоты и центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 минут. К полученной вытяжке добавляли ледяную уксусную кислоту и кислый нингидриновый реактив в равных объемах. Смесь выдерживали на водяной бане при 100 °C в течение 1 ч, после чего использовали для спектрофотометрического измерения при 520 нм [128].

Опыты с применением разработанных композиций микромицетов и их БАВ. В лабораторных вегетационных экспериментах использовали семена 7 сельскохозяйственных культур: соя (*Glycine max*), ячмень (*Hordeum vulgare*), люцерна (*Medicago sativa*), рапс (*Brassica napus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), донник (*Melilotus officinalis*), эспарцет (*Onobrychis viciifolia*). Поверхностную стерилизацию семян проводили как описано выше.

Способы применения композиций:

1) Прайминг семян. Предпосевную обработку семян осуществляли путем их замачивания в композиции, содержащей БАВ микромицетов. Длительность прайминга для всех семян составила 6 ч, за исключением семян сои, которые замачивали на 1 ч.

2) Инокуляция композиции, содержащей споры микромицетов. Сразу после посева семян в почву каждое семя инокулировали 1 мл споровой композиции.

3) Сочетание прайминга семян с инокуляцией в почву.

Для проведения эксперимента сосуды объемом 7 л заполняли сухой нестерильной почвой, после чего увлажняли до 60% дистиллированной водой. Семена помещали в сосуды (50 семян на сосуд, 5 сосудов на каждый вариант). Вегетационный опыт включал следующие варианты: 1) контроль (без микромицетов); 2) прайминг семян; 3) инокуляция композиции микромицетов в почву; 4) прайминг семян + инокуляция в почву. Сосуды располагали в соответствии с полностью рандомизированным дизайном. Все сосуды равномерно увлажняли каждые три дня и инкубировали в течение 30 дней.

На 3 сутки определяли энергию прорастания семян, на 7 сутки – всхожесть семян. Энергию прорастания и всхожесть вычисляли как количество проросших семян, выраженное в процентах к числу высеянных семян. После инкубации в течение 30 дней растения собирали и определяли длину и сухую массу корней и стеблей, оценивали состояние фотосинтетической системы путем определения содержания пигментов (каротиноиды, Хл *a*, Хл *b*, Хл (*a+b*) и соотношение Хл *a/b*).

2.2.8 Молекулярно-генетическая идентификация

Выделение ДНК. Штаммы микромицетов выращивали в жидкой среде Сабуро при 25 °С в течение 3 суток. Выделение и очистку ДНК проводили согласно протоколу [129]. Лизис клеток осуществляли ферментативным способом, используя 10 мМ Tris-HCl буфер (рН 8,0), лизоцим (10 мг/мл), 10% SDS и протеиназу К (20 мг/мл). Для удаления фрагментов клеточной стенки, остаточных белков и полисахаридов использовали 5М NaCl и 10% СТАВ в 0,7 М NaCl. Очистку ДНК проводили фенол/хлороформным методом. ДНК осаждали изопропанолом (0,6:1 по объему), центрифугировали при 12000 ×g в течение 10 минут. Осадок ДНК однократно отмывали 70% этиловым спиртом, с последующим центрифугированием и удалением жидкой фазы. Полученный осадок подсушивали на воздухе в течение 15 минут и ресуспендировали в 100 мкл Tris-HCl буфера. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США) при 260 нм и нормализовали до 30 нг/мкл.

Аmplификация фрагментов ДНК и секвенирование. Для проведения ПЦР использовали следующие праймеры: ITS1-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' и ITS4-5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3' [130]. Амплификацию проводили в общем объеме 30 мкл реакционной смеси, содержащей ПЦР-буфер (Fermentas, США), 25 мМ MgCl₂, 0,8 мМ смеси дНТФ, 1,0 Ед ДНК-полимеразы Taq (Fermentas, США), по 10,0 пмоль прямого и обратного праймера и 2 мкл ДНК.

ПЦР проводили с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) при следующих условиях: денатурация в течение 4 мин при 95 °С; 30 циклов: 25 с при 95°С, 30 с при 54 °С и 40 с при 72 °С; окончательная элонгация при 72 °С в течение 7 мин. Электрофорез проводили в 1% агарозном геле с ТАЕ-буфером при 100 В в течение 60 мин. Фрагменты ДНК визуализировали с использованием УФ транс-иллюминатора. Очистку полученных продуктов ПЦР проводили ферментативным методом с экзонуклеазой I (Fermentas, США) и щелочной фосфатазой (Fermentas, США). Секвенирование проводили на ДНК-анализаторе 3730xl (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя.

Все последовательности выравнивали с помощью парного выравнивания Clustal W и сравнивали с последовательностями типовых штаммов, доступных в базе данных GenBank, с помощью анализа BLAST. Филогенетические деревья строили методом Maximum Likelihood, используя программу Mega X [131]. Был проведен бутстреп-анализ с 1000 повторами для оценки поддержки кластеров.

2.2.9 Получение композиций на основе микромицетов и их метаболитов

Штаммы микромицетов (*Aspergillus* sp. D1, *B.bassiana* T7, *B.bassiana* T15, *M. robertsii* An1, *M. pulcherrima* MP2, *P. bilaiae* Pb14 и *T.pinophilus* T14) выращивали в жидкой среде Сабуро в течение 5 суток при 180 об/мин и 25 °С (каждый штамм отдельно). Готовили 2 варианта композиций:

1) Композиция, содержащая БАВ микромицетов. Для этого 5-суточные культуры мицелиальных грибов фильтровали через бумажный фильтр. Культуру дрожжевого штамма *M. pulcherrima* MP2 центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 мин. Фильтраты каждого штамма и супернатант дрожжевого штамма смешивали в равных количествах.

2) Композиция, содержащая споры микромицетов. Для этого по окончании инкубации в жидкие культуры мицелиальных грибов добавляли Твин-80, споры собирали в пробирку со стерильной водой. Споровую суспензию центрифугировали при 9000 ×g в течение 1 мин, после чего полученный осадок ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде. Концентрацию спор доводили до 10⁷ спор/мл. Культуру дрожжевого штамма *M. pulcherrima* MP2 центрифугировали при 11000 ×g в течение 15 мин. Для приготовления композиции споровые суспензии мицелиальных грибов смешивали в равных количествах и добавляли супернатант штамма *M. pulcherrima* MP2.

2.2.10 Статистическая обработка данных

Перед анализом однородность дисперсий и нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Левена и критерия Шапиро-Уилка, соответственно. Когда нормальность дисперсии не была подтверждена, данные были логарифмически преобразованы. Анализ данных проводили с использованием одно- и двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением теста Тьюки для множественного сравнения (Tukey's HSD test). Для исследования взаимосвязи показателей применяли

коэффициент корреляции Пирсона (r-Пирсона). Статистическая обработка данных была выполнена с использованием лицензированного пакета программы Statistica версия 10.0 (TIBCO Software Inc., США). Все данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика микромицетных сообщества агроценозов

Одной из главных структурных и функциональных составляющих агроценозов являются сообщества микромицетов. Мицелиальные грибы и дрожжи являются продуцентами широкого спектра БАВ, в качестве редуцентов функционируют как посредники между биокосным и косным веществом биосферы, играют важнейшую роль в формировании физико-химических свойств почвы, оказывают воздействие как на агрокультуры, так и на другие организмы [7, с. 1-2; 8, с. 10-12; 13, с. 7-8]. Это обуславливает значительное влияние почвенных и эндофитных микромицетов на продуктивность и устойчивость агроценозов. В связи с этим исследования по определению численности и таксономической структуры сообществ микромицетов являются важным этапом в разработке стратегии по применению микромицетов для рационализации растениеводства, оптимизации способов возделывания и методов защиты агрокультур. .

3.1.1 Количественный состав и таксономическая структура микромицетных сообществ в почвах агроценозов

Распространение мицелиальных грибов и дрожжей в почве подчиняется определенной закономерности в пределах почвенно-географических зон. На численный и таксономический состав микромицетов значительное влияние оказывает характер растительного покрова, тип почвы, ее культурное состояние, климатические условия и другие факторы [13, с.27; 18, с. 106-121; 19, с. 2-3; 20, с. 3].

В ходе изучения количественного состава почвенной микобиоты агроценозов 7 агрокультур выявлено, что численность мицелиальных грибов колебалась в диапазоне от $(3,2 \pm 0,1) \times 10^3$ до $(6,4 \pm 0,3) \times 10^5$ КОЕ/г почвы. Содержание дрожжей в исследуемых почвенных образцах было на 1-3 порядка ниже по сравнению с грибами и варьировало в пределах от $73,4 \pm 2,5$ до $(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$ КОЕ/г почвы (таблица 3). В проведенных исследованиях был выявлен ряд особенностей и закономерностей распределения микромицетов под посевами сельскохозяйственных культур [132, с. 127].

На численность и разнообразие микобиоты значительное влияние оказывает степень окультуренности почвы и способ ее обработки. Это обуславливается тем, что применение различных агротехнических приемов влияет на почвенное плодородие, физическую структуру, влажность, воздушный и тепловой режим почвы [19, с. 2-3; 20, с. 3]. В проведенных исследованиях были выявлены различия в количественном содержании микромицетов в окультуренных и целинных почвах, выражающиеся в менее активном развитии микромицетов в почвах под посевами агрокультур (таблица 3). В почвенных образцах агроценозов отмечено меньшее содержание микромицетов по сравнению с целинной почвой. Так, например, количество дрожжевых организмов в целинных почвах было в пределах от $(5,5 \pm 0,2) \times 10^3$ до $(9,3 \pm 0,4) \times 10^4$ КОЕ/г почвы, в то время как практически во всех почвенных образцах агроценозов их

численность была на порядок ниже (таблица 3). Аналогичные результаты получены и при учете мицелиальных грибов, количество которых было ниже в окультуренных почвах по сравнению с целинными (таблица 3). Таким образом, окультуривание почвы, являющееся одним из способов антропогенного воздействия и включающего в себя распашку, полив, внесение удобрений и другие агротехнические приемы, вызывает определенные изменения в количественном составе комплексов микромицетов [132, с. 27].

Таблица 3 – Численность микромицетов в почвенных образцах (КОЕ/г почвы)

Варианты почвенных образцов	Мицелиальные грибы			Дрожжи		
	Глубина отбора почвенной пробы, см			Глубина отбора почвенной пробы, см		
	0-10	10-20	20-30	0-10	10-20	20-30
Целинная почва	(3,1±0,1) ×10 ⁶	(2,5±0,1) ×10 ⁶	(2,2±0,1) ×10 ⁴	(9,3±0,4) ×10 ⁴	(7,1±0,3) ×10 ⁴	(5,5±0,2) ×10 ³
Соя (<i>Glycine max</i>)	(6,1±0,3) ×10 ⁵	(5,7±0,2) ×10 ⁵	(5,0±0,2) ×10 ⁴	(1,9±0,05) ×10 ³	(1,3±0,03) ×10 ³	(1,2±0,05) ×10 ²
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>)	(4,8±0,1) ×10 ⁵	(4,1±0,1) ×10 ⁴	(3,4±0,1) ×10 ³	(3,3±0,04) ×10 ³	(1,0±0,04) ×10 ³	(8,2±0,4) ×10 ²
Люцерна (<i>Medicago sativa</i>)	(6,4±0,3) ×10 ⁵	(5,5±0,2) ×10 ⁴	(5,0±0,2) ×10 ³	(2,1±0,1) ×10 ³	(1,5±0,1) ×10 ³	(1,2±0,04) ×10 ²
Рапс (<i>Brassica napus</i>)	(4,4±0,1) ×10 ⁴	(3,9±0,1) ×10 ⁴	(3,2±0,1) ×10 ³	(1,2±0,02) ×10 ³	(9,8±0,4) ×10 ²	73,4±2,5
Сафлор (<i>Carthamus tinctorius</i>)	(5,2±0,2) ×10 ⁵	(4,7±0,1) ×10 ⁵	(4,2±0,1) ×10 ⁴	(1,8±0,1) ×10 ⁴	(1,5±0,03) ×10 ³	(1,1±0,04) ×10 ²
Донник (<i>Melilotus officinalis</i>)	(5,1±0,1) ×10 ⁵	(4,8±0,2) ×10 ⁵	(4,3±0,1) ×10 ⁴	(1,1±0,04) ×10 ⁴	(8,3±0,4) ×10 ³	(6,4±0,2) ×10 ²
Эспарцет (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	(6,0±0,2) ×10 ⁴	(5,4±0,1) ×10 ⁴	(4,9±0,3) ×10 ³	(2,4±0,1) ×10 ³	(1,1±0,05) ×10 ³	88,9±4,4

Показано, что в исследуемых образцах численность микромицетов плавно снижалась по профилю почвы в направлении от поверхностных слоев к более глубоким, и в пределах каждого горизонта определялась числами одного порядка практически для всех вариантов (таблица 3). Наибольшее количество мицелиальных грибов и дрожжей обнаруживалось в поверхностном слое толщиной 0-10 см. Это объясняется тем, что в данном слое имеются более благоприятные условия влажности и аэрации, протекают основные биохимические процессы превращения органического вещества, необходимого для жизнедеятельности разнообразных микроорганизмов. В слое толщиной 10-20 см отмечено снижение количества микромицетов. Для горизонта 20-30 см характерно значительное уменьшение числа грибов и дрожжевых организмов, что связано с обеднением нижерасположенных слоев почвы органическим веществом, а также уплотнением почвы и ухудшением аэрации. Так, например, количество дрожжевых организмов, выявленных в поверхностном слое почвы толщиной 0-10 см агроценоза донника, составило (1,1±0,04)×10⁴ КОЕ/г; с увеличением глубины их численность убывала и составила лишь (6,4±0,2)×10² КОЕ/г в почвенном образце, отобранном на глубине 20-30 см (таблица 3) [132, с. 27-28]. Таким образом, на основании проведенных

исследований установлено преобладание микромицетов в толще почвы верхних слоев и убывание их количества по мере углубления в почву, что согласуется с результатами исследований, проведенными другими авторами [27-30].

Было показано, что тип растительности оказывал определенное влияние на количество микромицетов. Численность мицелиальных грибов колебалась в пределах от $(3,2 \pm 0,1) \times 10^3$ до $(6,4 \pm 0,3) \times 10^5$ КОЕ/г почвы в зависимости от глубины отбора почвенной пробы. Минимальное число грибов было характерно для почв под посевами рапса и эспарцета. При сравнительном анализе количественного состава дрожжей в целинных почвах и почвах агроценозов было выявлено, что численность дрожжей была ниже в окультуренных почвах и варьировала в пределах от $73,4 \pm 2,5$ до $(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$ КОЕ/г почвы (таблица 3). Наименьшей заселенностью дрожжами характеризовались почвы агороценозов рапса и эспарцета [132, с. 28]. Различия в количественном составе микромицетов в зависимости от вида растения могут быть обусловлены специфическим составом корневых экссудатов. Известно, что в корневых экссудатах растений содержится значительное количество БАВ, которые служат источниками питания для почвенной микрофлоры. Кроме того, в их составе имеются соединения, действующие как аттрактанты для определенных групп микроорганизмов. Также корневые выделения содержат сигнальные молекулы, известные как «факторы, индуцирующие ветвление», которые индуцируют интенсивное ветвление гиф в прорастающих спорах мицелиальных грибов [19, с. 8; 22, с. 244]. Таким образом, экссудаты растений выполняют важную роль в формировании таксономической структуры почвенных микромицетных сообществ.

Еще одной характерной особенностью распространения микромицетов являлось преобладание грибов и значительно меньшее (на 1-3 порядка) содержание дрожжевых организмов во всех исследуемых вариантах (таблица 3). Вероятно это обусловлено тем, что дрожжи в большей степени приспособлены к обитанию в жидких и мелкодисперсных средах, в то время как мицелиальные грибы преимущественно размножаются на плотных поверхностях. Кроме того, для дрожжей наиболее благоприятной средой обитания являются субстраты с высоким содержанием свободных сахаров, где популяция дрожжей может занимать доминирующее положение: сочные плоды, цветки энтомофильных растений, сокотечения деревьев, кишечный тракт беспозвоночных. Поэтому в почвах численность дрожжей, как правило, значительно ниже по сравнению с другими группами микроорганизмов [15, с. 92; 16, с. 372-373; 17, с.1].

Приуроченность почв к определенному типу растительности, физико-химические характеристики почв, различия в степени окультуренности, обусловили определенные различия в структуре комплексов микромицетов (рисунок 5).

Мицелиальные грибы, изолированные из исследованных почв, по ряду морфологических и культуральных признаков были отнесены к 2 отделам: *Zygomycota* (представлен двумя родами - *Mortierella* и *Mucor*) и *Ascomycota* (выявлено 8 родов - *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Metarhizium* и *Cladosporium*). Структура сообществ дрожжей и

дрожжеподобных грибов была представлена следующими родами *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Lipomyces*, *Candida*, *Saccharomyces* и *Cryptococcus*. Среди которых, только роды *Rhodotorula* и *Cryptococcus* принадлежат к базидиомицетовому аффинитету, а все остальные являются аскомицетовыми дрожжами [133, с. 95].

Комплексы микромицетов в почвенных образцах оценивали по относительному обилию представителей различных родов и пространственной частоте встречаемости.

На рисунке 5 представлены данные об относительном обилии родов в структуре почвенных микромицетных сообществ под посевами различных агрокультур и в целинной почве.

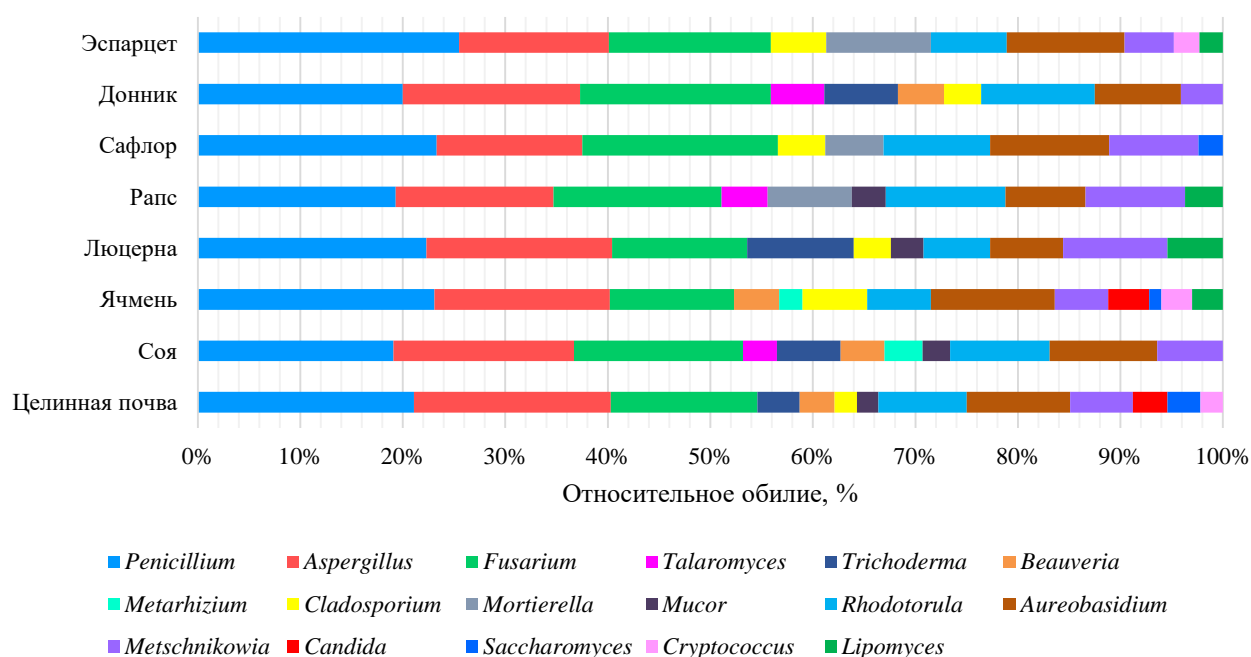


Рисунок 5 – Таксономическая структура микромицетных сообществ (на уровне рода) в почвах агроценозов

В составе комплекса микромицетов целинной почвы были выявлены представители 7 родов мицелиальных грибов и 6 родов дрожжевых организмов (рисунок 5). Состав микромицетов в целинной почве характеризовался высоким содержанием таких родов мицелиальных грибов, как: *Penicillium* (21,1%), *Aspergillus* (19,2%) и *Fusarium* (14,3%). Среди дрожжей наибольшую долю занимали представители родов *Aureobasidium* (10,1%) и *Rhodotorula* (8,6%) [133, с. 95]. Это эвритоппные роды микромицетов, имеющие широкий ареал распространения.

Анализ проведенных исследований свидетельствовал о том, что почвы под посевами агрокультур по сравнению с целинными почвами характеризовались меньшим родовым разнообразием. Основными компонентами сообществ микроскопических грибов в почвах агроценозов являлись различные виды родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*. На долю каждого из данных родов в

структуре микромицетных сообществ приходилось от 12,1 до 25,5%. В значительно меньшем количестве встречались мицелиальные грибы родов *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cladosporium*, *Mortierella* и *Mucor* (рисунок 5) [133, с. 95]. Различия в таксономической структуре микромицетных сообществ исследуемых почв возможно обусловлено агротехническими приемами, ведущими к изменению физико-химических характеристик почв, а также специфическим составом корневых экссудатов агрокультур [19, с. 2-3; 20, с. 3]. Так известно, что корневые выделения кормовых и овощных культур богаты сахарами. Злаковые культуры выделяют много органических кислот, таких как щавелевая, уксусная, яблочная и лимонная, что приводит к подкислению почвы. В корневых экссудатах бобовых растений содержится большое количество нейтральных аминокислот, вследствие чего почва становится менее кислой [18, с. 133].

Наибольшую долю в структуре комплексов микромицетов почв агроценозов занимали различные виды рода *Penicillium* (19,1-25,5%). Наиболее обильно данные грибы были представлены в почвах под посевами эспарцета (рисунок 5) [133, с. 95]. Известно, что мицелиальные грибы рода *Penicillium* благодаря богатому ферментному аппарату способны существовать в самых разнообразных условиях [35, с. 343-344; 36, с. 303-304].

Существенным компонентом микромицетных сообществ являлись грибы рода *Aspergillus*, содержание которых составляло от 14,2 до 18,1% (рисунок 5) [133, с. 95]. Возможно, такое высокое содержание и встречаемость во всех исследуемых почвах связано с природно-климатическими условиями, поскольку представители рода *Aspergillus* многими исследователями описаны как ксерофильные и термофильные грибы [37, с. 23].

Отмечено обилие грибов рода *Fusarium* (12,1–19,1%) во всех анализируемых почвенных образцах (рисунок 5) [133, с. 95]. В почве грибы рода *Fusarium* имеют широкое распространение, способны существовать в активной форме и быстро размножаться. Тесная связь грибов рода *Fusarium* с травянистой растительностью отмечена рядом авторов. Данные грибы в значительном количестве выявляются в почвах, покрытых травянистой растительностью, и весьма бедно представлены в лесных почвах [18, с. 118; 40, с. 8-11].

Довольно неравномерно были распределены в исследуемых почвах грибы рода *Trichoderma*, на долю которых приходилось от 4,1 до 10,4%. Представители данного рода были изолированы из почвенных образцов целинных земель, а также агроценозов сои, люцерны и донника (рисунок 5) [133, с. 96]. Некоторые исследователи объясняют способность грибов рода *Trichoderma* существовать в самых разнообразных почвах тем, что они обладают высокой антагонистической и антибиотической активностью и, вступая в пространственную конкуренцию с другими микроорганизмами, занимают определенную экологическую нишу [38; 39, с. 100].

Во всех исследуемых целинных и окультуренных почвах за исключением агроценозов сои и рапса были обнаружены грибы с темноцветным мицелием – *Cladosporium*. Относительное обилие грибов данного рода варьировало в диапазоне от 2,2 до 6,3% в зависимости от исследуемого почвенного образца

(рисунок 5) [133, с. 97]. Наличие пигмента определяет защитные свойства темноокрашенных грибов от облучения и дает им возможность существовать в большом географическом диапазоне, в особенности в горных и пустынных регионах, для которых характерно высокое УФ-излучение [41, с. 1-2; 42].

Среди дрожжей в почвах агроценозов преобладали представители родов *Aureobasidium* (7,1-12,1%), *Rhodotorula* (6,2-11,7%) и *Metschnikowia* (4,1-10,2%). Доля дрожжей родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* и *Lipomyces* была значительно меньше и составила от 1,2 до 5,4% (рисунок 5). По-видимому, существование этих дрожжей в почве связано с их способностью выдерживать лимитирующие условия, в первую очередь периодическое иссушение и высокую солнечную инсоляцию [133, с. 97].

Характерной особенностью являлось выявление представителей родов *Talaromyces*, *Metarhizium*, *Mortierella* и *Lipomyces* в почвенных образцах агроценозов, в то время как в целинной почве данные роды не были обнаружены.

В проведенных исследованиях дрожжи рода *Lipomyces* были обнаружены в почвах агроценозов ячменя, люцерны, рапса и эспарцета, где их количество не превышало 5,4% (рисунок 5) [133, с. 97]. Данные дрожжи наиболее приспособлены к обитанию на твердых поверхностях почвенных частиц. Они обладают слизистыми капсулами, которые создают межклеточную среду, сохраняющую благоприятный режим влагообмена и питания в условиях временного иссушения почвы. *Lipomyces* являются автохтонными почвенными дрожжами, адаптированными к существованию в минеральной части почв и не встречающиеся в других субстратах [15, с. 92; 16, с. 372-373; 17, с. 1].

Распределение видов и родов микромицетов в комплексе с учетом их встречаемости характеризует структуру комплекса. Анализ пространственной частоты встречаемости позволил выявить доминирующие (> 60%), частые (30-60%) и редкие (< 30%) роды в микромицетных сообществах почв агроценозов. Из данных таблицы 4 видно, что в структуре грибных сообществ всех исследуемых почв с высокими значениями пространственной частоты встречаемости (от 67 до 100%) доминировали мицелиальные грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*. В достаточной мере почвы богаты грибами рода *Trichoderma*, частота встречаемости которого составляла от 40 до 47%, данный род отнесен к частым. Представители родов *Talaromyces*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cladosporium*, *Mortierella* и *Mucor* являлись редкими, частота встречаемости не превышала 27% [133, с. 97-98].

Доминирующее положение среди дрожжей в целинной почве и почвах агроценозов занимали различные виды родов *Rhodotorula* и *Aureobasidium*, частота встречаемости которых составляла от 73 до 93% в зависимости от исследуемого образца. Аскомицетовые дрожжи рода *Metschnikowia* так же являлись доминантными в целинной почве и во всех почвах агроценозов, за исключением почвы под посевами эспарцета, где частота встречаемости данного рода была 53%, соответственно данный род является частым для данного агроценоза. Дрожжи рода *Lipomyces*, частота встречаемости которых варьировала в диапазоне от 33 до 47%, отнесены к частым родам. Редкие роды

дрожжевых организмов представлены различными видами *Cryptococcus*, *Candida* и *Saccharomyces* (таблица 4) [133, с. 98].

Таблица 4 – Пространственная частота встречаемости (%) микромицетов в исследуемых почвенных образцах

Род микромицетов	Целинная почва	Почвы агроценозов						
		Соя	Ячмень	Люцерна	Рапс	Сафлор	Донник	Эспарцет
Мицелиальные грибы								
<i>Penicillium</i>	100	87	93	80	93	87	93	93
<i>Aspergillus</i>	93	80	93	87	73	73	67	87
<i>Fusarium</i>	100	93	73	93	87	87	67	80
<i>Talaromyces</i>	-	24	-	-	27	-	20	-
<i>Trichoderma</i>	47	40	-	53	-	-	47	-
<i>Beauveria</i>	27	24	20	-	-	-	20	-
<i>Metarhizium</i>	-	20	13	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i>	20	-	13	6	-	13	13	6
<i>Mortierella</i>	-	-	-	-	13	20	-	24
<i>Mucor</i>	27	24	-	24	20	-	-	-
Дрожжи								
<i>Rhodotorula</i>	93	93	87	93	80	73	73	87
<i>Aureobasidium</i>	80	87	80	73	80	80	87	93
<i>Metschnikowia</i>	80	73	73	67	80	87	60	53
<i>Cryptococcus</i>	27	-	-	-	-	-	-	20
<i>Candida</i>	13	-	13	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	20	-	13	-	-	20	-	-
<i>Lipomyces</i>	-	-	47	47	40	-	-	33

Таким образом, при изучении количественного состава и таксономической структуры почвенных микромицетных сообществ агроценозов выявлен ряд особенностей и закономерностей их распространения:

- выявлена более высокая численность и таксономическое разнообразие микромицетов в целинных почвах по сравнению с окультуренными;
- показано обилие мицелиальных грибов и меньшее содержание дрожжей во всех исследуемых вариантах;
- установлено преобладание микромицетов в толще почвы верхних слоев (0-10 см) и убывание их количества по мере углубления в почву;
- основными компонентами сообществ мицелиальных грибов являлись различные виды родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*, среди дрожжей как по относительному обилию, так и по частоте встречаемости преобладали представители родов *Aureobasidium*, *Rhodotorula* и *Metschnikowia*.
- наибольшее родовое разнообразие наблюдалось в целинной почве и почве под посевами ячменя.

3.1.2 Количественный состав и таксономическая структура эндофитных комплексов микромицетов

В настоящее время состав эндофитных микромицетных сообществ достаточно хорошо изучен лишь у некоторых видов сельскохозяйственных

растений: люцерна [134; 135], соя [136; 137], ячмень [51], рапс [138; 139]. Однако, наибольшее внимание в данных исследованиях уделяется мицелиальным грибам, в то время как дрожжи остаются мало изученной группой эндофитной микрофлоры. Также мало исследований, касающихся особенностей их распространения в зависимости от органа растения. Кроме того, отсутствуют сведения о таксономической структуре эндофитных микромицетов сафлора, донника и эспарцета. Всё это подчеркивает высокую значимость и обуславливает новизну проводимых исследований.

Из различных вегетативных органов исследуемых сельскохозяйственных культур было выделено 320 изолятов культивируемых форм микромицетов с преобладанием мицелиальных грибов (249 штаммов). Уровень колонизации грибами варьировал в широком диапазоне от 6 до 40 %. Данный показатель для дрожжей был значительно ниже (от 2 до 12%). Коэффициент выделения грибных штаммов был в пределах от 0,08 до 0,54, дрожжевых – от 0,02 до 0,2 (таблица 5).

На количественный состав и таксономическую структуру эндофитов в значительной степени влияют такие факторы, как вид, физиологическое состояние и стадия развития растения-хозяина, тип тканей и органов растения, условия окружающей среды [43, с. 5; 48, с. 1108-1110; 54, с. 2-3].

Наибольшая колонизация эндофитной микрофлорой была характерна для эспарцета, сои и люцерны, наименьшая – для донника (таблица 5). Это может быть обусловлено специфичным для каждого вида растения составом питательных ресурсов, необходимых для развития эндофитных микроорганизмов.

Выявлено, что количество изолятов в подземной части растений значительно выше, чем в надземной [140, с. 3]. Распределение микромицетов в органах растений можно выразить следующей последовательностью: корни (182 изолята) > стебли (78) > листья (60). Следует отметить, что данная особенность характерна как для мицелиальных грибов, так и для дрожжей (таблица 5). Аналогичные результаты были получены рядом авторов при исследовании эндофитных грибов травянистых растений [50-53]. Такие особенности в распространении эндофитных микромицетов в различных органах растений могут быть обусловлены несколькими причинами. Основным источником легкодоступного субстрата являются корни и их экссудаты, поэтому корневую систему можно рассматривать как относительно стабильную среду обитания, подходящую для многих видов грибов. Кроме того, такие неблагоприятные факторы, как высушивание, УФ-излучение и недостаток питательных веществ, влияют в первую очередь на надземные органы растений, что может быть причиной менее частого заселения листьев и стеблей по сравнению с корнями [49, с. 668-670; 52, с. 959]. Другая причина заключается в том, что количество грибов, находящихся в воздухе, значительно ниже по сравнению с почвенными, что возможно обуславливает меньшую колонизацию надземных органов [52, с. 959].

Таблица 5 – Распространение эндофитных микромицетов в различных органах сельскохозяйственных культур

Агрокультура	Мицелиальные грибы			Дрожжи		
	Количество изолятов	Уровень колонизации, %	Коэффициент выделения	Количество изолятов	Уровень колонизации, %	Коэффициент выделения
Соя						
корень	23	40	0,46	10	12	0,2
стебель	11	16	0,22	5	8	0,1
листья	8	10	0,16	4	6	0,08
Ячмень						
корень	19	24	0,38	7	8	0,14
стебель	7	10	0,14	3	4	0,06
листья	6	6	0,12	1	2	0,02
Люцерна						
корень	21	36	0,42	7	10	0,14
стебель	10	16	0,2	4	6	0,08
листья	5	6	0,1	1	2	0,02
Рапс						
корень	20	30	0,4	3	4	0,06
стебель	5	8	0,1	1	2	0,02
листья	7	12	0,14	1	2	0,02
Сафлор						
корень	17	28	0,34	4	6	0,08
стебель	8	10	0,16	2	4	0,04
листья	8	14	0,16	2	4	0,04
Донник						
корень	13	12	0,26	4	6	0,08
стебель	6	8	0,12	1	2	0,02
листья	4	6	0,08	1	2	0,02
Эспарцет						
корень	27	38	0,54	7	12	0,14
стебель	14	14	0,28	1	2	0,02
листья	10	16	0,2	2	4	0,04

Таксономический состав эндофитных комплексов микромицетов исследуемых агрокультур был представлен 7 родами мицелиальных грибов (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Metarhizium* и *Cladosporium*) и 4 родами дрожжей и дрожжеподобных грибов (*Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Metschnikowia* и *Cryptococcus*) (рисунок 6).

Известно, что растения обладают индивидуальным уникальным микробиомом вследствие избирательного допуска в свою эндосферу определенных микроорганизмов [43, с. 5; 48, с. 1108-1110; 54, с. 2-3]. В настоящей работе показано, что представители родов *Penicillium*, *Fusarium* и *Rhodotorula* встречались во всех исследуемых растениях. Различные виды грибов рода *Aspergillus* были изолированы из всех агрокультур за исключением люцерны, эндофитные дрожжи рода *Metschnikowia* не обнаружены лишь в сафлоре. Наиболее редко выявлялись представители родов *Metarhizium* и *Cryptococcus* (рисунок 6).

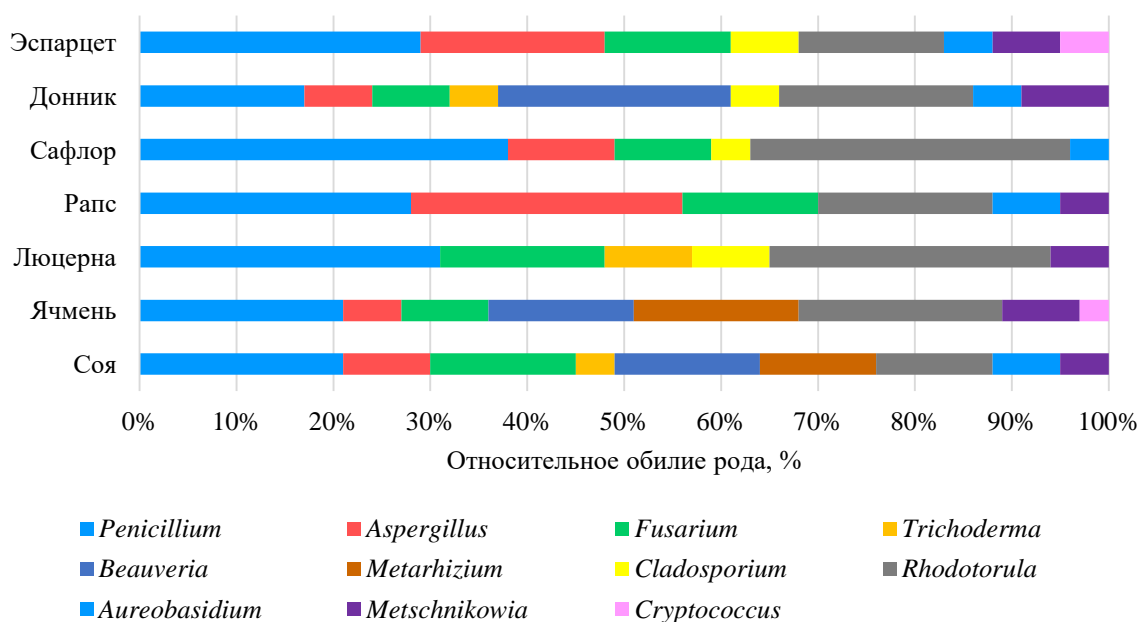


Рисунок 6 – Таксономическая структура эндофитных микромицетных сообществ (на уровне рода)

Наибольшее таксономическое разнообразие было характерно для растений сои и донника. Ячмень и эспарцет так же характеризовались значительным разнообразием. В данных растениях количество родов достигало 8-9, в то время как в остальных растениях число выявленных родов было ниже и не превышало 6 (рисунок 6).

Основным компонентом микромицетных сообществ являлись грибы рода *Penicillium*, содержание которых варьировало в диапазоне от 17 до 38% в зависимости от вида растения. Отмечено обилие грибов *Aspergillus* и *Fusarium*, на долю которых приходилось от 6 до 28% и от 8 до 17%, соответственно. Наибольшую долю среди дрожжей занимали различные виды рода *Rhodotorula* (12-33%). Представители родов *Trichoderma*, *Cladosporium* и *Cryptococcus* занимали наименьшую долю в структуре эндофитных микромицетных сообществ, показатель их относительного обилия не превышал 9% (рисунок 6).

Таким образом, при изучении количественного состава и таксономической структуры эндофитных микромицетных сообществ агроценозов выявлен ряд особенностей и закономерностей их распространения:

- выявлено неравномерное распределение микромицетов в органах растений, которое можно выразить следующей последовательностью: корни > стебли > листья;
- наибольшая колонизация эндофитами была характерна для эспарцета, сои и люцерны, наименьшая – для донника;
- в структуре эндофитных микромицетных сообществ наибольшую долю среди мицелиальных грибов занимали представители родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*, среди дрожжей - виды рода *Rhodotorula*.

3.2 Исследование механизмов стимулирования роста агрокультур штаммами микромицетов

3.2.1 Скрининг перспективных штаммов с агрономически ценными свойствами

Для применения микроорганизмов как для улучшения роста растений, так и для их защиты от неблагоприятных факторов важным этапом является поиск штаммов, обладающих комплексом положительных свойств и выяснение механизмов их положительного действия на растения. Для решения указанной задачи на данной стадии работы был проведен скрининг штаммов, обладающих агрономически ценными свойствами.

Из различных органов исследуемых агрокультур (корень, стебель, листья) и почв под посевами данных растений было выделено 848 штаммов микромицетов (653 штамма мицелиальных грибов и 195 дрожжей). Среди них 528 штаммов изолировано из почвенных образцов агроценозов и 320 являлись эндофитами (таблица 6) [121].

Таблица 6 – Штаммы микромицетов, изолированные из сельскохозяйственных культур и почв агроценозов

Агрокультура	Штаммы, изолированные из почвы		Штаммы, изолированные из растений (эндофиты)					
	Мицелиальные грибы	Дрожжи	Мицелиальные грибы			Дрожжи		
			корень	стебель	листья	корень	стебель	листья
Соя	61	24	23	11	8	10	5	4
Ячмень	71	18	19	7	6	7	3	1
Люцерна	42	16	21	10	5	7	4	1
Рапс	45	15	20	5	7	3	1	1
Сафлор	50	13	17	8	8	4	2	2
Донник	55	15	13	6	4	4	1	1
Эспарцет	80	23	27	14	10	7	1	2
Всего	404	124	140	61	48	42	17	12

Известно, что микромицеты обеспечивают ряд положительных эффектов на растения путем вовлечения следующих основных механизмов: синтез фитогормонов и сигнальных молекул, повышение доступности элементов питания, защита растений от абиотических стрессовых факторов, биоконтроль фитопатогенов, влияние на почвенное плодородие, индукция системной устойчивости [2, с. 763-764; 5, с. 3-4; 43, с. 5-6; 57, с. 5-6].

Одним из важнейших свойств микроорганизмов, стимулирующих рост и развитие растений является продуцирование ими фитогормонов таких, как: ауксины, гиббереллины и цитокинины [65, с. 1289; 66, с. 133]. Многие микроорганизмы выделяют ауксины в ризосферную зону растений, способствуя увеличению площади поверхности корня и количества корневых волосков, а

также индуцируя рост растений путем растяжения клеток [65, с. 1289-1290; 66, с. 133]. Результаты исследований по определению ауксин-синтезирующей способности у 848 штаммов микромицетов в качественной реакции Сальковского с разделением по интенсивности окрашивания культуральной жидкости продемонстрировали неоднородность распределения этого признака среди исследуемых культур. Наибольшее количество ауксин-положительных штаммов обнаружено среди дрожжевых изолятов (39,5% от общего числа дрожжевых культур). Мицелиальные грибы в значительно меньшей степени проявили способность продуцировать данный фитогормон (6,7% от общего числа грибных штаммов) [141, с. 43]. Соответствующие данные представлены на рисунке 7.

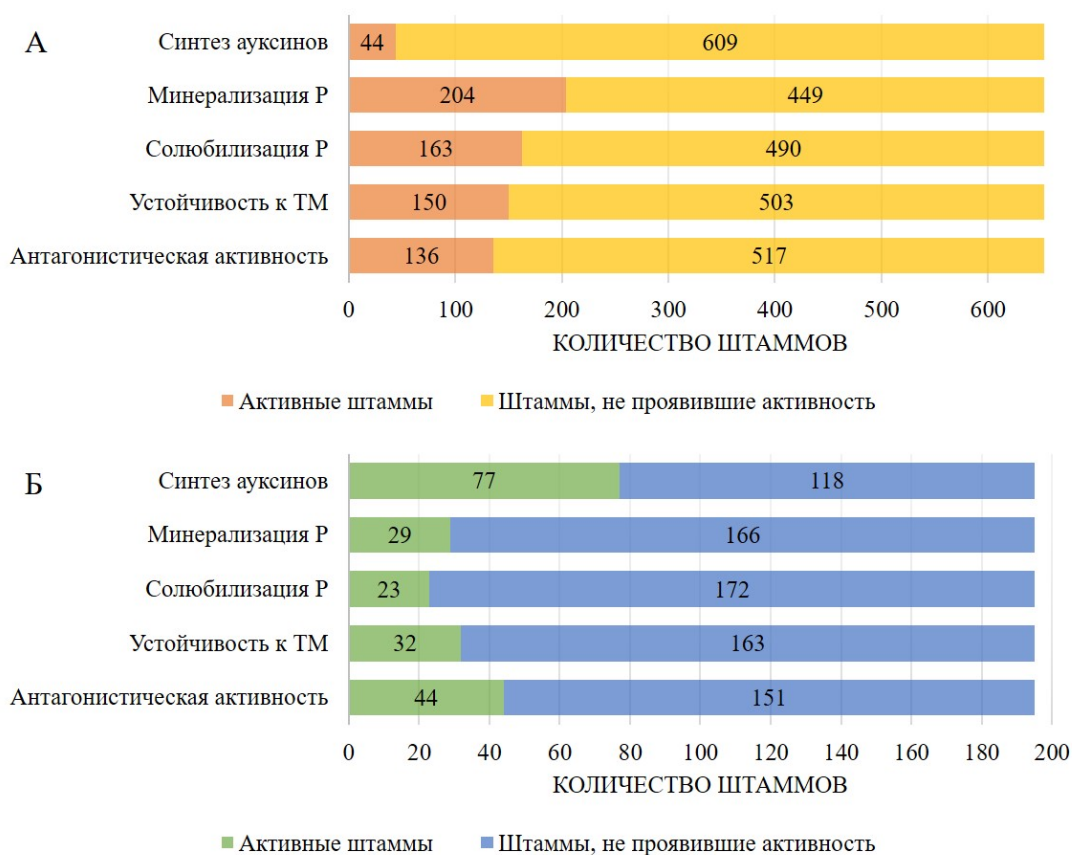


Рисунок 7 – Количество штаммов мицелиальных грибов (А) и дрожжей (Б) с агрономически ценными свойствами

Микроорганизмы могут стимулировать рост и развитие растений за счет повышения доступности элементов питания [2, с. 763-764; 5, с. 3-4; 43, с. 5-6; 57, с. 5-6]. Поскольку биодоступность содержащегося в почве фосфора весьма ограничена ввиду нахождения его в труднорастворимых формах, для улучшения фосфорного питания растений применяются микроорганизмы, способные мобилизовать и переводить нерастворимые соединения фосфора почвы в доступную для растений форму [58, с. 2]. При росте культур микромицетов на плотной питательной среде Пиковской, содержащей труднорастворимые

источники Р (Са-фосфат и Са-фитат), наблюдалось формирование зон просветления вокруг колоний на изначально мутной среде, что свидетельствовало о наличии Р-мобилизующей активности у штаммов. Из 653 исследованных грибных изолятов данная активность была характерна для 25 % штаммов в отношении Са-фосфата и 31% в отношении Са-фитата. Дрожжи в меньшей степени продемонстрировали способность к мобилизации труднорастворимых фосфатов [121, с. 9] (рисунок 7, таблица 7).

Таблица 7 – Количество штаммов, способных к мобилизации фосфора, в зависимости от источника выделения и типа соединения фосфора

Группа микромицетов	Количество исследуемых штаммов	Штаммы, солюбилизирующие Са-фосфат	Штаммы, минерализующие Са-фитат	Штаммы, мобилизующие как Са-фосфат, так и Са-фитат
Штаммы, изолированные из почвы				
Мицелиальные грибы	404	119 (29%)	138 (34%)	76 (19%)
Дрожжи	124	15 (12%)	18 (15%)	10 (8%)
Всего	528	134 (25%)	156 (30%)	86 (16%)
Штаммы, изолированные из растений (эндофиты)				
Мицелиальные грибы	249	44 (18%)	66 (27%)	25 (10%)
Дрожжи	71	8 (11%)	11 (15%)	4 (6%)
Всего	320	52 (16%)	77 (24%)	29 (9%)
Общее количество штаммов				
Мицелиальные грибы	653	163 (25%)	204 (31%)	101 (15%)
Дрожжи	195	23 (12%)	29 (15%)	14 (7%)
Всего	848	186 (22%)	233 (27%)	115 (14%)
Примечание – В скобках указан процент от общего количества штаммов каждой группы				

Выявлено, что количество микромицетов, обладающих способностью мобилизовать органический Р, было выше числа штаммов, мобилизующих неорганические соединения Р. Данная особенность была характерна как для почвенных, так и для эндофитных культур микромицетов [121, с. 11] (таблица 7). Возможно, это обусловлено тем, что органический Р, содержащий источники как углерода, так и Р, является более доступным и богатым питательным соединением. Аналогично полученным данным, в ранее проведенных исследованиях показано, что грибы более эффективны при Са-фитатной минерализации [142; 143]. Также известно, что солюбилизация Р происходит более активно в присутствии доступного источника углерода [144].

Отмечено, что мицелиальные грибы, изолированные из почвы, в большей степени обладали способностью к Р-мобилизации по сравнению с эндофитными

(таблица 7) [121, с. 9]. Можно предположить, что эндофиты утилизируют легкодоступный Р из растений, в связи с чем способность к Р-мобилизации для них менее важна. Однако, сведения о Р-мобилизующих почвенных и эндофитных микроорганизмах в сравнительном аспекте весьма ограничены. Имеются данные, что количество бактериальных Р-солубилизаторов в ризосфере яблони было неизменно выше, чем в эндосфере [145].

Всего 115 штаммов микромицетов, преимущественно мицелиальные грибы, обладали способностью к мобилизации как неорганического, так и органического источника фосфора (таблица 7). Значения индекса мобилизации варьировали в диапазоне от 1,03 до 1,81 в зависимости от штамма [121, с. 6].

К комплексу положительных эффектов, оказываемых микромицетами на растения, принадлежит их способность защищать растения от неблагоприятных биотических и абиотических факторов окружающей среды [2, с. 763-764; 5, с. 3-4; 43, с. 5-6; 57, с. 5-6].

Среди неблагоприятных факторов биотической природы ключевое значение имеет фитопатогенная микрофлора. Уровень потерь урожая вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами постоянно растет [146]. В связи с этим следующим критерием скрининга стала способность штаммов подавлять рост и развитие фитопатогенов. Исследование антагонистической активности у 848 изолятов микромицетов по отношению к *F.graminearum*, *P. infestans* и *A. alternata* позволило установить, что доля штаммов, способных подавлять развитие фитопатогенных грибов, довольно высока и составляет около 21,2% от общего числа микромицетов (рисунок 7). Кроме того, установлено, что 11,5% всех выделенных штаммов в той или иной степени подавляли развитие сразу нескольких фитопатогенов. Отмечена высокая степень вариации антагонистической активности исследуемых изолятов. Зона подавления роста фитопатогенных микроорганизмов варьировала в диапазоне от 3 до 22 мм в зависимости от штамма [141, с. 45].

ТМ являются сильным абиотическим стресс-фактором для растений, приводят к задержке их роста и развития, а в определенных случаях и к гибели [79, с. 23; 80, с. 232-233]. Установлено, что микроорганизмы снижают поступление ТМ в растения из загрязненных почв путем различных механизмов [80, с. 236-237; 95, с. 10-11; 96, с. 9]. При культивировании штаммов микромицетов на плотных питательных средах с добавлением ТМ (кадмий, свинец, цинк) в концентрации 1 мМ выявлено, что 23% мицелиальных грибов и 16,4% дрожжевых культур обладают устойчивостью к исследуемым металлам (рисунок 7). ИТ варьировали в широком диапазоне от 0,17 до 0,98. Ряд изолятов продемонстрировал устойчивость одновременно к нескольким ТМ (рисунок 8) [141, с. 44-45].

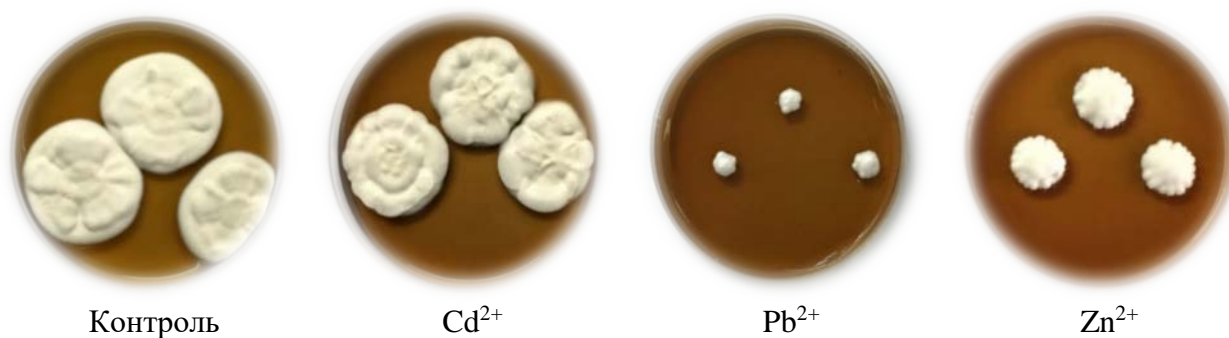


Рисунок 8 – Рост штамма *Beauveria* sp. T2 на средах с добавлением тяжелых металлов в концентрации 1 мМ

Таким образом, в результате широкомасштабного скрининга почвенных и эндофитных микромицетов был отобран ряд штаммов с агрономически ценными свойствами: 9 изолятов с выраженной антагонистической активностью по отношению к 3 фитопатогенам (*F. graminearum*, *P. infestans* и *A. alternata*); 14 штаммов, устойчивых к 3 ТМ (кадмий, свинец, цинк); 12 микромицетов, способных к мобилизации как органического, так и неорганического Р; 10 культур, продуцирующих фитогормон ИУК.

Критерием для отбора являлось ярко выраженное проявление активности по одному из исследуемых параметров, а также наличие сразу нескольких биотехнологически ценных свойств. Данные штаммы были использованы на следующих этапах работы для дальнейшего детального изучения механизмов их положительного действия на растения и оценки возможности их применения для улучшения роста и защиты сельскохозяйственных культур.

3.2.2 Исследование механизмов фосфат-мобилизирующей активности

Одним из механизмов, с помощью которого микромицеты стимулируют рост и развитие агрокультур, является обеспечение растений доступными элементами минерального питания, преимущественно Р. Микромицеты переводят труднорастворимые соединения Р в доступную для растений форму с помощью следующих основных механизмов: солибилизация неорганического Р за счет продуцирования низкомолекулярных кислот и минерализация органических соединений Р вследствие фосфатазной и фитазной активности [58, с. 2; 59, с. 174-175; 63, с. 99].

Данный этап работы был сфокусирован на детальной характеристике процесса фосфат-мобилизации и исследовании механизмов, лежащих в основе солибилизации неорганического Р и минерализации органического Р, с последующей оценкой эффективности применения отобранных штаммов для улучшения фосфорного питания растений *in vivo*.

На предыдущей стадии исследований при проведении скрининга из 848 штаммов микромицетов 115 продемонстрировали способность к мобилизации как неорганических, так и органических соединений Р при росте на твердой питательной среде. Из них 12 штаммов имели индекс мобилизации выше 1,2 для обоих источников Р, поэтому они были отобраны для дальнейшего изучения

процесса Р-мобилизации. Количество мобилизованного Р составило от 188 ± 8 до 855 ± 38 мкг/мл в процессе солубилизации Са-фосфата и от 298 ± 15 до 763 ± 34 мкг/мл в процессе минерализации Са-фитата (таблица 8). В большинстве случаев эффективность мобилизации органического Р была выше, чем неорганического. Исключением явился штамм *Aspergillus* sp. D1, который был более эффективен в растворении Са-фосфата, чем Са-фитата. Мицелиальный гриб *Aspergillus* sp. D5 продемонстрировал равную активность в отношении обоих источников Р (таблица 8) [121, с. 6].

Таблица 8 – Фосфат-мобилизующая активность штаммов микромицетов

Штамм	Источник выделения штамма	Индекс мобилизации фосфора	Количество мобилизованного фосфора, мкг/мл	Эффективность Р-мобилизации	Конечное значение рН среды
Фосфат Са					
<i>P. bilaiae</i> Pb14	Почва, донник	$1,67 \pm 0,04$ d	505 ± 22 c	51 ± 2 c	$4,9 \pm 0,2$ bc
<i>P. bilaiae</i> C11	Почва, ячмень	$1,55 \pm 0,031$ bc	471 ± 19 c	47 ± 2 c	$4,2 \pm 0,3$ b
<i>Penicillium</i> sp, EF2	Эндофит, соя	$1,31 \pm 0,05$ a	188 ± 8 a	19 ± 1 a	$5,2 \pm 0,3$ cd
<i>P. rubens</i> EF5	Эндофит, ячмень	$1,25 \pm 0,04$ a	462 ± 16 c	46 ± 2 c	$4,9 \pm 0,4$ bc
<i>Penicillium</i> sp, EF6	Эндофит, эспарцет	$1,58 \pm 0,03$ cd	240 ± 11 b	24 ± 1 b	$5,9 \pm 0,1$ cd
<i>T. pinophilus</i> T14	Почва, донник	$1,21 \pm 0,029$ a	558 ± 25 d	56 ± 3 d	$4,6 \pm 0,2$ bc
<i>Talaromyces</i> sp, T17	Почва, соя	$1,46 \pm 0,019$ b	196 ± 9 ab	20 ± 1 ab	$5,2 \pm 0,3$ cd
<i>Aspergillus</i> sp, D1	Почва, эспарцет	$1,21 \pm 0,04$ a	855 ± 38 e	86 ± 4 e	$2,3 \pm 0,1$ a
<i>Aspergillus</i> sp, D5	Почва, донник	$1,45 \pm 0,02$ b	244 ± 8 b	24 ± 1 b	$5,1 \pm 0,2$ cd
<i>Trichoderma</i> sp, S7	Эндофит, люцерна	$1,48 \pm 0,06$ bc	199 ± 7 ab	20 ± 1 ab	$4,8 \pm 0,3$ bc
<i>Trichoderma</i> sp, BS23	Почва, донник	$1,47 \pm 0,03$ b	246 ± 10 b	25 ± 31 b	$4,9 \pm 0,6$ bc
<i>Fusarium</i> sp, MR12	Почва, ячмень	$1,25 \pm 0,04$ a	198 ± 7 ab	20 ± 1 ab	$5,1 \pm 0,4$ cd
Фитат Са					
<i>P. bilaiae</i> Pb14	Почва, донник	$1,81 \pm 0,04$ e	701 ± 25 de	66 ± 2 de	$4,5 \pm 0,2$ cd
<i>P. bilaiae</i> C11	Почва, ячмень	$1,77 \pm 0,05$ e	680 ± 24 d	64 ± 2 d	$4,4 \pm 0,2$ bc
<i>Penicillium</i> sp, EF2	Эндофит, соя	$1,22 \pm 0,068$ a	533 ± 21 c	50 ± 3 c	$5,2 \pm 0,1$ de
<i>P. rubens</i> EF5	Эндофит, ячмень	$1,75 \pm 0,03$ e	558 ± 20 c	53 ± 2 c	$4,7 \pm 0,3$ cd
<i>Penicillium</i> sp, EF6	Эндофит, эспарцет	$1,68 \pm 0,07$ de	307 ± 12 a	29 ± 1 a	$4,3 \pm 0,2$ bc
<i>T. pinophilus</i> T14	Почва, донник	$1,76 \pm 0,05$ e	726 ± 30 de	68 ± 3 de	$5,0 \pm 0,3$ cde
<i>Talaromyces</i> sp, T17	Почва, соя	$1,34 \pm 0,01$ ab	256 ± 13 a	24 ± 1 a	$6,0 \pm 0,4$ f
<i>Aspergillus</i> sp, D1	Почва, эспарцет	$1,55 \pm 0,018$ cd	763 ± 34	72 ± 3 e	$2,7 \pm 0,1$ a
<i>Aspergillus</i> sp, D5	Почва, донник	$1,44 \pm 0,04$ bc	303 ± 13 a	29 ± 1 a	$3,7 \pm 0,018$ b
<i>Trichoderma</i> sp, S7	Эндофит, люцерна	$1,56 \pm 0,02$ cd	298 ± 15 a	28 ± 1 a	$4,4 \pm 0,3$ bc
<i>Trichoderma</i> sp, BS23	Почва, донник	$1,59 \pm 0,08$ cd	300 ± 9 a	28 ± 1 a	$5,7 \pm 0,2$ ef
<i>Fusarium</i> sp, MR12	Почва, ячмень	$1,21 \pm 0,01$ a	468 ± 23 b	44 ± 2 b	$4,9 \pm 0,5$ cd
Примечание — Разные латинские буквы в одном и том же субстолбце для фосфата Са и фитата Са указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$					

Во всех вариантах наблюдалось снижение рН питательной среды в процессе роста культур (таблица 8). Эффективность мобилизации Р отрицательно коррелировала с конечными значениями рН среды (для Са-фосфата $r = -0,81$, $p = 0,01$, $n = 108$; для Са-фитата $r = -0,38$, $p = 0,02$, $n = 108$) [121, с. 6].

В большинстве случаев штаммы, образующие крупные гало зоны на чашках с плотной питательной средой, также обладали высокой способностью мобилизовать труднорастворимые соединения Р в жидкой среде. Однако, некоторые штаммы имели относительно низкие значения индекса мобилизации при росте на агаризованной среде, но при этом активно мобилизовали Р в жидкой среде. Например, у штаммов *T. pinophilus* T14 на среде с Са-фосфатом, *Penicillium* sp. EF2 и *Fusarium* sp. MR12 на среде с Са-фитатом зафиксированы не очень высокие индексы мобилизации, в то время как количество мобилизованного Р у данных мицелиальных грибов достигало высоких значений (558 ± 25 , 533 ± 21 и 468 ± 23 мкг/мл, соответственно) (таблица 8) [121, с. 11-12]. Это наблюдение может быть связано с различной скоростью диффузии в агаре продуцируемых грибами органических кислот и фосфатаз, участвующих в процессе мобилизации труднорастворимых фосфатов. Аналогично полученным результатам рядом авторов показано, что при росте дрожжей [62, с. 1126] и бактерий [147] на плотных средах формирование гало-зон или вовсе не наблюдалось, или зоны просветления были небольшого размера, в то время как в жидких средах данные культуры активно солубилизировали Р. Полученные результаты позволяют заключить, что размер видимых гало зон на чашках с агаризованной средой не является достаточным критерием для отбора активных Р-мобилизующих микроорганизмов и его следует сопровождать экспериментами на жидких культурах.

Активных Р-мобилизующих микромицетов не было обнаружено среди изолятов из сафлора (*Carthamus tinctorius*) и рапса (*Brassica napus*), а также из почв под посевами данных агрокультур (таблица 8) [121, с. 11]. Эти данные позволяют предположить, что вид растения оказывает влияние на присутствие Р-мобилизующих грибов. Известно, что растение играет основную роль в формировании состава микробных сообществ и их функциональных свойствах вследствие индивидуального специфического состава корневых экссудатов [22]. Например, Spohn и соавт. показали, что глюкоза и аланин, наиболее распространенные компоненты корневых экссудатов, увеличивают как микробную биомассу, так и скорость минерализации органического Р [148].

Учитывая количество мобилизованного Р, для дальнейшего детального исследования механизмов процесса фосфат-мобилизации, были отобраны пять наиболее активных штаммов, которые по данному критерию можно расположить в следующей последовательности: *Aspergillus* sp. D1 > *T. pinophilus* T14 > *P. bilaiae* Pb14 > *P. bilaiae* C11 > *P. rubens* EF5 [121, с. 12]. Данные штаммы обладали способностью к высвобождению Р в количестве, аналогичном или значительно превышающем, чем описано в ранее проведенных исследованиях для штаммов рода *Aspergillus* [149; 150], некоторых видов *Talaromyces* [119; 142] и *Penicillium* [117, с. 96-98; 151], включая *P. bilaiae* [152]. Штамм мицелиального гриба *P. bilaiae* Pb14 запатентован в качестве штамма, обладающего фосфат-

мобилизующей активностью [153]. Фотографии колоний отобранных штаммов, способствующих максимальному увеличению количества свободного Р в среде, представлены на рисунке 9 [121, с. 6-7].

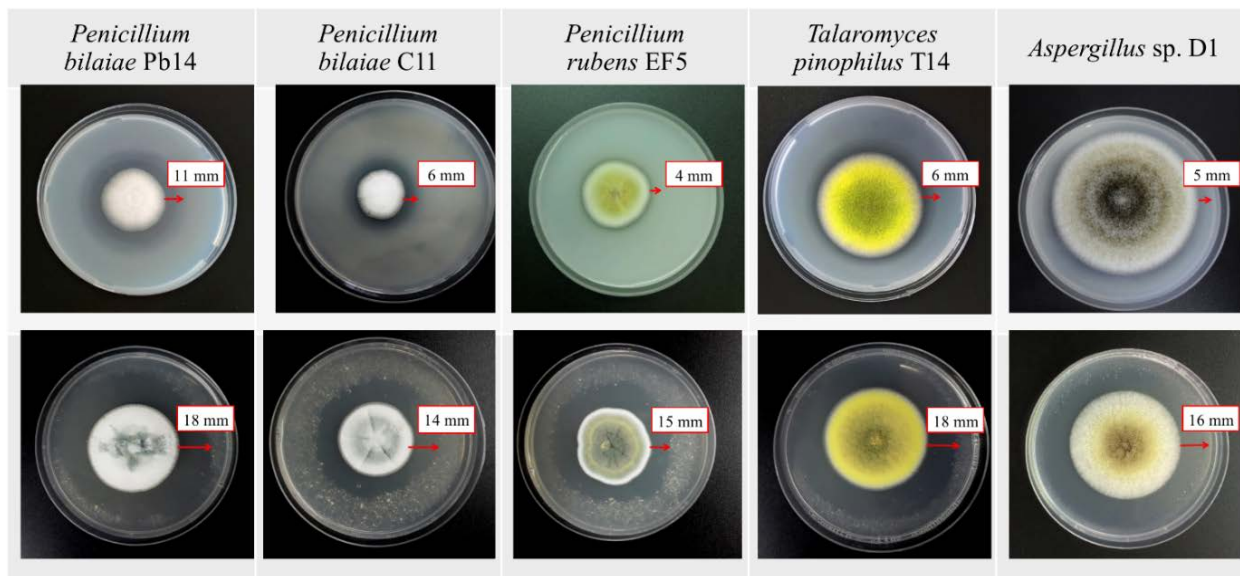


Рисунок 9 – Колонии микромицетов на среде Пиковской с добавлением фосфата Са (верхний ряд) и фитата Са (нижний ряд)

Сельскохозяйственные почвы, используемые в исследовании, являются известковыми (концентрация CaCO_3 составляет около 7,7%) и имеют щелочные условия со средним значением pH 8,3. Данные почвы богаты органическим веществом, содержание гумуса находится в пределах от 2,44 до 2,78% (таблица 2). В почвах с такими характеристиками основная часть Р иммобилизована в виде труднорастворимых комплексов фосфатов Са и фитата Са [58, с. 2]. Поэтому, учитывая характеристики почвы, в экспериментах в качестве источников Р использовали фосфат Са и фитат Са. Однако для выявления истинных мобилизаторов Р важно использовать и другие труднорастворимые соединения Р, такие как фосфаты алюминия и железа [154]. Отобранные штаммы продемонстрировали способность мобилизовать все исследуемые источники Р. Среди неорганических форм Р эффективность солиобилизации была выше в отношении фосфата Са. В меньшей степени штаммы продемонстрировали способность к мобилизации Р из фосфатов Al и Fe [121, с. 6]. Возможно, это обусловлено тем, что растворение данных фосфатов сопровождается появлением в среде катионов металлов Al и Fe, которые могут вести к нарушению метаболической активности грибов. Также имеются сведения, что фосфат Са легче мобилизуется микроорганизмами, чем другие труднорастворимые фосфаты, поскольку в этом процессе существенную роль играет снижение кислотности среды, в то время как при мобилизации Р из фосфатов Al и Fe основное значение имеют процессы хелатообразования с участием анионов, главным образом, ди- и трикарбоновых кислот [155].

Способность исследуемых штаммов микромицетов к мобилизации Р из различных соединений может быть представлена в следующем порядке: фитат

Са > фосфат Са > фосфат Al > фосфат Fe (таблица 9). Однако выявлено одно исключение со штаммом *P. rubens* EF5, который продемонстрировал одинаковую эффективность Р-мобилизации для всех неорганических источников Р (таблица 9). При проведении двухфакторного анализа показано, что на эффективность фосфат-мобилизации значительное влияние оказал как фактор «штамм» ($F = 33,3$; $p = 0,0001$), так и фактор «источник Р» ($F = 55,4$; $p = 0,0001$). Кроме того, взаимодействие данных факторов также было значимым ($F = 56,3$; $p = 0,0001$) [121, с. 6].

Таблица 9 – Эффективность фосфат-мобилизации (%) на средах с различными источниками фосфора

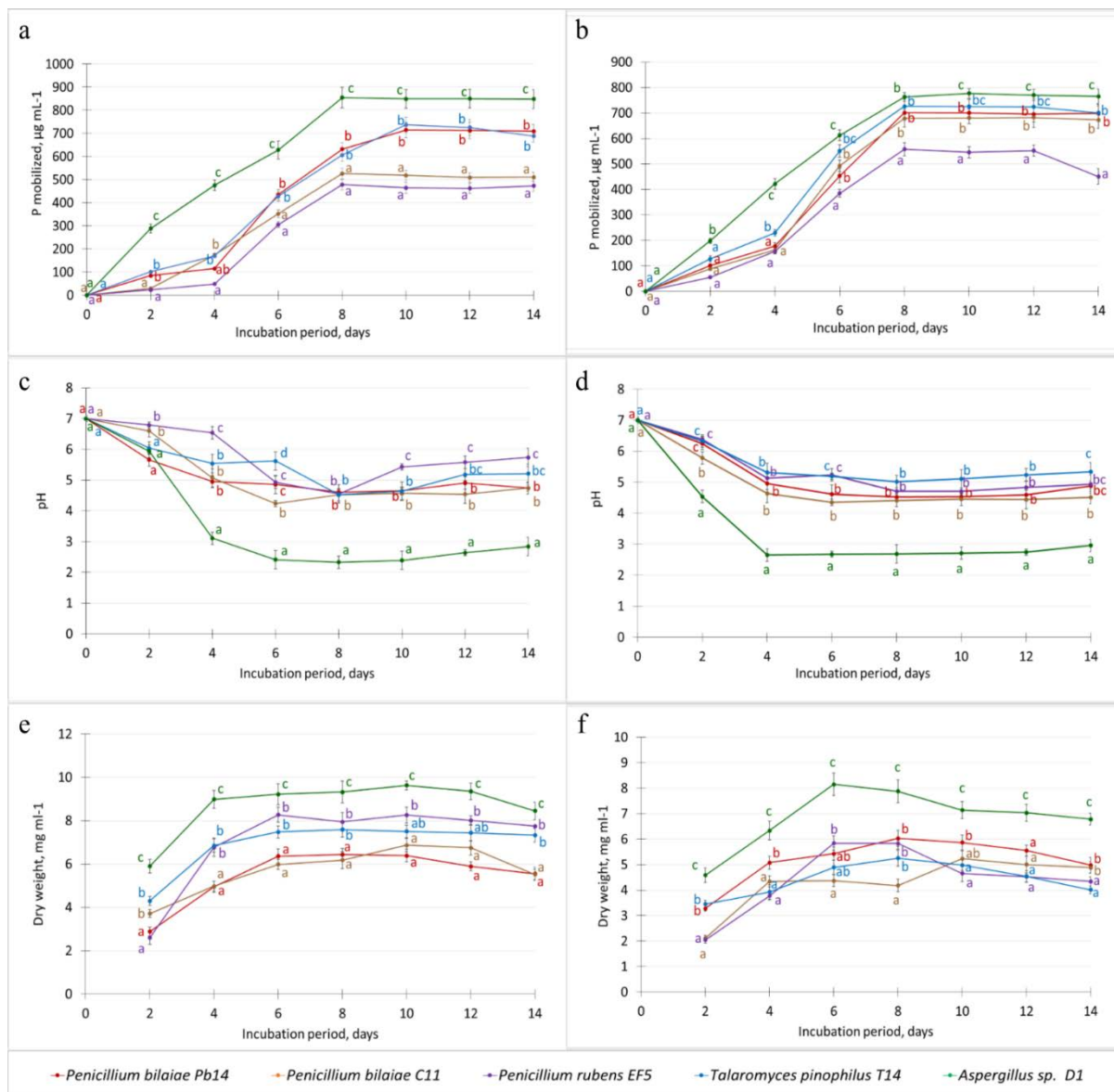
Источник фосфора	Штамм				
	<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	<i>Penicillium bilaiae</i> C11	<i>Penicillium rubens</i> EF5	<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	<i>Aspergillus</i> sp. D1
Фосфат Са	51 ± 2 c AB	47 ± 2 c A	46 ± 2 a A	56 ± 3 c B	86 ± 4 c C
Фосфат Fe	21 ± 1 a A	20 ± 1 a A	50 ± 4 ab C	33 ± 2 a B	51 ± 2 a C
Фосфат Al	33 ± 2 b A	29 ± 1 b A	47 ± 1 a B	48 ± 2 b B	67 ± 3 b C
Фитат Са	66 ± 4 d BC	64 ± 3 d B	53 ± 2 b A	68 ± 3 d BC	72 ± 3 b C
Прмечание – Разные строчные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между источниками Р, разные прописные буквы в одной и той же строке указывают на статистически значимые различия между штаммами согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$					

В отличие от большинства предыдущих исследований, в данной работе особое внимание уделено характеристике процессов мобилизации Р в динамике. Продемонстрировано, что этот подход полезен для оценки взаимосвязей между измеряемыми параметрами и важен для понимания механизмов мобилизации Р.

Исследуемые штаммы микромицетов способствовали быстрому высвобождению биодоступного Р как из органического, так и неорганического соединения Р. Количество мобилизованного Р постепенно увеличивалось уже на второй день культивирования, достигало максимальных значений на 8-10 сутки и оставалось неизменным до конца инкубационного периода (рисунок 10а, 10б). Прекращение увеличения концентрации растворенного Р после достижения наивысшего уровня можно объяснить самопотреблением мобилизованных фосфат-ионов растущей грибной популяцией. На среде с добавлением Са-фосфата наибольшая концентрация свободного Р отмечена для *Aspergillus* sp. D1, а также *T. pinophilus* T14 и *P. bilaiae* Pb14 (рисунок 10а). На среде с Са-фитатом все исследуемые штаммы были очень эффективны в процессе минерализации Р. Штамм *P. rubens* EF5 в меньшей степени проявил способность к мобилизации Са-фитата по сравнению с другими культурами микромицетов (рисунок 10б) [121, с. 6-7].

Мобилизация как органического, так и неорганического Р сопровождалась значительным снижением кислотности среды, значения которой падали с 7,0 до 2,5-5,0 в зависимости от штамма и источника Р. В течение 4-6 суток происходило постепенное понижение рН, после чего данный показатель оставался стабильным до конца инкубационного периода. Штамм *Aspergillus* sp. D1 способствовал наибольшему снижению рН по сравнению с другими штаммами

(рисунок 10с, 10d). Изменения рН среды было тесно связано с Р-мобилизующей способностью грибов. На 8-е сутки, когда содержание мобилизованного Р достигало максимума, выявлена достоверно значимая отрицательная корреляция между рН и количеством свободного Р для Са-фосфата ($r = -0,85$, $n = 45$, $p = 0,043$) и для Са-фитата ($r = -0,56$, $n = 45$, $p = 0,02$) [121, с. 7].



Примечания

- 1 Содержание свободного Р (а), рН среды (с) и сухая биомасса (е) на среде с фосфатом Са
- 2 Содержание свободного Р (b), рН среды (d) и сухая биомасса (f) на среде с фитатом Са
- 3 Разные латинские буквы в один и тот же день инкубационного периода указывают на статистически значимые различия между штаммами согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$

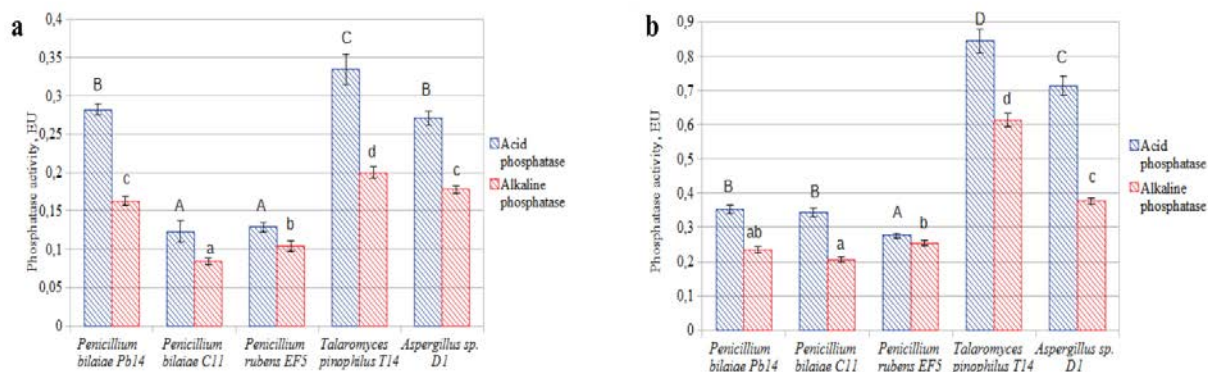
Рисунок 10 – Мобилизация Р штаммами микромицетов в течение инкубационного периода

Полученные результаты согласуется с исследованиями ряда авторов, продемонстрировавших снижение кислотности среды в процессе мобилизации Р различными штаммами дрожжей [62, с. 1127] и грибов [117, с. 96-97; 151].

Во время инкубационного периода биомасса грибов постепенно увеличивалась вплоть до 6 суток (рисунок 10e, 10f). Выявлена статистически значимая положительная корреляция между количеством растворенного Р и биомассой грибов в экспериментах с Са-фосфатом ($r = + 0,73$, $n = 45$, $p = 0,03$) и Са-фитатом ($r = + 0,83$, $n = 45$, $p = 0,02$) [121, с. 7].

Синтез и выделение фосфатаз является важным механизмом минерализации органического Р микроорганизмами. Эти ферменты разлагают органические соединения Р в почве, что приводит к повышению биодоступности Р для растений [59, с. 179-181; 60, с. 7-8]. При этом кислые фосфатазы могут выделяться как растениями, так и микроорганизмами, тогда как щелочные фосфатазы в основном имеют микробное происхождение [119, с. 156].

Исследуемые штаммы микромицетов продуцировали кислую и щелочную фосфатазы при росте на средах как с неорганическим (рисунок 11a), так и с органическим (рисунок 11b) соединением Р. Активность ферментов значительно варьировала в зависимости от штамма и источника Р и была в пределах от 0,084 до 0,335 Ед. на среде с Са-фосфатом, от 0,206 до 0,844 Ед. в присутствии Са-фитата. Максимальная активность ферментов отмечена для штаммов *Aspergillus* sp. D1 и *T. pinophilus* T14; штамм *P. bilaiae* Pb14 также продемонстрировал высокую фосфатазную активность в присутствии Са-фосфата (рисунок 11) [121, с. 7]. Значения активности были аналогичны или значительно превышали значения, описанные рядом авторов для штаммов грибов других видов [119; 142]. Сведений о фосфатазной активности грибов, относящихся к видам *P. rubens*, *P. bilaiae* и *T. pinophilus*, в ранее проведенных исследованиях не найдено.



Примечание - Разные латинские буквы над колонками одного цвета указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$

Рисунок 11 – Активность фосфатаз на среде с фосфатом Са (a) и фитатом Са (b)

Примечательно, что продукция фосфатаз была выявлена как в присутствии (рисунок 11b), так и в отсутствии (рисунок 11a) субстрата для данных ферментов - органического Р. Данное наблюдение позволяет предположить одновременное возникновение конститутивных и Р-индуцированных механизмов, связанных с синтезом фосфатаз, что, возможно, связано с адаптацией микроорганизмов к

окружающей среде. Отмечено, что фосфатазная активность была в 1,3-3,1 раза выше на среде с Са-фитатом (рисунок 11) [121, с. 12].

Активность кислой фосфатазы, как правило, была в 1,2–1,9 раза выше, чем щелочной. Вероятно, это связано со сдвигом рН среды в кислую сторону, которое происходит в процессе мобилизации Р микроорганизмами [121, с. 12]. Известно, что оптимум рН для активности кислой фосфатазы составляет около 4–6, в то время как для щелочной он составляет 8-10 [119, с. 156]. Исключением являлся штамм *P. rubens* EF5, у которого активность обеих фосфатаз была на одном уровне.

Микробная солубилизация неорганических соединений Р обусловлена различными механизмами, связанными в основном со снижением рН среды и выделением микроорганизмами органических кислот, которые могут либо растворять фосфаты в результате анионного обмена, либо хелатировать ионы Са, Fe или Al, связанные с нерастворимыми фосфатами [58, с. 2; 59, с. 174-175; 156, с.2].

Исследуемые штаммы продуцировали десять из одиннадцати протестированных органических кислот при росте на среде Пиковской с добавлением фосфата Са (таблица 10), что обуславливает их способность к мобилизации труднорастворимых фосфатов. Качественный и количественный состав органических кислот значительно варьировал в зависимости от штамма (Приложение Б). Пировиноградная, щавелевая, яблочная и фумаровая кислоты были обнаружены во всех супернатантах, в то время как другие органические кислоты продуцировались только лишь некоторыми штаммами. Ни один штамм не секретировал пропионовую кислоту. Органической кислотой, выделяемой в наибольшем количестве, была пировиноградная, продуцируемая в наибольшей степени штаммом *Aspergillus* sp. D1, у которого концентрация данной кислоты достигала 44,44 мкг/мл (таблица 10) [121, с. 12]. Имеются крайне ограниченные сведения о продукции пировиноградной кислоты фосфат-мобилизующими грибами [157], а также лишь несколько сообщений о выделении данной кислоты бактериями [158, 159]. В исследованиях ряда авторов показано, что щавелевая, лимонная, яблочная, молочная и янтарная кислоты являются основными органическими кислотами, продуцируемыми ФМГ, принадлежащими к родам *Aspergillus* [149, 160, 161], *Talaromyces* [162] и *Penicillium* [152, 161, 162]. Также показано, что тип и количество органических кислот существенно зависит от источников Р [156, 163, 164]. Так, щавелевая, яблочная и янтарная кислоты являются основными кислотами, продуцируемыми ФМГ в присутствии Са-фосфата, в то время как лимонная кислота секретировается преимущественно в присутствии Fe-фосфата [156, с. 7; 163, с.4099].

Одновременное продуцирование нескольких органических кислот штаммами микромицетов может повышать их потенциал для мобилизации труднорастворимых соединений Р. Однако в настоящей работе не выявлено корреляции между количеством мобилизованного Р и продукцией органических кислот. Так, штаммы *Aspergillus* sp. D1 и *T. pinophilus* T14 были наиболее эффективными в солубилизации фосфата Са (таблица 9), однако общее количество органических кислот, секретироваемых *T. pinophilus* T14, было

значительно ниже по сравнению с другими штаммами (таблица 10) [121, с.12]. Возможно, это связано с тем, что более важным фактором в фосфат-мобилизации является не количество, а тип продуцируемых кислот. Также полученные результаты позволяют предположить, что мобилизация Р зависит от сочетания факторов, а именно от состава и количества секретируемых органических кислот, активности фосфатаз и изменения рН среды, которое осуществляется за счет продуцирования органических кислот или выделения протонов Н⁺ в процессе дыхания и ассимиляции аммония [59, с. 175-176; 60, с. 7; 164, с. 74-75].

Таблица 10 – Продукция органических кислот (мкг/мл) штаммами микромицетов

Органическая кислота	Штамм				
	<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	<i>Penicillium bilaiae</i> C11	<i>Penicillium rubens</i> EF5	<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	<i>Aspergillus</i> sp. D1
Пировиноградная	19,71 ± 0,51	29,84 ± 1,44	13,52 ± 0,2	22,44 ± 1,35	44,44 ± 1,14
Щавелевая	0,23 ± 0,02	0,33 ± 0,06	0,69 ± 0,08	0,65 ± 0,06	0,05 ± 0,01
Яблочная	0,82 ± 0,06	0,76 ± 0,04	0,94 ± 0,18	0,41 ± 0,08	0,1 ± 0,01
Янтарная	2,82 ± 0,17	-	-	0,55 ± 0,09	0,34 ± 0,17
Лимонная	3,59 ± 0,55	1,57 ± 0,36	-	-	-
Фумаровая	0,18 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Уксусная	5,09 ± 0,39	-	-	-	-
Молочная	-	3,8 ± 0,65	4,04 ± 0,23	3,01 ± 1,78	-
Аконитовая	0,06 ± 0,01	-	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,24 ± 0,07
Пироглутаминовая	-	-	8,44 ± 1,04	0,49 ± 0,45	-
Пропионовая	-	-	-	-	-
Общее количество органических кислот	65 ± 1,5	72,7 ± 0,6	55,6 ± 0,5	55,1 ± 1,5	90,7 ± 1,3

В результате проведенных исследований показано, что инокуляция штаммами микромицетов положительно влияла на обеспеченность почвы фосфором. Достоверное повышение содержания подвижного Р в почве наблюдалось уже на 10-е сутки эксперимента во всех вариантах обработки. Концентрация доступного Р достигала максимальных значений на 20-ые сутки после инокуляции штаммами микромицетов и превышала контрольный вариант на 15-31% (таблица 11). С увеличением срока инкубации количество подвижного Р постепенно снижалось (при инокуляции штаммами *P. bilaiae* C11 и *P. rubens* EF5) по сравнению с максимальными значениями, зафиксированными на 20-е сутки, или оставалось неизменным до окончания эксперимента (в вариантах с *P. bilaiae* Pb14, *T. pinophilus* T14 и *Aspergillus* sp. D1) (таблица 11) [121, с. 8]. Наблюдаемое снижение концентрации доступного Р может быть вызвано обратным переходом Р в нерастворимые комплексы. Исследуемая почва являлась умеренно щелочной (рН = 8,4) с высоким содержанием СаСО₃ (таблица 2), что могло способствовать фиксации Р с высокореактивными ионами Са²⁺.

Аналогично полученным результатам в ранее проведенных исследованиях сообщается об общей тенденции к быстрой солюбилизации Р в почве в начале эксперимента с последующим постепенным увеличением содержания подвижных фосфат-ионов и дальнейшей стабилизацией процесса мобилизации [164, с. 74-75] или снижением доступного Р [165, с. 4612].

Таблица 11- Влияние фосфат-мобилизирующих штаммов микромицетов на содержание доступного фосфора и рН почвы

Вариант обработки	Длительность, сутки					
	0	10	20	30	40	50
	Содержание доступного Р, мг/кг					
Контроль	12,2 ± 0,5 a A	12,5 ± 0,37 a A	12,2 ± 0,27 a A	12,7 ± 0,2 a A	12,5 ± 0,4 a A	12,2 ± 0,5 a A
<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	12,2 ± 0,5 a A	14,8 ± 0,58 c B	15,4 ± 0,6 c BC	15,1 ± 0,3 c B	15,5 ± 0,5 c BC	15,4 ± 0,2 cd B
<i>Penicillium bilaiae</i> C11	12,2 ± 0,5 a A	13,9 ± 0,4 bc BC	14,2 ± 0,3 b C	13,6 ± 0,018 b B	13,3 ± 0,6 b BC	12,9 ± 0,19 b B
<i>Penicillium rubens</i> EF5	12,2 ± 0,5 a A	13,4 ± 0,6 ab AB	13,8 ± 0,6 b B	13,5 ± 0,1 b B	13,0 ± 0,3 b AB	13,1 ± 0,42 b AB
<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	12,2 ± 0,5 a A	13,8 ± 0,2 bc B	14,7 ± 0,2 bc C	14,6 ± 0,19 c C	14,9 ± 0,2 c C	14,5 ± 0,38c C
<i>Aspergillus</i> sp. D1	12,2 ± 0,5 a A	14,5 ± 0,5 bc B	15,7 ± 0,4 cd C	15,8 ± 0,21 d C	15,5 ± 0,33 c C	15,6 ± 0,2 cd C
	рН почвы					
Контроль	8,4 ± 0,2 a A	8,4 ± 0,2 b A	8,4 ± 0,2 b A	8,4 ± 0,2 b A	8,4 ± 0,2 b A	8,4 ± 0,2 b A
<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	8,4 ± 0,2 a B	7,9 ± 0,08 a A	7,7 ± 0,1 a A	7,6 ± 0,3 a A	7,7 ± 0,23 a A	7,5 ± 0,018 a A
<i>Penicillium bilaiae</i> C11	8,4 ± 0,2 a B	8,2 ± 0,1 ab AB	7,9 ± 0,2 ab B	7,9 ± 0,29 ab B	8,0 ± 0,1 ab AB	7,7 ± 0,19 ab B
<i>Penicillium rubens</i> EF5	8,4 ± 0,2 a B	8,1 ± 0,2 ab AB	7,9 ± 0,13 ab A	7,9 ± 0,2 ab AB	8,0 ± 0,2 ab AB	7,9 ± 0,22 ab A
<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	8,4 ± 0,2 a A	8,4 ± 0,230 b A	8,3 ± 0,2 b A	8,3 ± 0,44 b A	8,2 ± 0,3 b A	8,1 ± 0,24 b A
<i>Aspergillus</i> sp. D1	8,4 ± 0,2 a B	7,9 ± 0,07 a AB	7,7 ± 0,3 a A	7,5 ± 0,4 a A	7,7 ± 0,32 a A	7,6 ± 0,3 a A
Примечание – Разные строчные латинские буквы в одном и том же субстолбце указывают на статистически значимые различия между вариантами обработки, прописные латинские буквы в одной и той же строке указывают на статистически значимые различия между сутками согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$						

Инокуляция грибными штаммами способствовала снижению рН почвы, значения данного показателя были ниже на 6-11% по сравнению с необработанным контролем (таблица 11). Исключением являлся вариант с *T. pinophilus* T14, где не было выявлено достоверно значимых изменений кислотности почвы [121, с. 8]. Это явление, возможно, было связано с возвращением к ионному равновесию в почве в процессе фосфат-мобилизации, а также с изменением активности штамма. Аналогичное значительное снижение рН почвы отмечалось в ранее проведенных исследованиях после внесения фосфат-мобилизирующих бактерий [165, с. 4613]. Однако в данной работе такие эффекты для грибных штаммов видов *P. rubens*, *P. bilaiae*, *T. pinophilus* и рода *Aspergillus* показаны впервые. Наибольшее увеличение доступного Р и

снижение рН почвы было достигнуто в вариантах со штаммами *P. bilaiae* Pb14 и *Aspergillus* sp. D1 (таблица 11).

Проведение двухфакторного анализа показало, что на доступное содержание фосфора в почве влияли два основных фактора: «вариант обработки» ($F = 19,7$; $p = 0,002$) и «длительность» ($F = 28,4$; $p = 0,0001$). Взаимодействие между этими факторами также было значительным ($F = 5,8$; $p = 0,0001$). На рН почвы влияли как основные факторы «вариант обработки» ($F = 10,7$; $p = 0,0001$) и «длительность» ($F = 9,4$; $p = 0,0005$), так и взаимодействие между данными факторами ($F = 4,9$; $p = 0,0002$). Влияние каждого из основных факторов, взятого в отдельности, было больше, чем взаимодействие между ними [121, с. 8].

Предыдущие исследования показали, что применение фосфат-мобилизующих микроорганизмов оказывает ростстимулирующий эффект на растения, который выражается в усилении всхожести и энергии прорастания семян, улучшении роста и урожайности агрокультур, а также повышении содержания питательных веществ [62, с. 1127; 117, с. 99-101; 166; 167]. Что касается ячменя, то такие эффекты были описаны только для бактерий [168, 169], в то время как данное исследование расширяет эту информацию для пяти штаммов грибов.

Максимальный эффект в обеспечении растений ячменч доступным Р отмечен в результате применения штамма *Aspergillus* sp. D1, где зафиксировано наибольшее увеличение содержания Р (на 35%). Штаммы *P. bilaiae* Pb14 и *T. pinophilus* T14 также способствовали значительному повышению содержания Р в растениях на 17% и 22%, соответственно (таблица 12). [121, с. 8]

Таблица 12 – Влияние фосфат-мобилизующих штаммов микромицетов на содержание и накопление Р в растениях ячменя

Вариант	Содержание Р, мг/г	Накопление Р, мг/раст.
Контроль	2,3 ± 0,2 а	0,16 ± 0,022 а
<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	2,7 ± 0,1 bc	0,23 ± 0,019 b
<i>Penicillium bilaiae</i> C11	2,6 ± 0,4 ab	0,20 ± 0,024 ab
<i>Penicillium rubens</i> EF5	2,6 ± 0,3 ab	0,21 ± 0,03 ab
<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	2,8 ± 0,19 bc	0,22 ± 0,012 b
<i>Aspergillus</i> sp. D1	3,1 ± 0,23 c	0,23 ± 0,013 b
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$		

Количество проросших семян в вариантах с обработкой штаммами достигало 99%, в то время как в контроле данный показатель составил 91%. Следует отметить, что в некоторых случаях прорастание инокулированных семян начиналось на 1-2 дня раньше по сравнению с контрольным вариантом. Максимальный процент прорастания семян зафиксирован в вариантах инокуляции штаммами *P. bilaiae* Pb14 и *P. rubens* EF5 (таблица 13). Применение всех исследуемых штаммов, за исключением *Aspergillus* sp. D1, способствовало увеличению длины и массы как надземной части (стеблей), так и подземной

части (корней) растений. Наибольшее увеличение сухой биомассы стеблей и корней отмечено в варианте с *P. bilaiae* Pb14, где исследуемые показатели на 23% и 32% превышали контрольный вариант без обработки (таблица 13) [121, с. 8]. Штамм мицелиального гриба *P. bilaiae* Pb14 запатентован в качестве штамма, обладающего фосфат-мобилизующей активностью [153].

Таблица 13 – Влияние фосфат-мобилизующих штаммов микромицетов на ростовые параметры ячменя

Вариант	Всхожесть, %	Длина стебля, см	Длина корня, см	Сухая масса побега, г/раст.	Сухая масса корня, г/раст.
Контроль	91 ± 5 a	20,1 ± 0,48 a	6,8 ± 0,2 a	0,047 ± 0,0021 a	0,022 ± 0,0012 a
<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	99 ± 2 b	23,9 ± 0,5 b	9,5 ± 0,3 c	0,058 ± 0,0023 d	0,029 ± 0,0013 c
<i>Penicillium bilaiae</i> C11	95 ± 3 ab	22,9 ± 0,7 b	8,1 ± 0,4 b	0,053 ± 0,001 bc	0,026 ± 0,0008 b
<i>Penicillium rubens</i> EF5	98 ± 3 ab	25,7 ± 0,53 c	9,4 ± 0,5 c	0,056 ± 0,001 cd	0,028 ± 0,001 bc
<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	96 ± 4 ab	23,2 ± 0,6 b	8,1 ± 0,6 b	0,054 ± 0,0012 c	0,026 ± 0,0009 b
<i>Aspergillus</i> sp. D1	92 ± 5 a	21,1 ± 0,4 a	7,0 ± 0,4 a	0,049 ± 0,002 ab	0,023 ± 0,0014 a

Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$

Наблюдаемые эффекты в инокулированных растениях по сравнению с неинокулированным контролем, выражающиеся в значительном усилении роста ячменя и увеличении содержания и накопления Р в растениях, подтверждают, что растения потребляют Р, мобилизованный изучаемыми штаммами микромицетов. Данное явление дает основание полагать, что исследуемые штаммы являются эффективными фосфат-мобилизаторами, стимулирующими рост и развитие растений.

Примечательно, что штамм *Aspergillus* sp. D1, способствующий максимальному повышению доступного Р в почве (таблица 11) и наибольшему его накоплению в растениях ячменя (таблица 12), не оказывал стимулирующего эффекта на всхожесть семян и рост растений (таблица 13). Возможно, это обусловлено тем, что штамм *Aspergillus* sp. D1 продуцирует некоторые соединения, нивелирующие его благоприятное влияние на растения за счет фосфат-мобилизации и синтеза фитогормонов (таблица 14). Полученный результат показывает, что высокая способность микроорганизмов к мобилизации соединений Р не всегда достаточна для стимулирования роста растений [121, с. 13].

Таким образом, при исследовании процесса фосфат-мобилизации было показано, что:

- исследуемые штаммы в условиях *in vitro* обладали высокой фосфат-мобилизующей активностью в отношении труднорастворимых источников Р: фосфаты Са, Al, Fe и фитат Са;
- у штаммов более выражена способность мобилизовать фосфор из органических соединений в сравнении с неорганическими;

- количество мобилизованного Р отрицательно коррелировало с рН среды и положительно коррелировало с биомассой грибов;

- процессы солюбилизации и минерализации Р, осуществляемые штаммами микромицетов, были обусловлены следующими механизмами: снижение рН среды, образование органических кислот, активность кислых и щелочных фосфатаз;

- выявлена способность данных штаммов *in vivo* повышать доступность Р в почве и увеличивать его поглощение ячменем.

Проведенные исследования позволили выбрать наиболее эффективные штаммы с высоким потенциалом их применения для улучшения фосфорного питания растений.

3.2.3 Продуцирование метаболитов с гормональной и сигнальной функциями

Одним из известных механизмов стимулирования и регулирования роста растений микроорганизмами является их способность синтезировать различные фитогормоны и сигнальные соединения: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовую и салициловую кислоты и др. Данные соединения играют существенную роль в формировании микробно-растительных взаимодействий, регуляции роста и развития растений, в том числе в повышении их устойчивости к биотическим и абиотическим неблагоприятным факторам окружающей среды. Способность к продукции фитогормонов и сигнальных соединений выявлена у многих ассоциативных и свободноживущих почвенных микромицетов [65, с. 1289; 66, с. 139-140].

На предыдущем этапе работы при проведении скрининга были отобраны 10 штаммов микромицетов, обладающих способностью к синтезу ИУК, а также проявляющих еще несколько агрономически ценных свойств (фосфат-мобилизация, антагонистическая активность, устойчивость к ТМ).

Хроматографический анализ (Приложение В) супернатантов культуральных жидкостей микромицетов показал, что исследуемые штаммы обладали способностью синтезировать фитогормоны трех классов: ауксины, абсцизовую и салициловую кислоты. Гибберелловая кислота ГКЗ не была выявлена ни в одном варианте (таблица 14). Следует отметить, что все штаммы продуцировали сразу несколько фитогормонов, состав и количество которых значительно варьировали [121, с. 7].

Стимулирование роста растений в результате применения СРРМ преимущественно связывают с их способностью продуцировать ауксины, главным образом ИУК [2, с. 764-765; 66, с. 133]. Все исследуемые микромицеты обладали способностью к продукции ауксинов (таблица 14). Анализ комплекса ауксинов показал, что кроме основной активной формы (ИУК) обнаружены другие индольные вещества, являющиеся продуктами трансформации ИУК: индолил-3-карбоксилловая кислота и индолил-3-молочная кислота. Фитогормон ИУК обнаружен в супернатантах всех исследуемых культур в количестве от $1,2 \pm 0,1$ до $627,6 \pm 40$ нг/мл. Способность к синтезу индолил-3-молочной кислоты выявлена у всех штаммов кроме *T. pinophilus* T14. Концентрация данного

гормона варьировала в пределах от $7,8 \pm 2,2$ до $653,9 \pm 9,9$ нг/мл в зависимости от штамма. Некоторые штаммы продуцировали индолил-3-карбоксихлору, количество которой было незначительным и не превышало $5,8 \pm 0,5$ нг/мл (таблица 14). Известно, что вследствие продукции ауксинов микромицеты в значительной степени влияют на архитектуру корневой системы растений за счет удлинения основного и боковых корней, увеличения густоты корневых волосков и площади поверхности корней, повышения их биомассы, что способствует улучшению усвоения воды и питательных веществ из почвы [170].

Таблица 14 – Биосинтез фитогормонов и сигнальных соединений (нг/мл) штаммами микромицетов

Штамм	Индолил-3-уксузная кислота	Индолил-3-карбоксихлору	Индолил-3-молочная кислота	Салициловая кислота	Абсцизовая кислота	Гибберелловая кислота
<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	$43,1 \pm 6,4$	-	$425,4 \pm 44,1$	-	-	-
<i>Penicillium bilaiae</i> C11	$32,5 \pm 8,8$	$0,07 \pm 0,01$	$653,9 \pm 9,9$	-	$3,5 \pm 1,1$	-
<i>Penicillium rubens</i> EF5	$2,2 \pm 0,1$	-	$7,8 \pm 2,2$	$10,9 \pm 1,9$	-	-
<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	$1,2 \pm 0,1$	$4,7 \pm 1$	-	$0,5 \pm 0,1$	$397,1 \pm 19,1$	-
<i>Aspergillus</i> sp. D1	$6,2 \pm 0,4$	-	$277,3 \pm 8,3$	$5,5 \pm 2,1$	-	-
<i>Beauveria bassiana</i> T15	$36,5 \pm 0,6$	-	$15,5 \pm 1,8$	$17,3 \pm 3,2$	-	-
<i>Mortierella</i> sp. EFW1	$71,8 \pm 6,7$	$5,8 \pm 0,5$	$13,7 \pm 3,8$	$14,8 \pm 2,4$	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> MK1	$109,1 \pm 8,4$	-	$65,2 \pm 4,5$	$8,5 \pm 0,7$	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MP2	$627,6 \pm 14$	-	$8,8 \pm 1,3$	$3,3 \pm 0,4$	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> RH2	$107,7 \pm 9,2$	-	$216,6 \pm 14,6$	$10,1 \pm 1$	-	-

Большинство штаммов накапливали салициловую кислоту, наибольшее количество которой зафиксировано у штаммов мицелиальных грибов *Mortierella* sp. EFW1 и *B. bassiana* T15 (таблица 14). Известно, что основная роль салициловой кислоты заключается в запуске каскада защитных реакций, обеспечивающих устойчивость растений к биотическим стрессам, преимущественно к инфекциям, вызванным фитопатогенными грибами [57, с. 9; 69, с. 260]. Следует отметить, что ряд штаммов, характеризующихся синтезом данного сигнального метаболита, обладали высокой антагонистической активностью: *T. pinophilus* T14, *Aspergillus* sp. D1, *B. bassiana* T15, *Rh. mucilaginosa* MK1, *M. pulcherrima* MP2 (таблицы 14, 15). Данный факт может свидетельствовать о роли салициловой кислоты, продуцируемой исследуемыми штаммами микромицетов, в защите растений от фитопатогенов.

Абсцизовая кислота выявлена только в двух вариантах с грибными штаммами *P. bilaiae* C11 и *T. pinophilus* T14 (таблица 14). Примечательно, что

данные штаммы продемонстрировали высокую фосфат-мобилизующую активность (таблица 9) как в отношении органических, так и неорганических соединений Р [121, с.13]. Известно, что абсцизовая кислота играет важную роль в процессах адаптации растений к различным стрессам окружающей среды, преимущественно абиотическим [69, с. 259; 171; 172], в том числе дефициту Р [173].

Таким образом, выявленная у исследуемых штаммов способность продуцировать метаболиты с гормональной и сигнальной функцией указывает на перспективность их применения для улучшения роста сельскохозяйственных культур как в нормальных условиях, так и в условиях стресса. Известно, что в процессе своего роста и развития растения подвергаются одновременному воздействию абиотических и биотических стрессовых факторов [2, с. 763]. Загрязнение почв ТМ и воздействие фитопатогенных грибов являются одними из главных причин снижения урожайности сельскохозяйственных культур. В связи с этим на следующем этапе работы было проведено детальное исследование механизмов и процессов, лежащих в основе протекторного действия микромицетов на растения.

3.2.4 Исследование механизмов защиты агрокультур от фитопатогенных грибов

Инфекции сельскохозяйственных культур, вызванные патогенными грибами, являются одними из наиболее широко распространенных и вредоносных. По оценкам Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций (ФАО) от 20 до 40% мировых потерь урожая связаны с болезнями растений, при этом из них на грибы приходится 42% [146]. Данные заболевания приводят не только к снижению урожая, но и к ухудшению его качества вследствие накопления опасных для здоровья человека и животных микотоксинов. Одним из положительных действий микромицетов на агрокультуры является их способность защищать растения от фитопатогенов.

На предыдущем этапе работы был отобран ряд штаммов, характеризующихся наиболее выраженными антагонистическими свойствами по отношению к трем исследуемым фитопатогенным грибам. Зоны подавления роста варьировали в диапазоне от 10 до 28 мм, ИИР был в пределах от 18 до 51% (таблица 15).

По характеру взаимодействия с фитопатогенными грибами отмечены два типа проявления антагонистической активности исследуемых штаммов микромицетов. Мицелиальные грибы *B. bassiana* T7, *B. bassiana* T15, *M. robertsii* An1, *T. pinophilus* T14, а также дрожжи *Rh.mucilaginosa* МК1 и *M. pulcherrima* МР2, не соприкасаясь с фитопатогенами, полностью подавляли их развитие с образованием «чистых» зон ингибирования. Это может быть обусловлено продуцированием внеклеточных метаболитов, которые, диффундируя в толщу агара, ингибировали рост фитопатогенов. Остальные штаммы (*Trichoderma* sp. E12, *Trichoderma* sp. S7, *Aspergillus* sp. D1), характеризующиеся быстрым ростом, активно разрастались, лизируя культуру фитопатогена в областях непосредственного соприкосновения. Такой тип взаимодействия может быть

связан с конкуренцией за субстрат, которая возможна благодаря быстрому росту микромицетных штаммов, что дает им преимущество в получении питательных веществ. Кроме того, данные штаммы, вероятно, продуцируют гидролитические ферменты, деградирующие мицелий фитопатогенов, а также соединения с антифунгальной активностью.

Таблица 15 – Антагонистическая активность штаммов микромицетов в отношении фитопатогенов

Штамм	Индекс ингибирования роста фитопатогенов, %			Размер зоны подавления роста, мм		
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>B. bassiana</i> T7	23,6±1,1	32,3±1,2	37,8±1,6	13±0,4	21±0,8	17 ± 0,7
<i>B. bassiana</i> T15	30,9±1,2	27,7±0,8	22,2±1	17±0,7	18± 0,7	10 ± 0,4
<i>Trichoderma</i> sp. E12	25,5±0,8	21,5±0,6	24,4±0,8	14±0,3	14± 0,3	11 ± 0,5
<i>Trichoderma</i> sp. S7	20±0,6	20±0,7	26,7±0,5	11±0,5	13± 0,1	12 ± 0,3
<i>M. robertsii</i> An1	51±1,5	41,5±1,1	48,9±1,8	28±0,9	27±1,1	22 ± 0,8
<i>Aspergillus</i> sp. D1	20±0,3	24,6±0,7	33,3±1,3	11± 0,4	16± 0,6	15 ± 0,4
<i>T. pinophilus</i> T14	18,2±0,7	20±0,3	35,6±1,5	10± 0,3	13±0,5	16 ± 0,8
<i>Rh.mucilaginosa</i> MK1	30,9±0,8	26,2±0,8	22,2±0,4	17± 0,6	17± 0,4	10 ± 0,4
<i>M. pulcherrima</i> MP2	27,3±1,1	27,7±0,5	28,9±0,7	15 ±0,7	18± 0,8	13 ± 0,3

При микроскопировании у фитопатогенных грибов под влиянием исследуемых микромицетных штаммов-антагонистов наблюдались изменения в морфогенезе, выражающиеся в подавлении развития ростковых трубок, апикальном и интеркалярном образовании сферопластоподобных структур, что приводило к формированию разветвленного, часто септированного мицелия. Кроме того, отмечено отсутствие спорообразования у развившихся гиф фитопатогенных грибов. Следует отметить, что по мере приближения к колонии штамма-антагониста изменения в строении мицелия фитопатогена проявлялись интенсивнее в то время как вне зоны действия секретлируемых микромицетами метаболитов у патогенного гриба формировался обычный мицелий. Это свидетельствует о том, что степень антагонистического действия микромицетов на фитопатоген обусловлена радиальным градиентом концентрации внеклеточных метаболитов.

Штамм мицелиального гриба *M. robertsii* An1, проявивший максимальную антагонистическую активность по отношению сразу к трем фитопатогенам (таблица 15), был отобран для расшифровки механизмов, лежащих в основе антагонизма.

Одним из важных механизмов, вовлеченных в процесс взаимодействия штаммов-антагонистов с фитопатогенами, является продуцирование комплекса специфических гидролитических ферментов, которые разрушают структурные полимеры клеточной стенки, что ведет к подавлению развития и/или полному ингибированию роста фитопатогенов. Хитиназы и глюканазы имеют первостепенное значение среди этих ферментов [2, с. 768; 73, с. 12-13]. Штамм *M. robertsii* An1 продемонстрировал способность расти на средах, содержащих коллоидный хитин и Na КМЦ в качестве единственного источника углерода.

Утилизация данных субстратов свидетельствует о способности штамма продуцировать хитиназу и β -1,3-глюканазу, соответственно. При количественной оценке отмечен высокий уровень активности данных ферментов: $0,23 \pm 0,01$ Ед. для хитиназы и $3,42 \pm 0,1$ Ед. для β -1,3-глюканазы. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтез внеклеточных гидролаз является одним из важных критериев, обуславливающих антагонистические свойства штамма *M. robertsii* An1. Также известно, что в результате действия хитиназ не только ограничивается рост патогена, но и образуются хитоолигосахариды, которые являются эффективными элиситорами системной устойчивости растений [2, с. 768].

Еще одним ключевым механизмом подавления роста патогенной микрофлоры является способность микромицетов синтезировать вещества с антибиотической активностью.

Важным классом веществ, обладающих антифунгальными свойствами, являются летучие органические соединения (ЛОС). На данный момент у грибов рода *Metarhizium* идентифицированные ЛОС главным образом характеризуется модулирующим действием по отношению к насекомым [109, с. 14], в то время как сведения об их влиянии на фитопатогенные грибы крайне ограничены. Была исследована антагонистическая активность ЛОС штамма *M. robertsii* An1 методом двойных чашек в отношении трёх фитопатогенных грибов. Показано, что ЛОС исследуемого штамма проявили слабую антифунгальную активность лишь к двум тестируемым фитопатогенам *P. infestans* и *A. alternata*, где ИИР составил 12,7% и 6,7%, соответственно (таблица 16). Полученные результаты свидетельствуют о том, что продуцирование ЛОС не является основным механизмом антагонистического действия исследуемого штамма.

Таблица 16 – Антагонистическая активность летучих органических соединений штамма *M. robertsii* An1 в отношении фитопатогенов

<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Индекс ингибирования роста фитопатогенов, %		
$12,7 \pm 0,5$	0	$6,7 \pm 0,1$
Размер зоны подавления роста, мм		
7 ± 1	0	$3 \pm 0,5$

Помимо ЛОС штаммы-антагонисты синтезируют широкий спектр нелетучих органических веществ с антагонистическими свойствами [71, с. 150; 73, с. 6]. На следующем этапе работы были исследованы нелетучие экзо- и эндометаболиты, полученные путем экстракции из фильтрата и мицелия культуры *M. robertsii* An1, соответственно.

Выход экстрактивных веществ варьировал в диапазоне от 0,22 до 0,48 г/л в зависимости от локализации (фильтрат и биомасса) и питательной среды (Чапека и Сабуро) (таблица 17). Среда Сабуро была более благоприятна для образования эндо- и экзосахаридов: выход экстрактивных веществ штамма на данной среде достигал максимальных значений и составлял $0,34 \pm 0,01$ и $0,48 \pm 0,02$ г/л, соответственно. В то время как на среде Чапека данный показатель не превышал

0,29±0,01 г/л (таблица 17). Выход экстрактивных веществ из фильтрата был достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с мицелием, что свидетельствует о преимущественно внеклеточном накоплении метаболитов.

Таблица 17 – Выход экстрактивных веществ штамма *M. robertsii* An1

Вариант экстракта	Выход экстрактивных веществ, г/л
Среда Чапека	
Фильтрат	0,29±0,01 b
Биомасса	0,22±0,016 a
Среда Сабуро	
Фильтрат	0,48±0,02 b
Биомасса	0,34±0,015 a
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же субстолбце указывают на статистически значимые различия между значениями при $p < 0,05$	

Анализ антагонистической активности экстрактов из культуры штамма *M. robertsii* An1 позволил выявить ряд особенностей. Наиболее чувствительными к исследуемым экстрактам оказались фитопатогенные грибы *P. infestans* и *A. alternata*. ИИР *F. graminearum* были достоверно ниже во всех вариантах по сравнению с другими тест-культурами фитопатогенов (таблица 18), что говорит о наибольшей устойчивости данного патогена к метаболитам *M. robertsii* An1.

Экстракты из фильтратов проявляли более высокую ингибирующую активность в отношении всех фитопатогенных грибов, чем аналогичные экстракты из мицелия (таблица 18). Полученный результат дает основание предположить, что соединения, обладающие антагонистической активностью, в большей степени выделяются штаммом *M. robertsii* An1 в окружающую среду и лишь некоторая их часть накапливается внутриклеточно.

Состав питательной среды оказывал существенное влияние на степень антагонистической активности грибных экстрактов. Антагонистическая активность как эндо-, так и экзометаболитов, полученных при выращивании штамма на среде Сабуро, была значительно выше, чем при росте штамма на среде Чапека (таблица 18).

Таблица 18 – Антагонистическая активность различных вариантов экстрактов из культуры штамма *M. robertsii* An1

Вариант экстракта	Индекс ингибирования роста фитопатогенов, %		
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Среда Чапека			
Фильтрат	34,5 ± 1,1 b	27,7 ± 0,8 b	33,3 ± 1,4 b
Биомасса	20 ± 0,5 a	15,4 ± 0,4 a	17,8 ± 0,5 a
Среда Сабуро			
Фильтрат	55,5 ± 1,5 b	45,4 ± 1,5 b	54,4 ± 1,6 b
Биомасса	35,5 ± 0,7 a	33 ± 1 a	36,7 ± 0,8 a
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же субстолбце указывают на статистически значимые различия между значениями при $p < 0,05$			

Таким образом, наиболее благоприятной средой для образования эндо- и экзометаболитов с высоким уровнем антагонистической активности являлась среда Сабуро.

Анализ полученных хроматограмм экстрактов из культуры *M. robertsii* An1 показал многокомпонентность данных фракций (рисунок 12, 13). Метаболитные комплексы экстрактов из мицелия и культуральной жидкости штамма значительно отличались по химическому составу.

Как видно из данных, представленных на рисунке 12, в экстракте из мицелия штамма основные соединения имели спектры поглощения в дальней области УФ-спектра (λ макс = 196,7 нм, 193,2 нм, 190,9 нм, 194,4 нм, 192,0 нм), что характерно для алифатических соединений, в том числе с изолированными кратными связями.

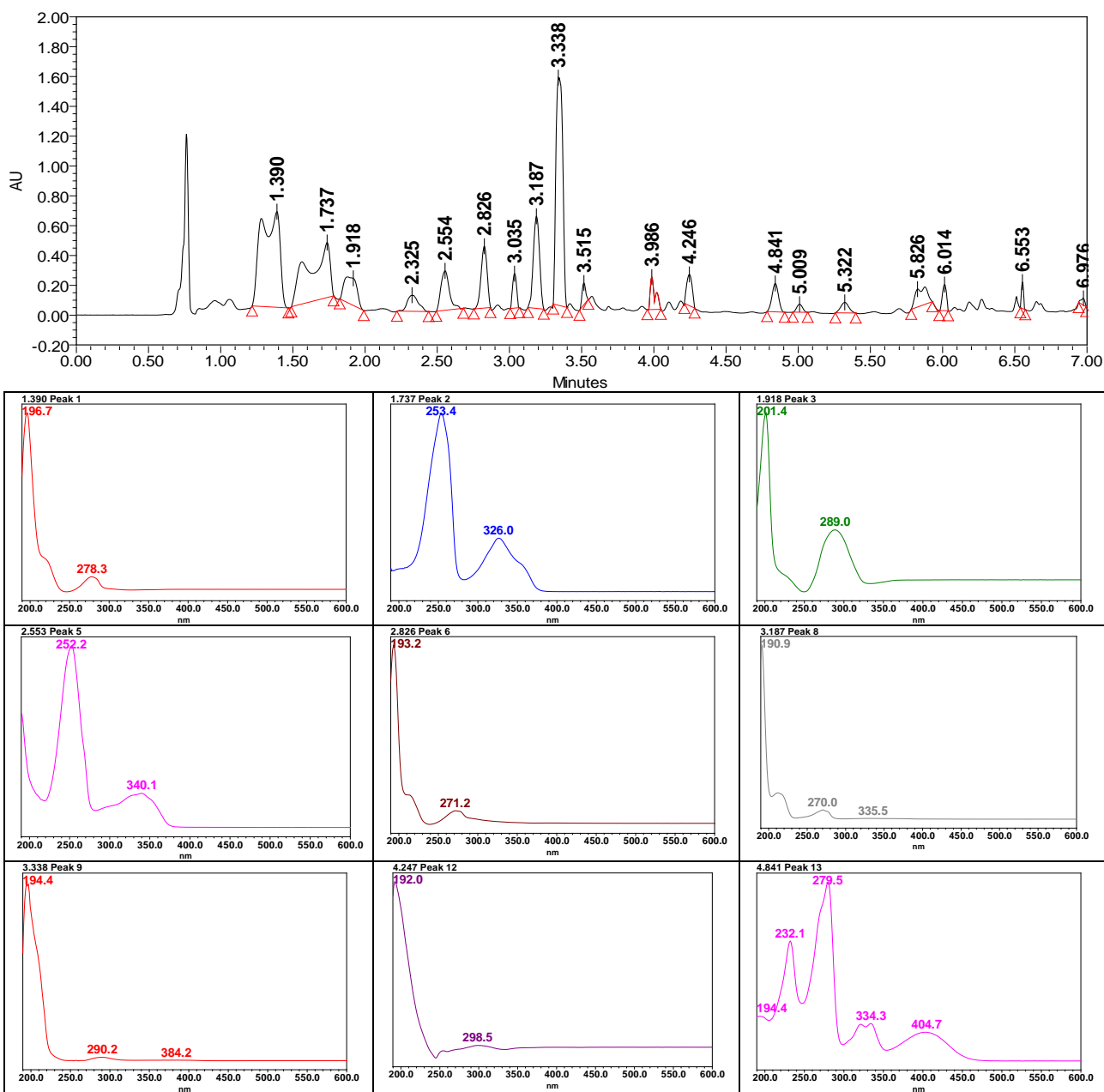


Рисунок 12 – ВЭЖХ-УФ хроматограмма экстракта из мицелия *M. robertsii* An1

В экстрактах из культуральной жидкости штамма *M. robertsii* An1 зафиксированы поглощения в области от 230 до 290 нм (рисунок 13), что свидетельствует о присутствии веществ с сопряженными диеновыми и полиеновыми связями. При этом выявленные поглощения в УФ-спектре при λ от 230 до 250 нм указывают на наличие гетероаннулярных, а от 265 до 285 нм – гомоаннулярных циклических систем. Кроме того, поглощение в данной области УФ-спектра характерно для веществ, имеющих в структуре одинарные С–С связи и полярные хромофорные группы, сопряженные между собой.

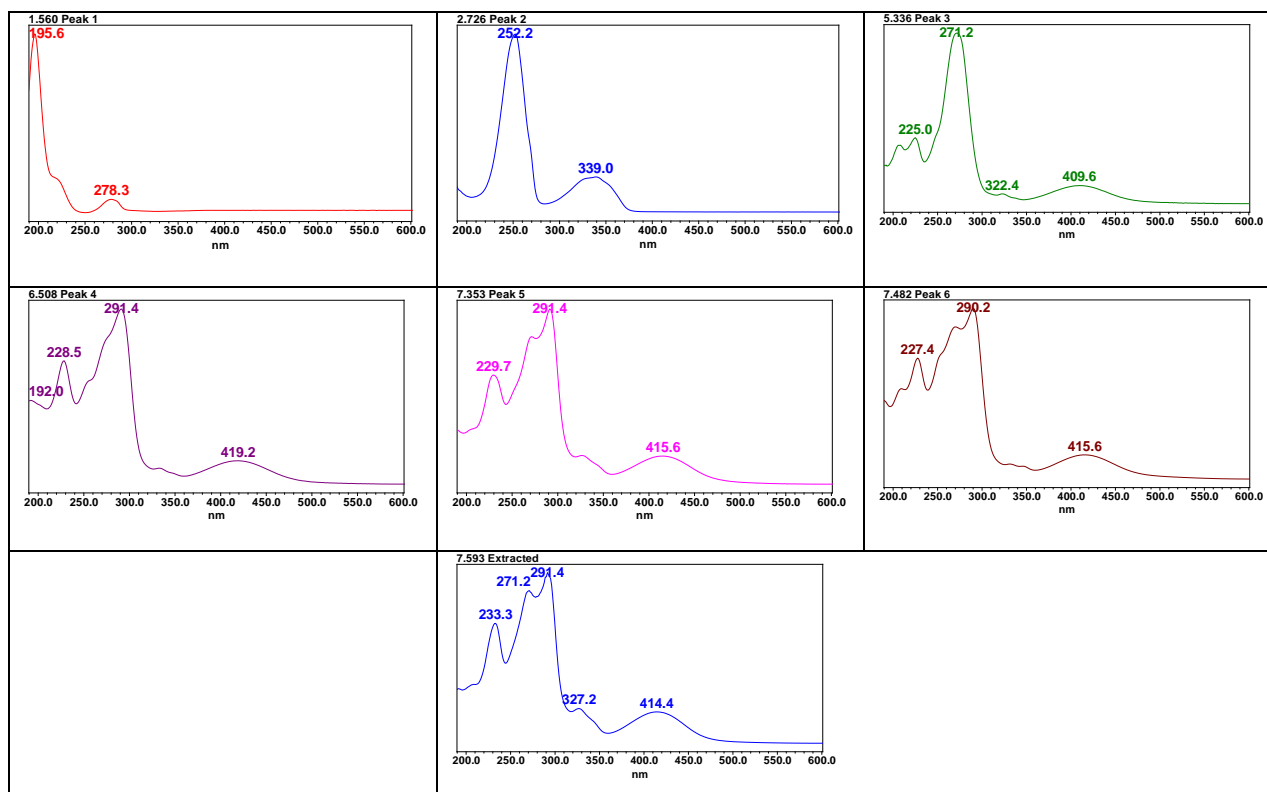
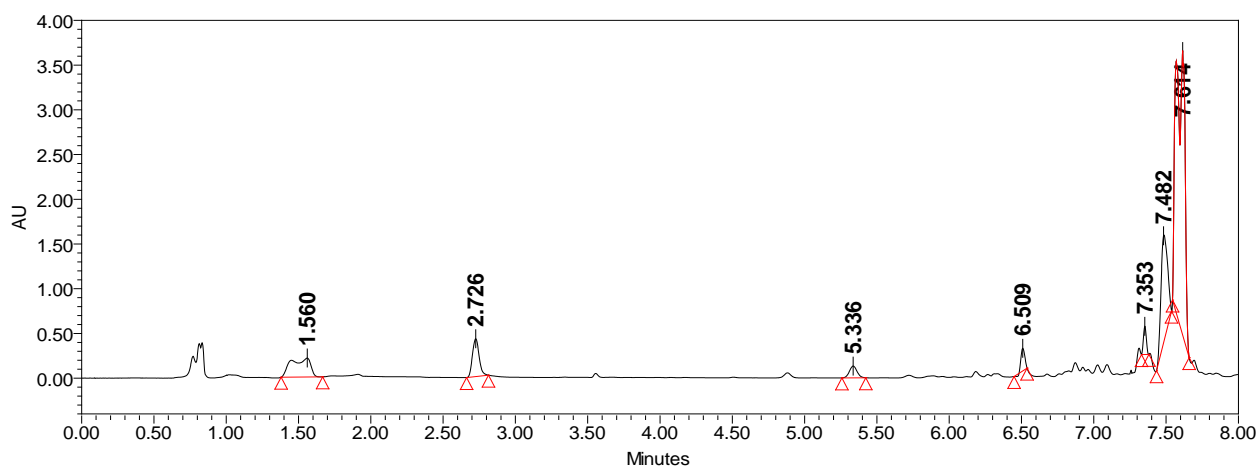


Рисунок 13 – ВЭЖХ-УФ хроматограмма экстракта из культуральной жидкости *M. robertsii* An1

В экстракте из культуральной жидкости соединение с временем удерживания $t_R = 5,33$ мин является деструксином E, поскольку имеет сходное

время удерживания и характерный для этого деструксина максимум поглощения в УФ-спектре при λ 271,2 нм. Также другое мажорное вещество в экстракте из культуральной жидкости с $t_R = 7,48$ мин и УФ-спектром с максимумом поглощения при λ макс = 290,2 нм является деструксином А (рисунок 13). Данные деструксины, относящиеся к циклическим депсипептидам, обнаруживаются у различных штаммов *Metarhizium* и обладают выраженными инсектицидными, антибиотическими и цитотоксическими свойствами [174-176].

Анализ метаболитных профилей экстрактов показал, что помимо деструксинов штамм образует желтые пигменты, которые не относятся к ауровертинам. Эти пигменты, судя по УФ-спектрам и времени удерживания, вероятнее всего принадлежат группе гидроксидантрахинонов [177, 178].

Полученные данные согласуются с предыдущими исследованиями. Так, в работах ряда авторов сообщается о высоком уровне антагонистической активности экстрактов, полученных из культур различных видов *Metarhizium*. Экстрагированные метаболиты характеризовались антифунгальными свойствами в отношении фитопатогенных грибов *Verticillium dahliae*, *Phytophthora megasperma*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia clavata*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* [179-182]. В отличие от предыдущих исследований в настоящей работе изучена не только антимикробная активность летучих и нелетучих метаболитов *M. robertsii* An1, но и показан еще один механизм антагонистического действия штамма – синтез гидролитических ферментов.

Таким образом, в результате исследований продемонстрирована способность штаммов микромицетов подавлять рост и развитие фитопатогенных грибов. Выявлена комплексная природа антагонизма штамма *M. robertsii* An1. Продуцирование внеклеточных гидролитических ферментов (хитиназы, глюканазы) и синтез нелетучих растворимых соединений с антимикробной активностью (преимущественно деструксинов) являются наиболее значимыми механизмами антагонистического действия данного штамма. Также определенную роль в проявлении антагонизма выполняют выделяемые ЛОС с антифунгальными свойствами.

3.2.5 Исследование механизмов устойчивости микромицетов к тяжелым металлам

Загрязнение почв сельскохозяйственного назначения ТМ является значительным абиотическим стрессовым фактором, оказывающим негативное воздействие на рост, развитие и урожайность агрокультур. Одним из перспективных и эффективных способов регуляции поступления ТМ в растения из загрязненных почв и стимулирования их роста является применение штаммов микромицетов, устойчивых к ТМ [80, с. 231; 95, с. 10].

В связи с этим на данной стадии исследований была поставлена задача изучить основные механизмы толерантности микромицетов к ТМ и выявить наиболее перспективные штаммы для защиты растений при росте на загрязненных почвах.

В результате скрининга штаммов, устойчивых к ТМ, на предыдущем этапе работы для дальнейших исследований выбрано 14 культур микромицетов, обладающих высоким ИТ (> 0,45) ко всем трем исследуемым металлам (таблица 19). ИТ варьировал в зависимости от штамма и ТМ в пределах от 0,45 до 0,98. Ряд штаммов (*Trichoderma* sp. ED7, *Fusarium* sp. MR12, *Aspergillus* sp. EF19) практически в равной степени демонстрировали устойчивость ко всем исследуемым ТМ. У некоторых штаммов выявлена ярко выраженная вариабельность ИТ в зависимости от вида металла. Так, например, мицелиальные грибы *Metarhizium* An1 и *Aspergillus* sp. D7 проявили наибольшую устойчивость по отношению к цинку, *Penicillium* sp. C4 – к свинцу, дрожжевой штамм *M. pulcherrima* MP2 – к кадмию (таблица 19).

Таблица 19 – Устойчивость штаммов микромицетов к тяжелым металлам

Штамм	Индекс толерантности		
	Кадмий	Свинец	Цинк
<i>B. bassiana</i> T7	0,91 ± 0,04 d	0,77 ± 0,03 d	0,85 ± 0,04 d
<i>B. bassiana</i> T15	0,98 ± 0,03 d	0,72 ± 0,032 d	0,81 ± 0,03 d
<i>Trichoderma</i> sp. ED7	0,54 ± 0,02 b	0,50 ± 0,012 b	0,48 ± 0,01 a
<i>M. robertsii</i> An1	0,45 ± 0,031 a	0,55 ± 0,018b	0,95 ± 0,039 e
<i>Fusarium</i> sp. MR12	0,54 ± 0,01 b	0,58 ± 0,02 bc	0,62 ± 0,02 b
<i>Penicillium</i> sp. B12	0,68 ± 0,025 c	0,46 ± 0,01 a	0,55 ± 0,024 a
<i>Penicillium</i> sp. C4	0,58 ± 0,02 b	0,87 ± 0,03 e	0,51 ± 0,022 a
<i>Aspergillus</i> sp. D7	0,46 ± 0,015 a	0,63 ± 0,027 c	0,85 ± 0,03 d
<i>Aspergillus</i> sp. EF19	0,58 ± 0,03 b	0,55 ± 0,02 b	0,49 ± 0,01 a
<i>Cladosporium</i> sp. F4	0,55 ± 0,019 b	0,75 ± 0,03 d	0,88 ± 0,04 d
<i>Rh. mucilaginosa</i> MK1	0,88 ± 0,044 d	0,70 ± 0,04 d	0,75 ± 0,031 cd
<i>Rh. mucilaginosa</i> RH2	0,88 ± 0,03 d	0,75 ± 0,03 d	0,68 ± 0,02 c
<i>M. pulcherrima</i> MP1	0,75 ± 0,02 c	0,51 ± 0,01 b	0,69 ± 0,009 c
<i>M. pulcherrima</i> MP2	0,90 ± 0,03 d	0,69 ± 0,03 cd	0,71 ± 0,02 c

Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$

Почва, используемая в исследовании, характеризовалась повышенным содержанием кадмия, концентрация которого значительно превышала ПДК. Содержание других ТМ было в пределах допустимых концентраций (таблица 2). В связи с этим последующее детальное изучение устойчивости штаммов к ТМ проводили только применительно к кадмию.

Были отобраны 2 штамма мицелиальных грибов и 3 штамма дрожжей, которые обладали наибольшей устойчивостью (ИТ $\geq 0,88$) по отношению к кадмию (таблица 19). Штамм *B. bassiana* T15 продемонстрировал максимальную устойчивость к кадмию: МИК достигала 2400 мкг/мл. Для остальных штаммов МИК была также достаточно высокой и колебалась в диапазоне от 300 до 1450 мкг/мл (рисунок 14) [140, с. 4]. Полученные значения были аналогичными или

значительно превышали МИК кадмия для почвенных и эндофитных грибов, сообщаемых в исследованиях других авторов [84, 86, 88-91].

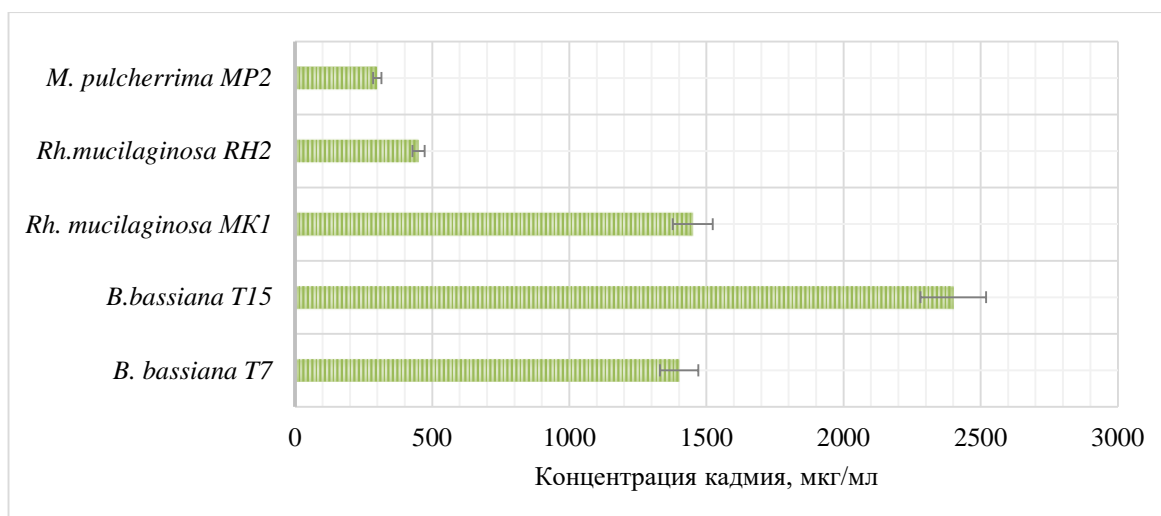


Рисунок 14 – Минимальная ингибирующая концентрация кадмия для штаммов микромицетов

Изменение функционирования микроорганизмов при абиотическом стрессе, вызванном воздействием ТМ, приводит к появлению морфологических изменений их формы и размеров, которые зачастую связаны с разобщением процессов роста и деления [183, с. 10].

При добавлении в среду Cd в количестве 100 мкг/мл отмечалось снижение скорости роста микромицетов, кроме того начинали происходить изменения их макро- и микроморфологии. При повышении концентрации Cd изменения внешнего вида колоний становились более выраженными, также происходила длительная задержка роста культур (рисунок 15) [140, с. 4-5]. Торможение роста является наиболее общим проявлением токсичного действия ТМ на микроорганизмы, что связано, в первую очередь, с их прямым влиянием на процессы деления клеток [183, с. 10; 184].

Колонии мицелиальных грибов в присутствии Cd становились более плотными, имели выраженный субстратный мицелий, врастающий в агар, что приводило к его растрескиванию. Изменений окраски не выявлено, отмечено появление капель экссудата (рисунок 16). При микроскопировании отмечено утолщение гиф мицелия и снижение споруляции [140, с. 4-5].



Рисунок 15 – Колонии штаммов микромицетов на 10-е сутки на средах с различным содержанием кадмия

Колонии дрожжей под влиянием Cd становились бугристыми, теряли блеск, наблюдалось их значительное обесцвечивание и уменьшение размера (рисунок 15) [140, с. 4-5]. Кроме того, изменения отмечены и в микроморфологии дрожжей: происходило увеличение и удлинение клеток, наблюдалось утолщение клеточной стенки, обнаруживались темные внутриклеточные включения (рисунок 16). Известно, что при увеличении концентрации ионов ТМ снижается отношение площади поверхности к объёму, в результате чего клетки становятся более вытянутыми. Такие изменения играют важную роль в уменьшении токсического действия ТМ вследствие сокращения открытой поверхности клетки для прикрепления поллютанта [185].

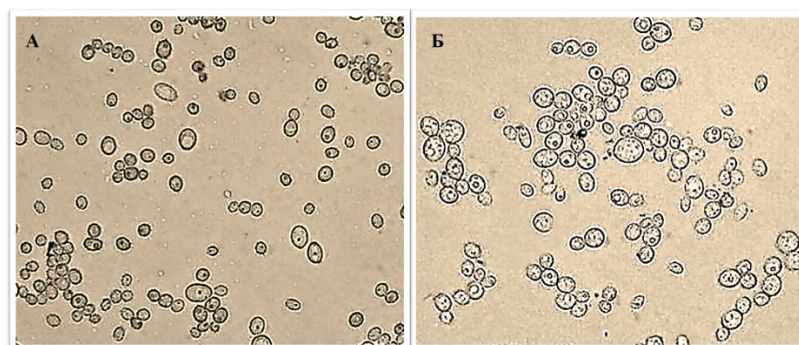


Рисунок 16 – Клетки *Rh. mucilaginosa* MK1 на среде без Cd (А) и с добавлением Cd (Б) (ув. 400)

Аналогичные изменения были характерны для различных дрожжевых [91, 92] и грибных [84, 186] штаммов. Известно, что в присутствии ТМ замедляется рост и развитие микроорганизмов, происходят многочисленные структурно-функциональные изменения, нарушаются метаболические процессы [80, с. 233; 183, с. 9-13].

Микромицеты выработали несколько механизмов, обеспечивающих их устойчивость к действию повышенных концентраций ТМ: предотвращение поступления ионов металлов в клетки путем осаждения и/или комплексообразования вне клетки; иммобилизация на поверхности клеточной стенки; компартментализация и хелатирование с органическими лигандами внутри клеток [80, с. 236-237; 95, с. 10-11; 96, с. 9].

На следующем этапе работы была изучена способность микромицетов снижать концентрацию ионов кадмия в жидкой среде. Выявлено, что исследуемые штаммы в различной степени поглощали кадмий из жидкой питательной среды в условиях глубинного культивирования. Максимальная степень извлечения кадмия из среды выявлена у мицелиального гриба *B. bassiana* T7 – 59 %, сорбционная емкость данного штамма составила $11,1 \pm 0,5$ мг Cd/г биомассы. Среди дрожжей наивысшие значения данных показателей отмечены для *Rh. mucilaginosa* МК1 (таблица 20). Вариации в степени поглощения кадмия штаммами могут быть связаны с различающимися размерами клеток, особенностями клеточной поверхности, а также отличиями в механизмах, вовлекаемых в процесс извлечения данного ТМ [140, с. 4].

Способность исследуемых штаммов к поглощению кадмия была аналогичной или выше по сравнению с другими грибными изолятами, известными в ранее проведенных исследованиях [84-86], что подтверждает эффективность отобранных культур. Штамм мицелиального гриба *B. bassiana* T7 запатентован в качестве штамма, обладающего устойчивостью к ТМ [187].

Таблица 20 – Способность штаммов к поглощению кадмия

Штамм	Степень извлечения кадмия из среды, %	Сорбционная емкость, мг/г	Биосорбция на поверхности клеток, %	Внутриклеточная аккумуляция, %
<i>B. bassiana</i> T7	59 ± 4 с	$11,9 \pm 0,5$ d	22 ± 1 a	78 ± 5 с
<i>B. bassiana</i> T15	37 ± 1 a	$8,3 \pm 0,1$ b	79 ± 5 с	21 ± 2 a
<i>Rh. mucilaginosa</i> МК1	49 ± 3 b	$10,2 \pm 0,3$ с	38 ± 3 b	62 ± 3 b
<i>Rh. mucilaginosa</i> RH2	38 ± 2 a	$8,9 \pm 0,4$ b	33 ± 2 b	67 ± 4 b
<i>M. pulcherrima</i> MP2	39 ± 1 a	$6,0 \pm 0,3$ a	19 ± 1 a	81 ± 5 с
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$				

Механизмы биосорбции металлов микромицетами могут быть классифицированы в зависимости от местоположения на внеклеточные,

внутриклеточные и процессы, происходящие на поверхности клеток [183, с. 6]. Исследование локализации аккумулированного кадмия выявило, что штаммы преимущественно накапливали его внутриклеточно (62-81%), в то время как доля кадмия, связанного с клеточной поверхностью, была значительно ниже (19-38%). Исключением являлся штамм *B. bassiana* T15, который в большей степени сорбировал кадмий на внешней поверхности мицелия (таблица 20) [140, с.4]. Возможно, это связано с различной скоростью процессов, обеспечивающих проникновение ионов кадмия внутрь клеток, у исследуемых культур. Так, известно, что аккумуляция кадмия осуществляется в две фазы: начальная быстрая биосорбция на поверхности клеток и последующее более медленное энергозависимое внутриклеточное накопление [94; 124].

Таким образом, отобрано 5 штаммов микромицетов, обладающих высоким уровнем толерантности к действию кадмия. Выявлены основные механизмы, вовлекаемые в процесс взаимодействия штаммов с ионами данного ТМ:

- для штамма *B. bassiana* T15 преобладающим механизмом является биосорбция на поверхности клетки;
- для остальных штаммов ключевым механизмом является внутриклеточная аккумуляция кадмия.

3.2.6 Продуцирование микромицетами АЦК-дезаминазы как один из механизмов защиты растений в условиях стресса

В стрессовых условиях в растительных тканях активируется биосинтез этилена - сигнального вещества, запускающего каскад неспецифических стрессовых реакций, ведущих к ингибированию физиологических и ростовых процессов в растении. Одним из механизмов положительного действия на растения в нормальных и, в особенности, стрессовых условиях является синтез некоторыми микроорганизмами фермента АЦК-дезаминазы, который гидролизует аминокислоту АЦК, являющуюся предшественником этилена, до α -кетобутирата (α -КБ) и аммония. Благодаря АЦК-дезаминазе содержание этилена в растительных тканях снижается и, как следствие, растения могут лучше противостоять стрессу [99; 188, с. 643].

Активность АЦК-дезаминазы у микромицетов является одним из ключевых факторов, который облегчает рост и способствует стрессоустойчивости растений в неблагоприятных условиях. В связи с этим важным этапом работы было обнаружение способности исследуемых штаммов синтезировать АЦК-дезаминазу.

Среди микромицетов, обладающих антагонистической активностью и устойчивостью к ТМ, 4 штамма продемонстрировали способность расти на среде, содержащей аминокислоту АЦК в качестве единственного источника азота, что свидетельствует о синтезе фермента АЦК-дезаминазы данными культурами (рисунок 17).

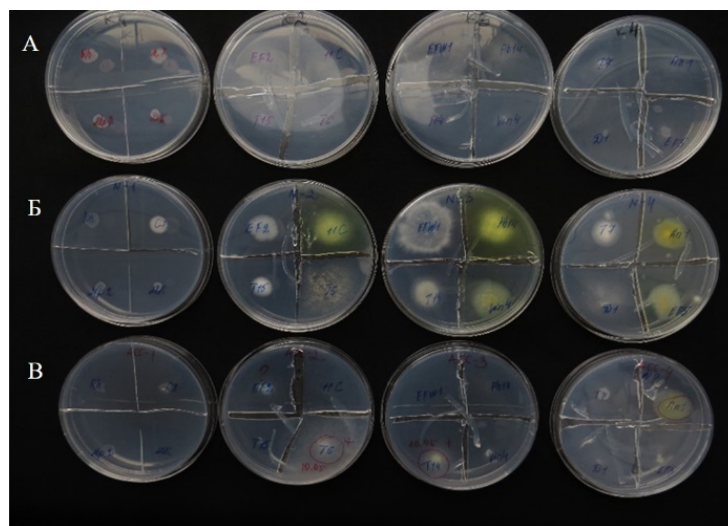


Рисунок 17 – Выявление АЦК-утилизирующих штаммов микромицетов (А – среда без источника азота, Б – среда с NH_4NO_3 , В – среда с АЦК)

При количественной оценке активности АЦК-деаминазы в жидкой культуре выявлено, что данный показатель варьировал от 0,95 до 2,73 μM α -КБ/мг белка/ч. Максимальная активность данного фермента была характерна для штаммов мицелиальных грибов *M. robertsii* An1 и *T. pinophilus* T14. Достаточно высокий уровень активности также отмечен у *B. bassiana* T7 (рисунок 18).

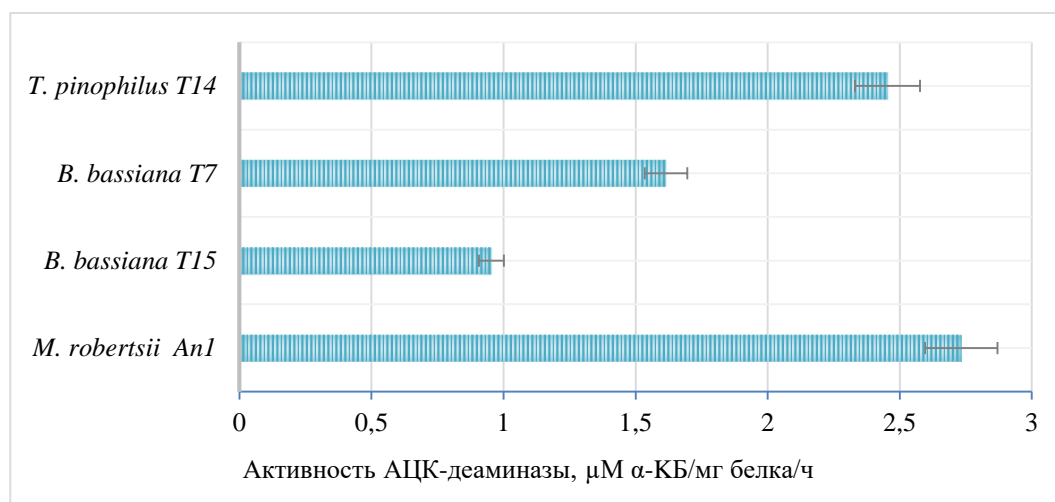


Рисунок 18 – Активность фермента АЦК-деаминазы у штаммов микромицетов

Для подтверждения способности АЦК-утилизирующих штаммов микромицетов оказывать ростстимулирующее и антистрессовое воздействие на растения проведены модельные вегетационные эксперименты при выращивании растений в стрессовых условиях, обусловленных биотическими и абиотическими факторами. Условия стресса для растений моделировали путем повышения инфекционного фона (внесение в почву суспензии фитопатогенного гриба *F. graminearum* с титром 10^9 спор/мл), а также загрязнением почвы ТМ (внесение раствора соли кадмия в концентрации 25 мг/кг почвы).

При росте ячменя на зараженной почве значения всех исследуемых ростовых показателей снизились на 20-32%. Инокуляция культурами АЦК-утилизирующих микромицетов, обладающими антагонистической активностью, обеспечила более интенсивное развитие растений в условиях биотического стресса. В инокулированных вариантах у ячменя развивалась более мощная и длинная корневая система. Кроме того, обработанные растения были выше контрольных при фитопатогенной нагрузке. В частности, длина стебля и корня увеличилась на 14-25% и 13-19%, биомасса надземной и подземной частей превышала неинокулированный вариант на 11-12% и 12-14%, соответственно. Инокулированные растения, выросшие на зараженной почве, по ростовым параметрам приближались к растениям, выросшим в нормальных условиях без воздействия стресс-фактора (таблица 21).

Таблица 21 – Влияние инокуляции АЦК-утилизирующими штаммами микромицетов на ростовые параметры ячменя в условиях фитопатогенной нагрузки (*F. graminearum*)

Вариант обработки	Длина стебля, см	Длина корня, см	Сухая масса побега, г	Сухая масса корня, г
Стерильная почва				
Без инокуляции	17,1 ± 0,5 d	7,9 ± 0,2 c	0,045 ± 0,0021 c	0,019 ± 0,0014 c
Повышенный инфекционный фон почвы				
Без инокуляции	13,1 ± 0,52 a	6,3 ± 0,05 a	0,035 ± 0,0022 a	0,013 ± 0,0014 a
<i>M. robertsii</i> An1	16,5 ± 0,5 cd	7,5 ± 0,3 bc	0,042 ± 0,002 bc	0,018 ± 0,0009 bc
<i>B. bassiana</i> T15	14,9 ± 0,3 b	7,1 ± 0,2 b	0,039 ± 0,001 b	0,016 ± 0,0012 b
<i>B. bassiana</i> T7	15,9 ± 0,4 c	7,3 ± 0,22 b	0,041 ± 0,0012 b	0,018 ± 0,0013 bc
<i>T. pinophilus</i> T14	15,2 ± 0,2 b	7,1 ± 0,14 b	0,039 ± 0,0013 b	0,016 ± 0,0011 b
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$				

Количество фотосинтетических пигментов в листьях является косвенным показателем стрессоустойчивости культуры [189, с. 3; 190], поскольку данный показатель изменяется при адаптации растений к условиям среды, в том числе под влиянием различных стрессовых факторов, т. е. отражает реакцию растения на условия произрастания [191]. Важное значение имеет соотношение хлорофиллов *a/b*, которое обеспечивает стабильность фотосинтетической системы, снижение данного показателя и уменьшение общего содержания хлорофилла свидетельствуют о нарушении фотосинтетической деятельности растений [192].

В условиях биотического стресса, вызванного фитопатогеном *F. graminearum*, содержание общего хлорофилла в листьях ячменя снизилось на 22% по сравнению с данным показателем у растений, выросших в нормальных условиях, и составило $1,88 \pm 0,06$ мг/г (таблица 22). Кроме того, в условиях фитопатогенной нагрузки наблюдалось снижение соотношения хлорофилла *a/b*, что свидетельствует об изменениях в пигмент-белковых комплексах светособирающих антенн и реакционных центров обеих фотосистем. Применение АЦК-утилизирующих штаммов оказало стимулирующий эффект на

фотосинтетическую деятельность ячменя при выращивании в почве с повышенным инфекционным фоном. Положительное действие микромицетов выразилось в увеличении содержания Хл *a* в листьях на 11-21%, Хл *b* – на 9-13%, а также суммарного содержания Хл (*a+b*) на 19-18%. Максимальный эффект достигнут в варианте со штаммом *M. robertsii* An1 (таблица 22).

В ответ на действие стрессовых факторов в растении происходит активация защитной системы. Повышение содержания пролина является одной из характерных реакций растений в ответ на различные виды стресса, включая биотический, что обеспечивает первую стадию адаптации растений [193, 194]. Более высокий уровень пролина в листьях ячменя отмечен при выращивании растений в почве с повышенным инфекционным фоном по сравнению с необработанными растениями в стерильной почве. В неинокулированном варианте при стрессовых условиях концентрация пролина превышала данный показатель у растений, выросших в благоприятных условиях, в 1,9 раза и составила 2,44 мкмоль/г сырой массы. В растениях, обработанных АЦК-утилизирующими микромицетами, содержание иминокислоты пролин варьировало в диапазоне от 1,65 до 1,96 мкмоль/г сырой массы в зависимости от штамма (таблица 22). Полученные результаты дают основание предположить, что микромицеты значительно снижают уровень стресса, вызванного фитопатогенной нагрузкой.

Таблица 22 – Влияние инокуляции АЦК-утилизирующими штаммами микромицетов на физиологические параметры ячменя в условиях фитопатогенной нагрузки

Вариант обработки	Хл <i>a</i> , мг/г	Хл <i>b</i> , мг/г	Хл (<i>a+b</i>), мг/г	Хл <i>a/b</i>	Пролин, мкмоль/г
Стерильная почва					
Без инокуляции	1,76 ± 0,05 d	0,64 ± 0,02 b	2,4 ± 0,08 d	2,75 ± 0,1 c	1,28 ± 0,045 a
Повышенный инфекционный фон почвы					
Без инокуляции	1,33 ± 0,05 a	0,55 ± 0,01 a	1,88 ± 0,06 a	2,42 ± 0,05 a	2,44 ± 0,08 d
<i>M. robertsii</i> An1	1,61 ± 0,07 c	0,6 ± 0,023 b	2,21 ± 0,08 c	2,68 ± 0,1 b	1,65 ± 0,07 b
<i>B. bassiana</i> T15	1,55 ± 0,049 bc	0,62 ± 0,024 b	2,17 ± 0,1 bc	2,5 ± 0,05 a	1,88 ± 0,06 c
<i>B. bassiana</i> T7	1,58 ± 0,06 c	0,61 ± 0,021 b	2,19 ± 0,05 bc	2,59 ± 0,1 b	1,96 ± 0,08 c
<i>T. pinophilus</i> T14	1,48 ± 0,03 b	0,56 ± 0,012 a	2,04 ± 0,04 b	2,64 ± 0,08 b	1,72 ± 0,052 b
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$					

При выращивании на загрязненной кадмием почве отзывчивость ячменя на обработку АЦК-утилизирующими штаммами микромицетов, обладающими устойчивостью к ТМ, проявилась в повышении морфометрических (таблица 23) и физиологических (таблица 24) показателей растений. В частности, отмечено увеличение длины стебля на 8-13%, длины корня на 13-17%, биомассы побега и корня на 11% по сравнению с неинокулированным контролем (таблица 23).

Таблица 23 – Влияние инокуляции ячменя АЦК-утилизирующими штаммами микромицетов на ростовые параметры ячменя в условиях загрязнения кадмием

Вариант обработки	Длина стебля, см	Длина корня, см	Сухая масса побега, г/раст.	Сухая масса корня, г/раст.
Почва без кадмия				
Без инокуляции	17,1 ± 0,48 с	7,9 ± 0,18 с	0,045 ± 0,002 с	0,019 ± 0,0012 с
Почва, загрязненная кадмием				
Без инокуляции	14,1 ± 0,5 а	6,3 ± 0,2 а	0,038 ± 0,0012 а	0,015 ± 0,0005 а
<i>B. bassiana</i> T15	15,2 ± 0,3 b	7,1 ± 0,4 b	0,041 ± 0,0011 b	0,017 ± 0,001 b
<i>B. bassiana</i> T7	15,9 ± 0,5 b	7,4 ± 0,3 bc	0,042 ± 0,0013 bc	0,017 ± 0,0012 b
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$				

При выращивании ячменя в почве, загрязненной солями кадмия в концентрации 25 мг/кг, отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение содержания Хл *a* и суммарного Хл (*a+b*) в листьях в неинокулированном варианте по сравнению с контрольными растениями, выращенными в условиях без кадмия (таблица 24). Понижение содержание хлорофилла в листьях в условиях загрязнения кадмием может быть обусловлено вытеснением ионами Cd^{2+} ионов Mg^{2+} из молекулы пигмента, а также его влиянием на активность ферментов, участвующих в биосинтезе хлорофилла. В частности, кадмий ингибирует протохлорофиллид редуктазу и дегидратазу δ -аминолевулиновой кислоты [195, 196]. Также известно, что кадмий нарушает транспорт электронов, связанный с функционированием фотосистемы II, что может быть обусловлено изменениями мембранных структур тилакоидов, снижением активности ферредоксин-НАДФ⁺ оксидоредуктазы и нарушением биосинтеза пластохинона [80, с. 232]. В проведенных экспериментах в условиях стресса не наблюдалось изменений количества Хл *b*, однако отмечено значительное уменьшение содержания Хл *a* (таблица 24), тесно связанного с реакционными центрами обеих фотосистем, что свидетельствует о его меньшей стабильности по сравнению с Хл *b*. Интродукция в почву, загрязненную кадмием, АЦК-утилизирующих штаммов *B. bassiana* T15 и *B. bassiana* T7 вызвала повышение содержание Хл *a* в листьях на 10 и 15%, суммарного Хл (*a+b*) на 9 и 10%, соответственно (таблица 24).

Уровень пролина в инокулированных вариантах был выше, чем в растениях без инокуляции при благоприятных условиях (1,28 мкмоль/г сырой массы), но ниже, чем в стресс-индуцированном контроле (4,31 мкмоль/г) (таблица 24). Полученные результаты свидетельствуют об ослаблении стресса, испытываемого растениями, благодаря обработке штаммами микромицетов.

Проведенные исследования выявили положительное влияние исследуемых штаммов на интегральные показатели ростовых и физиологических процессов растений ячменя (таблицы 21-24), что свидетельствует о повышении устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды в результате инокуляции АЦК-утилизирующими штаммами микромицетов.

Таблица 24 - Влияние инокуляции ячменя АЦК-утилизирующими штаммами на физиологические параметры ячменя в условиях загрязнения кадмием

Вариант обработки	Хл <i>a</i> , мг/г	Хл <i>b</i> , мг/г	Хл (<i>a+b</i>), мг/г	Хл <i>a/b</i>	Пролин, мкмоль/г
Почва без кадмия					
Без инокуляции	1,76 ± 0,05 с	0,64 ± 0,02 а	2,4 ± 0,05 с	2,75 ± 0,1 d	1,28 ± 0,048 а
Почва, загрязненная кадмием					
Без инокуляции	1,43 ± 0,06 а	0,65 ± 0,022 а	2,08 ± 0,053 а	2,2 ± 0,01 а	4,31 ± 0,1 d
<i>B. bassiana</i> T15	1,57 ± 0,04 b	0,69 ± 0,011 а	2,26 ± 0,039 b	2,27 ± 0,03 b	2,25 ± 0,03 b
<i>B. bassiana</i> T7	1,64 ± 0,07 b	0,66 ± 0,017 а	2,3 ± 0,05 bc	2,48 ± 0,023 c	2,5 8 ± 0,05 с
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же столбце указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$					

Положительная роль АЦК-гидролизующих бактерий на процессы роста, развития и устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам подтверждена многими исследователями [188; 197-200]. Однако информация о СРРМ, содержащих АЦК-деаминазу, ограничена. В данной работе впервые продемонстрирована способность к синтезу данного фермента мицелиальными грибами видов *B. bassiana*, *M. robertsii* и *T. pinophilus*.

Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что одним из механизмов, вовлеченных в защиту растений от неблагоприятных факторов окружающей среды является способность микромицетов синтезировать фермент АЦК-деаминазу. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения АЦК-утилизирующих штаммов микромицетов для повышения адаптации растений и улучшения их роста при воздействии стрессовых факторов как биотической, так и абиотической природы

3.3 Идентификация и депонирование отобранных штаммов

В результате детального исследования агрономически ценных свойств и механизмов положительного действия микромицетов на растения были отобраны 7 штаммов, которые обладали несколькими ярко выраженными характеристиками (таблица 25).

Таблица 25 - Характеристика отобранных штаммов, перспективных для улучшения роста и защиты агрокультур

Штамм	Синтез фитогормонов и сигнальных молекул	Фосфат-мобилизация (органический и неорганический P)	АЦК-деаминазная активность	Антагонистическая активность (<i>F. graminearum</i> , <i>P. infestans</i> и <i>A. alternata</i>)	Устойчивость к ионам ТМ (Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺)
<i>Aspergillus</i> sp. D1	+	+		+	
<i>B. bassiana</i> T7			+	+	+
<i>B. bassiana</i> T15	+		+	+	+
<i>M. robertsii</i> An1			+	+	+
<i>M. pulcherrima</i> MP2	+			+	+
<i>P. bilaiae</i> Pb14	+	+			
<i>T. pinophilus</i> T14	+	+	+	+	

Для уточнения результатов предварительной культурально-морфологической идентификации отобранных штаммов микромицетов был проведен молекулярно-генетический анализ последовательностей ITS, включающих межгенные транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 и ген 5,8S рибосомальной РНК.

Таблица 26 – Гомология ITS-последовательностей исследуемых штаммов и типовых штаммов наиболее близкородственных видов микромицетов

Исследуемый штамм	Типовой штамм	Уровень гомологии, %	Протяженность выравнивания, %
<i>Aspergillus</i> sp. D1	<i>Aspergillus foetidus</i> CBS 121.28	100	98
	<i>Aspergillus welwitschae</i> CBS 139.54	100	98
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	100	98
<i>Beauveria bassiana</i> T7	<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 1564	98,91	97
	<i>Beauveria varroae</i> ARSEF 8257	97,84	99
<i>Beauveria bassiana</i> T15	<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 1564	99,82	97
	<i>Beauveria varroae</i> ARSEF 8257	97,67	99
<i>Metarhizium robertsii</i> An1	<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 2575	100	100
	<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 7487	99,36	100
	<i>Metarhizium guizhouense</i> CBS 258.90	99,36	100
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MP2	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> NRRL Y-7111	97,82	100
	<i>Metschnikowia ziziphicola</i> CBS 10358	97,82	100
	<i>Metschnikowia sinensis</i> CBS 10357	95,34	100
	<i>Metschnikowia sinensis</i> CBS 10359	95,34	100
<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	<i>Penicillium bilaiae</i> NRRL 3391	99,82	94
	<i>Penicillium jugoslavicum</i> CBS 192.87	95,86	95
	<i>Penicillium amaliae</i> CBS 134209	95,27	91
<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	<i>Talaromyces pinophilus</i> CBS 631.66	100	95
	<i>Talaromyces galapagensis</i> CBS 751.74	98,65	81
	<i>Talaromyces intermedius</i> CBS 152.65	98,42	81

Штамм *Aspergillus* sp. D1 образовывал кластер с высоким уровнем поддержки (94%) с тремя типовыми штаммами *A. foetidus* CBS 121.28, *A. welwitschae* CBS 139.54 и *A. niger* ATCC 16888 (рисунок 19). Сходство исследуемого штамма D1 со всеми тремя типовыми штаммами составило 100% (таблица 26). Вследствие отсутствия расхождений между штаммом D1 и различными видами типовых штаммов затруднительно идентифицировать этот штамм на уровне вида с помощью секвенирования ITS-области. Поэтому штамм D1 идентифицирован на уровне рода и обозначен как *Aspergillus* sp. D1.

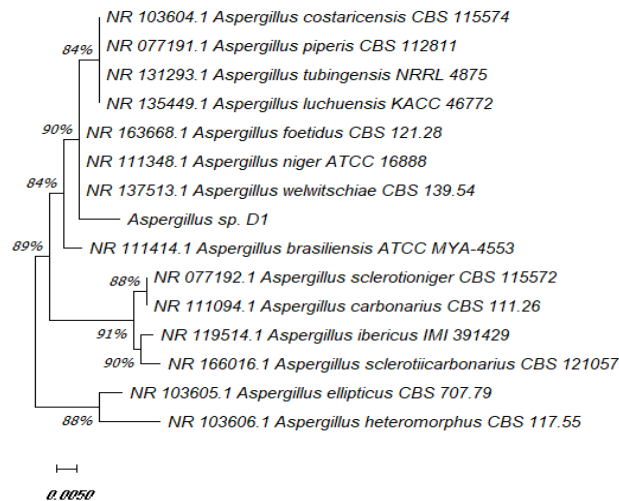


Рисунок 19 – Филогенетическое дерево штамма *Aspergillus* sp. D1 и типовых штаммов близкородственных видов

Штаммы мицелиальных грибов *Beauveria bassiana* T7 и *Beauveria bassiana* T15 группировались в отдельный кластер с типовым штаммом *Beauveria bassiana* ARSEF 1564 с уровнем поддержки 91% и 89%, соответственно. (рисунок 20). Максимальный уровень гомологии исследуемых грибов выявлен с этим же типовым штаммом (таблица 26). Полученные результаты позволили отнести штаммы T7 и T15 к виду *Beauveria bassiana*.

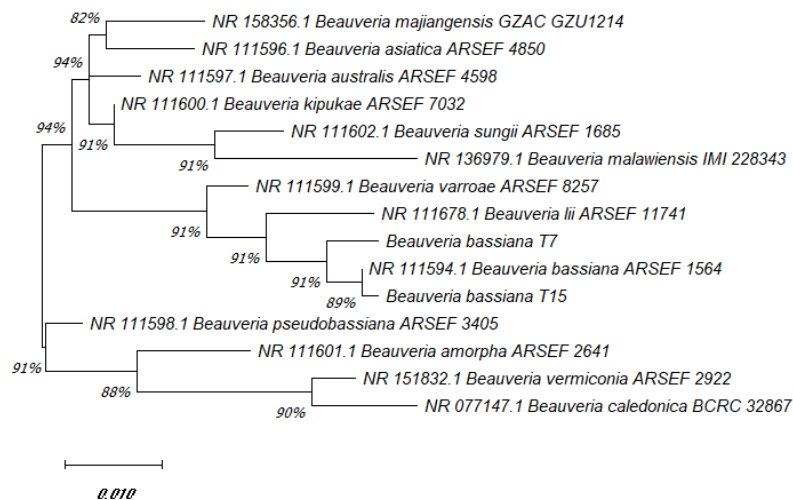


Рисунок 20 – Филогенетическое дерево штаммов *Beauveria bassiana* T7 и *Beauveria bassiana* T15 и типовых штаммов близкородственных видов

Штамм гриба *Metarhizium robertsii* An1 образовывал отдельный кластер с уровнем поддержки 75% с двумя типовыми штаммами *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 и *Metarhizium guizhouense* CBS 258.90 (рисунок 21) и имел с данными штаммами сходство по уровню гомологии 100% и 99,36%, соответственно (таблица 26). Учитывая полученные результаты молекулярно-

генетической и культурально-морфологической идентификации, данный штамм отнесен к виду *Metarhizium robertsii*.

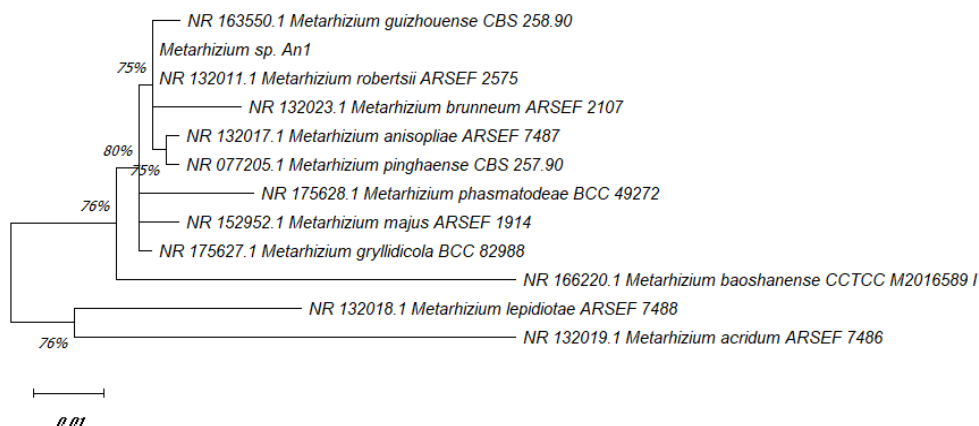


Рисунок 21 – Филогенетическое дерево штамма *Metarhizium robertsii* An1 и типовых штаммов близкородственных видов

На филогенетическом дереве дрожжевой штамм *M. pulcherrima* MP2 образовывал высоко поддерживаемый кластер с двумя типовыми штаммами *M. pulcherrima* NRRL Y-7111 и *M. ziziphicola* CBS 10358 (рисунок 22). Сходство исследуемого штамма MP2 со данными двумя типовыми штаммами составило 97,82% (таблица 26). Вследствие отсутствия расхождений между исследуемым штаммом и наиболее близкими видами типовых штаммов затруднительно идентифицировать этот штамм на уровне вида с помощью секвенирования ITS-области. Однако при изучении культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик данный штамм был отнесен к виду *Metschnikowia pulcherrima*. В связи с этим по совокупности всех признаков штамм идентифицирован как *M. pulcherrima*.

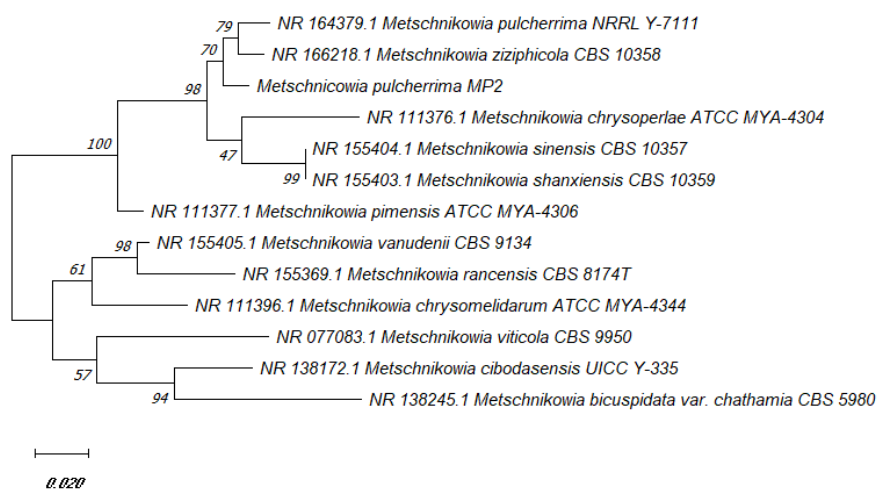


Рисунок 22 – Филогенетическое дерево штамма *Metschnikowia pulcherrima* MP2 и типовых штаммов близкородственных видов

На филогенетическом дереве, построенном на основании анализа последовательностей ITS-региона типовых штаммов, исследуемый штамм *P. bilaiae* Pb14 С11 группировался в один кластер с типовым штаммом *P. bilaiae* NRRL 3391 при уровне поддержки 99% (рисунок 23). Исследуемый штамм также был наиболее близок к данному типовому штамму - уровень гомологии составил 99,82% (таблица 26). Таким образом штамм был отнесен к виду *P. bilaiae*.

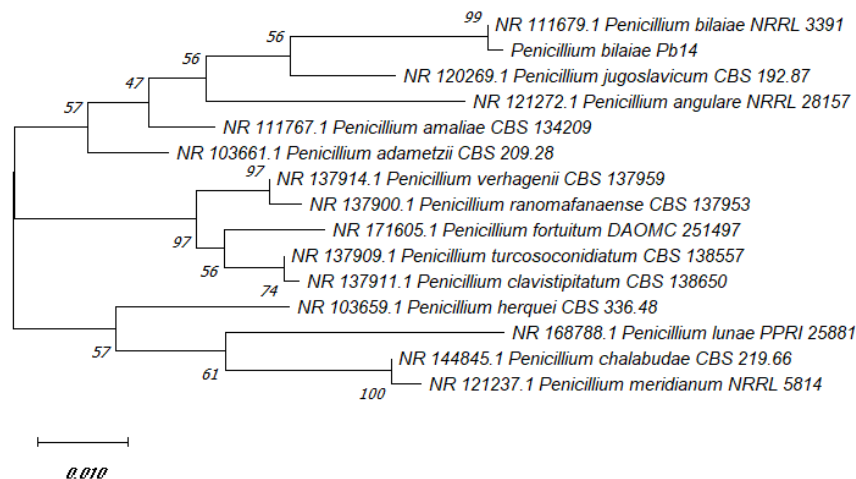


Рисунок 23 – Филогенетическое дерево штамма *Penicillium bilaiae* Pb14 и типовых штаммов близкородственных видов

Штамм *T. pinophilus* T14 образовывал высоко поддерживаемый кластер (96%) с типовым штаммом *T. pinophilus* CBS 631.66 (рисунок 24) со 100% сходством (таблица 26). Учитывая результаты культурально-морфологической и молекулярно-генетической идентификации, данный штамм был отнесен к виду *T. pinophilus*.

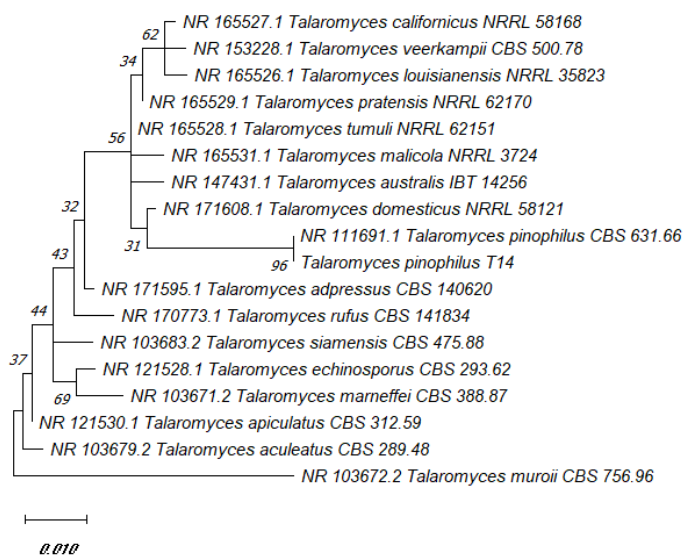


Рисунок 24 – Филогенетическое дерево штамма *Talaromyces pinophilus* T14 и типовых штаммов близкородственных видов

Анализ последовательностей ITS-областей штаммов подтвердил культурально-морфологическую идентификацию всех исследуемых микромицетов. Полученные последовательности были депонированы в базу данных NCBI GenBank под следующими номерами: [MT364485](#) (*Aspergillus* sp. D1), MG966197 (*Beauveria bassiana* T7), MG970260 (*Beauveria bassiana* T15), MG966451 (*Metschnikowia pulcherrima* MP2), [MT364469](#) (*Penicillium bilaiae* Pb14), [MT364484](#) (*Talaromyces pinophilus* T14). Детальная информация о данных последовательностях доступна в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Все отобранные штаммы депонированы в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» (РКМ) (г. Астана, Республика Казахстан) и/или в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) (г. Санкт-Петербург, Российская Федерация). Сведения о номерах депонирования представлены в таблице 27. Информация о депонированных штаммах доступна в базах данных РКМ (<http://www.rcm.kz/>) и ВКСМ (<http://www.arriam.spb.ru>).

Таблица 27 - Коллекционные номера депонированных штаммов

Штамм	Республиканская коллекция микроорганизмов (г. Астана, Республика Казахстан)	Ведомственная коллекция полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (г. Санкт-Петербург, Российская Федерация)
<i>Aspergillus</i> sp. D1	F-RKM-0976	RCAM04893
<i>Beauveria bassiana</i> T7	F-RKM-0779	RCAM04888
<i>Beauveria bassiana</i> T15	-	RCAM04889
<i>Metarhizium robertsii</i> An1	-	RCAM04892
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MP2	Y-RKM 0781	RCAM04887
<i>Penicillium bilaiae</i> Pb14	F-RKM-0614	RCAM04890
<i>Talaromyces pinophilus</i> T14	F-RKM-0979	-

Факт депонирования штаммов подтверждает известность сведений о них, а также обеспечивает их долгосрочное гарантированное сохранение. Следует отметить, что ВКСМ зарегистрирована в базе данных WDCM (World Data Centre of Microorganisms). Депонирование культур в депозитариях, входящих в перечень WDCM, является обязательным требованием при публикации статей в изданиях, индексируемых в Scopus, Web of science, SCImago и др. Эти сведения указывает на высокую важность и значимость данного этапа работы.

3.4 Применение штаммов микромицетов для улучшения роста сельскохозяйственных культур

В настоящее время убедительно подтверждено преимущество препаратов на основе композиций микроорганизмов по сравнению с монокультурами, поскольку биотехнологический потенциал микроорганизмов в таких препаратах проявляется более полно. Отмечен ряд преимуществ многокомпонентных препаратов: поливалентность действия, синергический эффект, повышение стабильности и приживаемости в разных агроклиматических условиях,

способность утилизировать неоднородные по составу субстраты; более полное использование функциональных возможностей микроорганизмов [201].

На предыдущих этапах работы были отобраны 7 штаммов, обладающие рядом положительных свойств: *Aspergillus* sp. D1, *B.bassiana* T7, *B.bassiana* T15, *M. robertsii* An1, *M. pulcherrima* MP2, *P. bilaiae* Pb14 и *T. pinophilus* T14 (таблица 25). Данные штаммы были использованы для составления композиций с последующей оценкой эффективности их применения для улучшения роста агрокультур.

3.4.1 Создание композиций на основе микромицетов и их метаболитов

Детальное исследование механизмов положительного действия штаммов на растения позволило получить важные сведения, необходимые для разработки наиболее эффективных вариантов применения микромицетов для улучшения роста и защиты сельскохозяйственных культур. Поскольку отобранные штаммы секретируют внеклеточные активные метаболиты (антимикробные вещества, ферменты, фитогормоны и сигнальные соединения), то целесообразным представляется применение фильтратов культуральных жидкостей штаммов, содержащих БАВ, для предпосевной обработки семян путем замачивания. В то же время для обеспечения растений доступными соединениями фосфора, их защиты от воздействия стрессовых факторов и стимулирования роста в процессе развития необходимо непосредственное присутствие самих штаммов, а не только их метаболитов. В связи с этим вторым эффективным вариантом композиции является суспензия, содержащая живые клетки дрожжей и споры мицелиальных грибов. Данная композиция на основе клеток и спор предназначена для непосредственной интродукции в почву.

При разработке композиции штаммов крайне важно учитывать возможность их сочетания. Поэтому первым этапом на данной стадии исследований была проверка отобранных штаммов на биосовместимость при их совместном культивировании на плотной питательной среде.

Было выявлено, что штаммы не подавляли рост и развитие друг друга за исключением слабо выраженного антагонизма мицелиального гриба *M. robertsii* An1 в отношении дрожжевого штамма *M. pulcherrima* MP2 (таблица 28). Выявленный антагонизм возможно обусловлен продуцированием штаммом *M. robertsii* An1 метаболитов, подавляющих рост *M. pulcherrima* MP2, а также может быть связан с более быстрой скоростью роста штамма *M. robertsii* An1, что дает ему преимущество в занятии места обитания и получении питательных веществ. Выявленная биосовместимость остальных исследуемых штаммов свидетельствует об отсутствии конкуренции и чувствительности к продуцируемым внеклеточным метаболитам, вследствие чего при совместном существовании данные микромицеты не становятся антагонистами.

Таблица 28 – Биосовместимость штаммов микромицетов

	<i>Aspergillus</i> sp. D1	<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> T7	<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> T15	<i>Metarhizium</i> <i>robertsii</i> An1	<i>Metschnikowia</i> <i>pulcherrima</i> MP2	<i>Penicillium</i> <i>bilaiae</i> Pb14	<i>Talaromyces</i> <i>pinophilus</i> T14
<i>Aspergillus</i> sp. D1		+	+	+	+	+	+
<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> T7	+		+	+	+	+	+
<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> T15	+	+		+	+	+	+
<i>Metarhizium</i> <i>robertsii</i> An1	+	+	+		-	+	+
<i>Metschnikowia</i> <i>pulcherrima</i> MP2	+	+	+	+		+	+
<i>Penicillium</i> <i>bilaiae</i> Pb14	+	+	+	+	+		+
<i>Talaromyces</i> <i>pinophilus</i> T14	+	+	+	+	+	+	
Примечание – знак «+» указывает на совместимые штаммы, знак «-» указывает на несовместимые штаммы							

Учитывая наличие антагонизма в отношении *M. pulcherrima* MP2, включение в состав композиции клеточной суспензии данного штамма являлось нецелесообразным, поэтому был использован супернатант 5-суточной культуры данного штамма, содержащий активные внеклеточные метаболиты. Таким образом, композиция, предназначенная для внесения в почву, была составлена из споровых суспензий мицелиальных грибов, взятых в равных количествах, с добавлением супернатанта дрожжевого штамма *M. pulcherrima* MP2. Для предпосевной обработки семян (прайминг) использовали композицию, составленную из фильтратов 5-суточных культур микромицетов.

3.4.2 Разработка способов применения композиций и оценка их эффективности

На следующем этапе исследований в лабораторных условиях была проведена оценка эффективности применения микромицетов для улучшения роста семи сельскохозяйственных культур. Вегетационный опыт включал следующие варианты:

- 1) Контроль (без микромицетов).
- 2) Прайминг семян путем замачивания в фильтратах.
- 3) Инокуляция композиции микромицетов в почву сразу после посева семян.
- 4) Прайминг семян + инокуляция в почву.

Эксперимент проведен в соответствии с полностью рандомизированным дизайном для одного изменяемого параметра (тип обработки) с тремя повторами для каждого варианта. Эффективность микромицетов оценивали по ростовым (всхожесть и энергия прорастания семян, длина и сухая масса растений) и физиологическим (содержание хлорофиллов и каротиноидов) параметрам агрокультур.

Равномерные всходы и раннее развитие посевов является важнейшим аспектом для формирования урожайности агрокультур. Вследствие задержки прорастания посевы часто подвергаются неблагоприятному воздействию

окружающей среды. Прайминг является эффективным методом, улучшающим посевные качества семян и активизирующим внутренние ресурсы семенного материала [202]. В проведенных исследованиях в большинстве случаев предпосевная обработка семян фильтрами микромицетов повышала энергию прорастания и всхожесть семян, за исключением вариантов с сафлором и эспарцетом. Наибольшая отзывчивость на прайминг наблюдалась у семян сои, где отмечены максимальное увеличение данных показателей (рисунок 25).

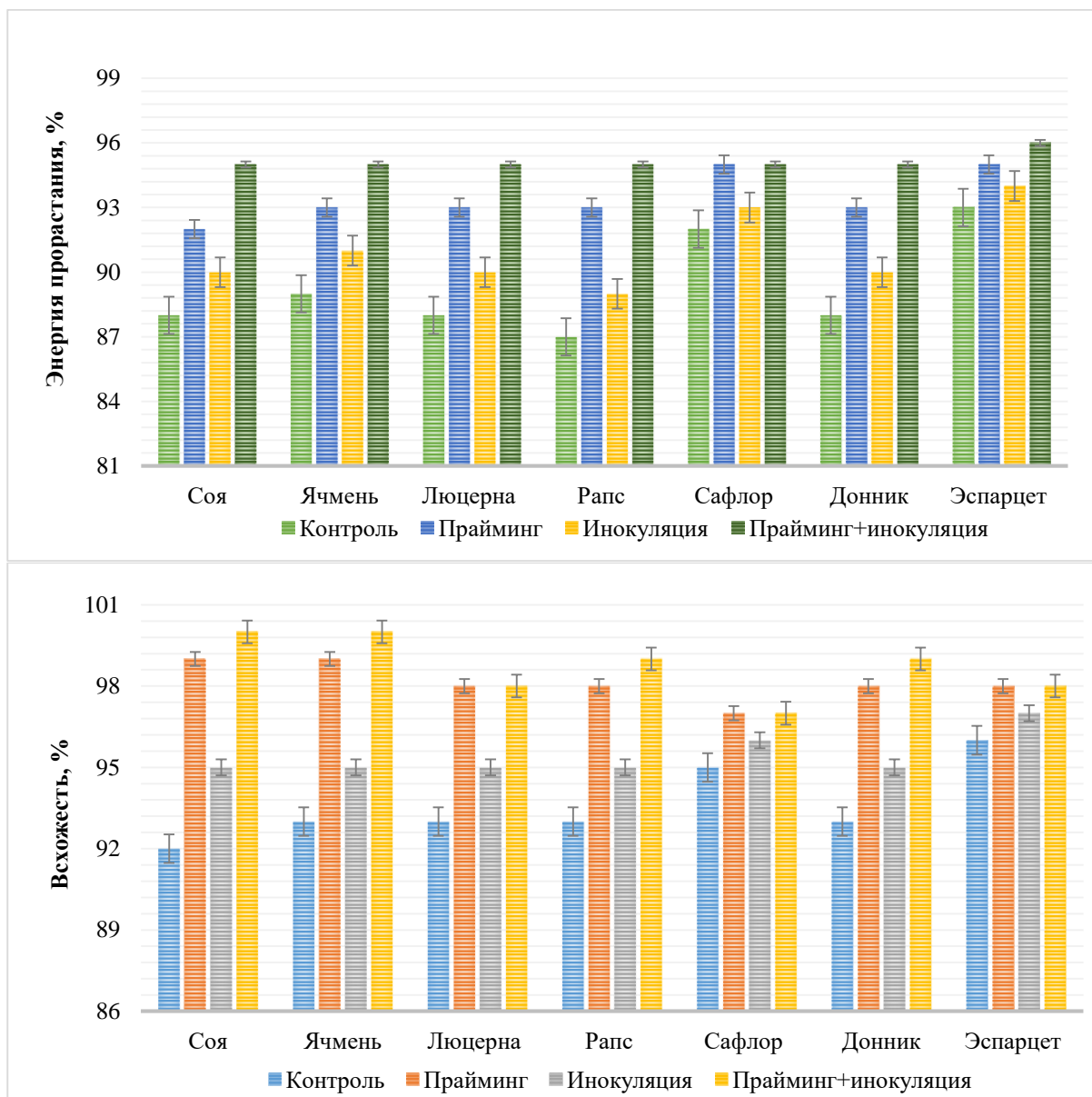


Рисунок 25 – Влияние различных способов применения композиций на энергию прорастания и всхожесть семян агрокультур

Инокуляция агрокультур композицией микромицетов оказала выраженный ростстимулирующий эффект на растения, о чем свидетельствовало достоверное ($p < 0,05$) увеличение морфометрических показателей (таблица 29). Ответная реакция агрокультур на инокуляцию варьировала в зависимости от вида растения [203, с.3].

Таблица 29 – Влияние различных способов применения композиций на ростовые параметры сельскохозяйственных культур

Вид агрокультуры	Вариант обработки	Длина стебля, см	Длина корня, см	Сухая масса побега, г/раст,	Сухая масса корня, г/раст
Соя (<i>Glycine max</i>)	Контроль	24,1±1,4 a	19,8 ± 0,5 a	0,94 ± 0,04 a	0,19 ± 0,005 a
	Прайминг семян	27,2 ± 0,8 b	20,9 ± 0,2 b	1,11 ± 0,03 b	0,21 ± 0,007 b
	Инокуляция в почву	29,1 ± 0,5 c	20,7 ± 0,3 b	1,13 ± 0,039 b	0,22 ± 0,01 bc
	Прайминг + инокуляция	32,1 ± 1,5 d	22,3±0,09 c	1,23 ± 0,05 c	0,23 ± 0,014 c
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>)	Контроль	27,2 ± 1,1 a	13,8 ± 0,38 a	0,31 ± 0,012 a	0,09 ± 0,0052 a
	Прайминг семян	31,3 ± 0,8 bc	16,5±0,42 b	0,35 ± 0,011 b	0,1 ± 0,003 b
	Инокуляция в почву	30,1 ± 0,6 b	16,2 ± 0,5 b	0,36 ± 0,005 b	0,1 ± 0,005 b
	Прайминг + инокуляция	32,3 ± 1,1 c	17,8 ± 0,7 c	0,38 ± 0,012 c	0,11 ± 0,004 c
Люцерна (<i>Medicago sativa</i>)	Контроль	14,2 ± 0,5 a	11,2 ± 0,5 a	0,2 ± 0,013 a	0,09 ± 0,0039 a
	Прайминг семян	15,5 ± 0,2 b	12,1 ± 0,3 b	0,21 ± 0,005 ab	0,09 ± 0,0027 a
	Инокуляция в почву	15,7 ± 0,3 bc	12,7±0,4 bc	0,22 ± 0,008 bc	0,1 ± 0,002 b
	Прайминг + инокуляция	16,3 ± 0,4 c	13,1 ± 0,5 c	0,23 ± 0,013 c	0,1 ± 0,003 b
Рапс (<i>Brassica napus</i>)	Контроль	20,5 ± 0,77 a	6,9 ± 0,18 a	0,21 ± 0,0048 a	0,04 ± 0,001 a
	Прайминг семян	23,8 ± 0,8 bc	7,8 ± 0,2 b	0,25 ± 0,009 b	0,05 ± 0,0025 c
	Инокуляция в почву	22,5 ± 0,5 b	7,3 ± 0,3 ab	0,24 ± 0,011 b	0,045 ± 0,0011 b
	Прайминг + инокуляция	25,1 ± 1,1 c	8,8 ± 0,3 c	0,28 ± 0,014 c	0,05 ± 0,001 c
Сафлор (<i>Carthamus tinctorius</i>)	Контроль	14,4 ± 0,6 a	9,8 ± 0,2 a	0,08 ± 0,0009 a	0,009 ± 0,0002 a
	Прайминг семян	16,4 ± 0,62 b	9,7 ± 0,1 a	0,1 ± 0,001 c	0,01 ± 0,00024 a
	Инокуляция в почву	15,8 ± 0,48 b	9,9 ± 0,22 a	0,09 ± 0,00019 b	0,009 ± 0,0003 a
	Прайминг + инокуляция	17,8 ± 0,52c	10,1 ± 0,2 a	0,1 ± 0,002 c	0,011 ± 0,0004 a
Донник (<i>Melilotus officinalis</i>)	Контроль	12,5 ± 0,51 a	10,1 ± 0,3 a	0,29 ± 0,01 a	0,09 ± 0,004 a
	Прайминг семян	14,2 ± 0,6 bc	11,5 ± 0,4 b	0,32± 0,014 b	0,1 ± 0,003 b
	Инокуляция в почву	13,8 ± 0,51 b	12,1±0,5 bc	0,33 ± 0,005 b	0,1 ± 0,0048 b
	Прайминг + инокуляция	15,2 ± 0,4 c	12,8 ± 0,4 c	0,36 ± 0,01 c	0,11 ± 0,0024 c
Эспарцет (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	Контроль	14,3 ± 0,6 a	10,4 ± 0,3 a	0,17 ± 0,0023 a	0,08 ± 0,0009 a
	Прайминг семян	16,6 ± 0,39 b	11,5 ± 0,2 b	0,18 ± 0,003 b	0,085 ± 0,002 b
	Инокуляция в почву	17,1 ± 0,52 b	11,1±0,4 ab	0,18 ± 0,001 b	0,083 ± 0,0023 b
	Прайминг + инокуляция	18,7 ± 0,7 c	12,4±0,27 c	0,19 ± 0,004 c	0,09 ± 0,0034 c
Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же субстолбце для каждой агрокультуры указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$					

Длина корня является одним из наиболее важных морфометрических показателей, поскольку корни находятся в контакте с почвой и почвенной микрофлорой, поглощают воду с минеральными соединениями. Наибольшее удлинение корней наблюдалось в варианте прайминга семян в сочетании с инокуляцией штаммов в почву у ячменя (на 29 %), за ним следует донник, который продемонстрировал удлинение корней на 27 % (таблица 29). Обработка грибными штаммами не оказала влияния на длину корней сафлора, однако значительно увеличивала длину побегов - на 21 % (рисунок 26) [203, с. 3-4].



Примечание – А – контрольный вариант, В – прайминг семян + инокуляция в почву

Рисунок 26 – Длина стебля сафлора (*Carthamus tinctorius*) при различных вариантах обработки

Длина стебля также является значимой характеристикой при оценке ответной реакции растений на применение микромицетов. Инокуляция микромицетами увеличивала длину стеблей на 14-33%. Наибольшее увеличение длины стеблей отмечено в вариантах с соей и донником. В вегетационных опытах в лабораторных условиях обработка штаммами микромицетов также увеличивала массу стеблей на 12-31%, а массу корней на 15-30% по сравнению с контрольными вариантами (таблица 29) [203, с. 4].

Состояние фотосинтетического аппарата является показателем физиологического состояния растений. Одной из первостепенных характеристик фотосинтетической деятельности является содержание пигментов хлорофиллов и каротиноидов, обеспечивающих адсорбцию квантов света и фотосенсибилизацию у растений [204]. Высокое содержание хлорофиллов может свидетельствовать о потенциально высокой продуктивности агрокультур [189, с.5; 190].

В настоящей работе применение штаммов микромицетов приводило к увеличению содержания Хл *a* на 6-15%, Хл *b* на 7-16%, общего Хл (*a+b*) на 6-16%. Повышение содержания хлорофиллов было характерно практически для всех сельскохозяйственных культур. Однако были исключения с растениями донника и эспарцета: хотя инокуляция и прайминг микромицетами способствовали значительному повышению их морфометрических параметров, но в то же время не оказывали значительного влияния на содержание хлорофилла (таблица 30) [203, с. 5-6].

Таблица 30 – Влияние различных способов применения композиций на фотосинтетические пигменты сельскохозяйственных культур

Вид агрокультуры	Вариант обработки	Хл <i>a</i> , мг/г	Хл <i>b</i> , мг/г	Хл (<i>a+b</i>), мг/г	Хл <i>a/b</i>	Кар, мг/г	Хл (<i>a+b</i>) / Кар
Соя (<i>Glycine max</i>)	Контроль	1,21±0,051 a	0,52 ±0,01 a	1,73±0,061 a	2,32 ±0,1 a	0,41±0,012 c	5,7±0,23 b
	Прайминг семян	1,31±0,05 ab	0,55±0,012 b	1,86 ± 0,03 b	2,38±0,05 a	0,35±0,005 b	5,3±0,1 a
	Инокуляция в почву	1,34±0,048 b	0,54±0,019 ab	1,88 ±0,057 bc	2,48±0,045 b	0,36±0,01 b	5,2±0,14 a
	Прайминг + инокуляция	1,38 ±0,06 b	0,58 ±0,02 b	1,96 ±0,05 c	2,34 ±0,1 a	0,32±0,009 a	6,1±0,21 b
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>)	Контроль	0,77±0,02 a	0,31±0,011 a	1,08±0,01 a	2,48 ±0,13 a	0,26±0,003 b	4,2±0,019 a
	Прайминг семян	0,81±0,01 b	0,34±0,01 b	1,15±0,03 b	2,38 ± 0,05 a	0,22±0,013 a	5,2±0,21 b
	Инокуляция в почву	0,85±0,03 bc	0,34±0,012 b	1,19±0,04 bc	2,5 ± 0,09a	0,22±0,004 a	5,4±0,019 b
	Прайминг + инокуляция	0,89±0,028 c	0,36 ±0,009 b	1,25 ±0,048 c	2,47 ± 0,12 a	0,24±0,005 a	5,2±0,11 b
Люцерна (<i>Medicago sativa</i>)	Контроль	0,75±0,02 a	0,43±0,01 a	1,18±0,04 a	1,74 ± 0,05 a	0,32±0,01 b	3,7±0,09 a
	Прайминг семян	0,84±0,01 bc	0,44±0,018 a	1,28±0,03 b	1,91±0,03 b	0,27±0,009 a	4,7±0,22 b
	Инокуляция в почву	0,81 ±0,02 b	0,46±0,02 ab	1,27±0,05 b	1,76±0,04 a	0,27±0,01 a	4,7±0,12 b
	Прайминг + инокуляция	0,87±0,029 c	0,47±0,01 b	1,34±0,045 b	1,85 ± 0,029 b	0,29±0,013 a	4,6±0,11 b
Рапс (<i>Brassica napus</i>)	Контроль	0,82±0,03 a	0,41±0,012 a	1,23±0,038 a	2 ± 0,09 a	0,33±0,012 a	3,7±0,08 a
	Прайминг семян	0,87±0,02 ab	0,42±0,02 ab	1,29±0,04 ab	2,07±0,05 a	0,32±0,009 a	4,0±0,24 a
	Инокуляция в почву	0,86±0,018 ab	0,43±0,009 ab	1,29±0,03 ab	2±0,06 a	0,34±0,018 a	3,8±0,15 a
	Прайминг + инокуляция	0,88 ±0,02 b	0,44 ±0,011 b	1,32 ± 0,05 b	2 ± 0,048 a	0,35±0,011 a	3,8±0,1 a
Сафлор (<i>Carthamus tinctorius</i>)	Контроль	1,43 ±0,06 a	0,65 ± 0,01 a	2,08±0,052 a	2,2 ±0,012 a	0,46±0,009b	4,5±0,21 a
	Прайминг семян	1,56±0,05 b	0,68±0,012 b	2,24±0,038 b	2,29±0,03 b	0,38±0,013 a	5,9±0,018 b
	Инокуляция в почву	1,59±0,061 b	0,65±0,011 a	2,24±0,05 b	2,45±0,05 c	0,37±0,005 a	6±0,14 b
	Прайминг + инокуляция	1,61 ± 0,07 b	0,71 ± 0,02 b	2,32 ± 0,04 b	2,27 ±0,018 b	0,36±0,011 a	6,4±0,1 c
Донник (<i>Melilotus officinalis</i>)	Контроль	1,33±0,03 a	0,51±0,02 a	1,84±0,053 a	2,61 ±0,14 a	0,38±0,011 a	4,8±0,2 a
	Прайминг семян	1,35±0,04 a	0,5±0,012 a	1,85±0,062 a	2,7 ±0,13 a	0,37±0,005 a	5±0,22 a
	Инокуляция в почву	1,32±0,05 a	0,5±0,019 a	1,82 ±0,05 a	2,64±0,08 a	0,36±0,01 a	5,1±0,18 a
	Прайминг + инокуляция	1,38±0,039 a	0,53±0,01 a	1,91±0,058 a	2,6 ±0,048 a	0,38±0,0077 a	5±0,11 a
Эспарцет (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	Контроль	0,99±0,04 a	0,47±0,00 a	1,46±0,02 a	2,11 ± 0,12a	0,32±0,009 b	4,6±0,09 a
	Прайминг семян	0,98±0,027 a	0,45±0,01 a	1,43±0,052 a	2,18 ± 0,04 a	0,27±0,005 a	5,3±0,21 b
	Инокуляция в почву	1,01±0,038a	0,43±0,022 a	1,44±0,047 a	2,35 ± 0,14 b	0,28±0,013a	5,1±0,1 b
	Прайминг + инокуляция	1,03±0,03 a	0,44±0,025 a	1,47±0,04 a	2,34 ± 0,044 b	0,29±0,012 a	5,1±0,016 b

Примечание – Разные латинские буквы в одном и том же субстолбце для каждой агрокультуры указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$

Каротиноиды, являясь вспомогательными пигментами фотосинтеза, передают поглощенную энергию хлорофиллу, а также защищают его от

фотоокислительного повреждения при чрезмерной инсоляции [204]. В проведенных исследованиях концентрация каротиноидов находилась в диапазоне от 0,22 до 0,46 мг/г сырой массы. В большинстве вариантов, за исключением растений рапса и донника, отмечено снижение содержания каротиноидов в результате применения микромицетов. Наиболее выраженный эффект (снижение на 17-21%) выявлен у растений сафлора как в экспериментах с праймингом семян, так и при инокуляции штаммов в почву (таблица 30). Выявленное снижение количества каротиноидов предположительно может свидетельствовать о его активном участии в защите хлорофиллов от фотоокисления, что дополнительно подтверждается повышением накопления хлорофилла в листьях исследуемых культур.

Обнаруженные различия в содержании пигментов могут быть связаны с продукцией грибами ряда соединений, влияющих на процессы биосинтеза и/или деградации хлорофиллов и каротиноидов, а также созданием более благоприятных условий роста для растений. Известно, что содержание фотосинтетических пигментов очень вариабельно и зависит от совокупности многих факторов. Это дает основание предположить, что микромицеты прямо или опосредованно оказывают влияние на пигментный комплекс растений. Однако, для понимания выявленных эффектов необходимы дальнейшие исследования.

Анализ полученных данных позволяет отметить, что семена, подвергнутые праймингу, демонстрировали повышенную энергию прорастания и всхожесть (рисунок 25), однако такая предпосевная обработка не во всех случаях приводила к значимому улучшению ростовых (таблица 29) и физиологических (таблица 30) показателей растений. Интродукция микромицетов в почву способствовала выраженному положительному эффекту на агрокультуры (таблица 29, 30), однако не обеспечивала равномерного и быстрого прорастания всходов (рисунок 25). Наиболее эффективным вариантом являлось сочетание прайминга семян и инокуляции микромицетов в почву.

Преыдушие исследования показали, что применение СРРМ повышает всхожесть и энергию прорастания семян, увеличивает ростовые показатели, содержание питательных веществ и урожайность различных культур, включая люцерну [205] и рапс [206]. Что касается сои [207, 208], ячменя [168; 169] и сафлора [209, 210], такие эффекты были описаны только для бактериальных штаммов. Отсутствуют литературные данные о влиянии грибных штаммов на рост и развитие донника и эспарцета. Таким образом, проведенное исследование расширяет и углубляет знания для шести видов микромицетов и семи видов сельскохозяйственных культур,

В результате разработаны два варианта композиций: 1) композиция, составленная из фильтратов 5-суточных культур микромицетов; 2) композиция из споровых суспензий мицелиальных грибов, взятых в равных количествах, с добавлением супернатанта дрожжевого штамма *M. pulcherrima* МР2. В вегетационных экспериментах в лабораторных условиях подтверждено стимулирующее влияние микромицетов на сельскохозяйственные культуры, выражающееся в повышении всхожести и энергии прорастания семян,

увеличении морфометрических параметров растений и положительном воздействии на фотосинтетические пигменты. Разработаны три способа применения микромицетов и выявлен наиболее эффективный вариант - прайминг семян путем замачивания в фильтрах в сочетании с инокуляцией штаммов в почву.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования по изучению особенностей распространения микромицетов агроценозов и определению механизмов их положительного действия на растения. В результате комплексного изучения агрономически ценных свойств микромицетов отобраны штаммы, обладающие ярко выраженной фосфат-мобилизирующей и антагонистической активностями, с высоким уровнем продукции фитогормона ИУК и толерантности к ТМ. Выявлены и детально охарактеризованы прямые и косвенные механизмы улучшения роста агрокультур отобранными штаммами. Показано, что применение созданных композиций на основе микромицетов и их метаболитов является эффективным приемом, оказывающим положительный эффект на рост и развитие семи видов агрокультур.

Таким образом, экспериментально обоснована способность отобранных штаммов микромицетов улучшать рост растений как в благоприятных, так и стрессовых условиях.

На основании проведенного исследования сделаны следующие выводы:

1. Показано, что количество мицелиальных грибов в почвах агроценозов на 1-3 порядка выше содержания дрожжей. Установлено преобладание микромицетов в верхних слоях почвы (0-10 см). Выявлено, что уровень колонизации и коэффициент выделения эндофитных грибных штаммов были выше аналогичных показателей для дрожжей в 3,0-3,3 раза и 2,7-4,0 раза, соответственно. Количественное распределение микромицетов в органах растений выражалось последовательностью: корни > стебли > листья. Показано, что основными компонентами сообществ мицелиальных грибов являлись различные виды родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*, а среди дрожжей - представители родов *Aureobasidium*, *Rhodotorula* и *Metschnikowia*.

2. В результате широкомасштабного скрининга 848 почвенных и эндофитных микромицетов были отобраны штаммы с агрономически ценными свойствами: 9 изолятов с выраженной антагонистической активностью по отношению к 3 фитопатогенам (*F. graminearum*, *P. infestans* и *A. alternata*); 14 штаммов, обладающих полирезистентностью к 3 тяжелым металлам (кадмий, свинец, цинк); 12 микромицетов, способных к мобилизации как органического, так и неорганического Р; 10 культур, продуцирующих фитогормон ИУК.

3. Установлено, что прямые механизмы положительного действия микромицетов на растения обусловлены улучшением фосфорного питания и продукцией метаболитов с гормональной и сигнальной функциями. Выявлено пять штаммов микромицетов (*P. bilaiae* Pb14, *P. bilaiae* C11, *P. rubens* EF5, *T. pinophilus* T14 и *Aspergillus* sp. D1), обладающих высокой (до 86%) фосфат-мобилизирующей активностью. Установлены основные механизмы мобилизации Р: снижение рН среды, образование органических кислот, активность кислых и щелочных фосфатаз. Данные штаммы повышали доступность Р в почве на 15-31% и увеличивали его поглощение ячменем на 13-35%. Выявлены десять штаммов микромицетов, синтезирующих ауксины,

абсцизовую и салициловую кислоты. Концентрация ИУК была в пределах от 1,2 до 627,6 нг/мл.

4. Определены механизмы протекторного действия микромицетов на растения. Выявлен штамм *M. robertsii* An1, обладающий выраженной антагонистической активностью (ИИР фитопатогенов составили 41,5 - 51%). Установлены наиболее значимые механизмы антагонистического действия штамма *M. robertsii* An1: хитиназная (0,23 Ед.) и глюканазная (3,42 Ед.) активности, синтез растворимых нелетучих (деструксины А и Е, гидроксиантрахиноны) и летучих соединений с антифунгальными свойствами. Выявлено пять штаммов (*B. bassiana* T7, *B. bassiana* T15, *Rh. mucilaginosa* RH2, *Rh. mucilaginosa* MK1 и *M. pulcherrima* MP2), обладающих полирезистентностью к ТМ и способных извлекать 37-59% кадмия из среды. Установлено, что четыре штамма (*M. robertsii* An1, *B. bassiana* T15, *B. bassiana* T7 и *T. pinophilus* T14), обладающих высокой АЦК-дезаминазной активностью (0,95 - 2,73 μ М α -КБ/мг белка/ч), улучшают рост растений ячменя в условиях фитопатогенной нагрузки и загрязнения почвы кадмием.

5. Создана обширная коллекция штаммов микромицетов сельскохозяйственного назначения. Наиболее эффективные 7 штаммов (*Aspergillus* sp. D1, *B. bassiana* T7, *B. bassiana* T15, *M. robertsii* An1, *M. pulcherrima* MP2, *P. bilaiae* Pb14 и *T. pinophilus* T14) отобраны для разработки композиций и депонированы в отечественную и зарубежную коллекции микроорганизмов.

6. Созданы два варианта композиций: 1) композиция из фильтратов микромицетов, содержащая БАВ; 2) композиция из споровых суспензий мицелиальных грибов и супернатанта дрожжевого штамма *M. pulcherrima* MP2. Разработаны 3 способа применения полученных композиций: 1) прайминг семян путем замачивания в фильтратах, 2) инокуляция споровой суспензии микромицетов в почву сразу после посева семян, 3) прайминг семян в сочетании с инокуляцией в почву. Установлено положительное влияние микромицетов на 7 видов сельскохозяйственных культур, выражающееся в повышении всхожести и энергии прорастания семян, увеличении морфометрических параметров растений и воздействии на фотосинтетические пигменты.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Итоги развития сферы сельского хозяйства за 2021 год и планы на предстоящий период [Электронный ресурс] <https://primeminister.kz/ru/news/reviews/itogi-razvitiya-sfery-selskogo-hozyaystva-za-2021-god-i-plany-na-predstoyashchiy-period-22422> (дата обращения 21.06.2022).
- 2 Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 6. – С. 763–775.
- 3 Список пестицидов (ядохимикатов), разрешенных к применению на территории Республики Казахстан на 2022-2031 годы: утв. 31 мая 2022 года, приказ №87.
- 4 Мустафина В.В., Душкина Ю.Н., Аргынбаева Е.М., Гор Н.В. Особо опасные пестициды в Казахстане: текущая ситуация и рекомендации по минимизации негативного воздействия // Химическая безопасность. – 2020. - №4(1). – С. 236 - 247. <https://doi.org/10.25514/CHS.2020.1.17017>.
- 5 Hossain M.M., Sultana F. Application and Mechanisms of Plant Growth Promoting Fungi (PGPF) for Phytostimulation // In: Organic Agriculture. – London: IntechOpen, 2020. – P. 1-31.
- 6 Белимов А.А. Взаимодействия ассоциативных бактерий с растениями: роль биотических и абиотических факторов: монография. - Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. - 225 с.
- 7 Frąc M., Hannula S.E., Bełka M., Jędryczka M. Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – e707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>.
- 8 Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. - М.: Наука, 2007. - 215 с.
- 9 Chen J., Nan J., Xu D., Mo L., Zheng Y., Chao L., Bao Y. Response differences between soil fungal and bacterial communities under opencast coal mining disturbance conditions // Catena. - 2020. – Vol. 194. - e104779. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104779>.
- 10 de Vries F.T., Griffiths R.I., Bailey M., Craig H., Girlanda M., Gweon H.S. et al. Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal networks // Nat Commun. – 2018. – Vol. 9. – P. 3033. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05516-7>
- 11 Kaewchai S., Soyong K., Hyde K.D. Mycofungicides and fungal biofertilizers // Fungal Diversity. – 2009. – Vol. 38. – P. 25- 50.
- 12 Hernández-Fernández M., Cordero-Bueso G., Ruiz-Muñoz M., Cantoral J.M. Culturable Yeasts as Biofertilizers and Biopesticides for a Sustainable Agriculture: A Comprehensive Review // Plants. – 2021. – Vol. 10. – P. 822. <https://doi.org/10.3390/plants10050822>.
- 13 Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. – М.: Медицина для всех, 2005. – 196 с.

- 14 Wilson G.W., Rice C.W., Rillig M.C., Springer A., Hartnett D.C. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments // *Ecol. Lett.* – 2009. – Vol.12. – P. 452–461. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01303.x>.
- 15 Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. - М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. - 221 с.
- 16 Yurkov A.M. Yeasts of the soil - obscure but precious // *Yeast.* – 2018. – Vol. 35(5). – P. 369–378. <https://doi.org/10.1002%2Fyea.3310>.
- 17 Botha A. The importance and ecology of yeasts in soil // *Soil Biology and Biochemistry.* – 2011. – Vol. 43(1). – P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.001>.
- 18 Мирчинк Г. Т. Почвенная микология. - М.: МГУ, 1988. – 224 с.
- 19 Gupta A., Singh U.B., Sahu P.K., Paul S., Kumar A., Malviya D. et al. Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2022. – Vol. 19. – P. 3141. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053141>.
- 20 Ellouze W., Esmaili Taheri, A., Bainard L.D., Yang C., Bazghaleh N., Navarro-Borrell A., Hamel C. Soil Fungal Resources in Annual Cropping Systems and Their Potential for Management // *BioMed Research International.* – 2014. - Vol. 2014. – P. 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/531824>.
- 21 Garbeva P., van Elsas J.D., van Veen J.A. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history // *Plant Soil.* – 2008. – Vol. 302. – P. 19–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9432-0>.
- 22 Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.
- 23 Buee M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., Becard G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2000. - Vol. 13. – P. 693–698. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.6.693>.
- 24 Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi // *Nature.* - 2005. - Vol. 435. – P. 824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>.
- 25 Nagahashi G., Douds D.D. A rapid and sensitive bioassay with practical application for studies on interactions between root exudates and arbuscular mycorrhizal fungi // *Biotechnol. Tech.* – 1999. - Vol. 13. – P. 893–897.
- 26 Six J., Frey S.D., Thiet R.K., Batten K.M. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems // *Soil Sci. Soc. Am. J.* – 2006. - Vol. 70. – P. 555–569. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.0347>.
- 27 Fierer N., Schimela J.P., Holden P.A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles // *Soil Biol. Biochem.* – 2003. - Vol. 35. – P. 167–76. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00251-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00251-1).

28 Jumpponen A., Jones K.L., Blair J. Vertical distribution of fungal communities in tallgrass prairie soil // *Mycologia*. – 2010. - Vol. 102. – P. 1027-41. <https://doi.org/10.3852/09-316>.

29 Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Ris E-A., Boller T., Wiemken A. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems // *New Phytologist*. – 2005. - Vol. 165. – P. 273–83. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01235.x>.

30 Shukla A., Vyas D., Anuradha J. Soil depth: an overriding factor for distribution of arbuscular mycorrhizal fungi // *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. – 2013. - Vol. 13. – P. 23-33. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000003>.

31 Foissner W. Biogeography and Dispersal of Microorganisms: A Review Emphasizing Protists // *Acta Protozoologica*. – 2006. - Vol. 45. – P. 111-136.

32 Martiny J.B., Bohannan B.J., Brown J.H., Colwell R.K. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map // *Nat Rev Microbiol*. - 2006. - Vol. 4. – P.102-112. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>.

33 Fontaneto D., Hortal J. Microbial Biogeography: Is Everything Small Everywhere? // In: *Microbial Ecological Theory: Current Perspectives*. – Poole: Horizon Scientific Press, 2012. – P. 87–98.

34 Buzzini P., Lachance M.-A., Yurkov A. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. - Springer Cham, 2017. –305 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2>.

35 Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.-B., Klaassen C.H.W., et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* // *Studies in Mycology*. – 2014. - Vol. 78. – P. 343–371. <http://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.

36 Christensen M., Frisvad J.C., Tuthill D.E. *Penicillium* species diversity in soil and some taxonomic and ecological notes // In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. - Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. – P. 303–314.

37 Klich M.A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter // *Mycologia*. – 2002. - Vol. 94. – P. 21-27.

38 Jiang Y., Wang J-L., Chen J., Mao L-J., Feng X-X., Zhang C-L. et al. *Trichoderma* Biodiversity of Agricultural Fields in East China Reveals a Gradient Distribution of Species // *PLoS ONE*. – 2016. - Vol. 11 - e0160613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160613>.

39 Druzhinina I., Kubicek C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? // *J Zhejiang Univ Sci B*. – 2005. – Vol.6. - P. 100–112. <http://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0100>.

40 Summerell B.A., Laurence M.H., Liew E.C.Y., Leslie J.F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review // *Fungal Divers*. - 2010. - Vol. 44. – P. 3–13.

41 Bensch K., Groenewald J.Z., Dijksterhuis J. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*) // *Stud Mycol*. – 2010. - Vol. 67. – P. 1-94. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>.

42 Santos M., Cesanelli I., Diáñez F., Sánchez-Montesinos B., Moreno-Gavira A. Advances in the Role of Dark Septate Endophytes in the Plant Resistance to Abiotic

and Biotic Stresses // J. Fungi. – 2021. – Vol. 7. – P. 939. <https://doi.org/10.3390/jof7110939>.

43 Baron N.C., Rigobelo E.C. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture // Mycology. – 2021. – Vol. 13(1). – P. 39-55. doi: 10.1080/21501203.2021.1945699.

44 Singh N., Singh A., Dahiya P. Plant Growth-Promoting Endophytic Fungi from Different Habitats and Their Potential Applications in Agriculture // In: Recent Trends in Mycological Research. - Springer Cham, 2021. – P. 69-87. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60659-6_3.

45 Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. - 2019. - Т. 17, №1. - С. 19-32.

46 Lata R., Chowdhury S., Gond S.K., White J.F.Jr. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes // Lett Appl Microbiol. – 2018. - Vol. 66(4). – P. 268-276. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>.

47 Lu H., Wei T., Lou H., Shu X., Chen Q. A Critical Review on Communication Mechanism within Plant-Endophytic Fungi Interactions to Cope with Biotic and Abiotic Stresses // J Fungi. – 2021. – Vol. 7(9). – P. 719. <https://doi.org/10.3390/jof7090719>.

48 Harrison J.G., Griffin E.A. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? // Environ Microbiol. 2020. - Vol. 22(6). – P. 2107-2123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968>.

49 Schulz B., Boyle C. The endophytic continuum // Mycol Res. – 2005. - Vol. 109. – P. 661-686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>.

50 Ghimire S.R., Charlton N.D., Bell J.D., Krishnamurthy Y.L., Craven K.D. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma // Fungal Divers. – 2011. - Vol. 47. – P.19–27.

51 Hammami H., Baptista P., Martins F., Gomes T., Abdelly C., Mahmoud O.M. Impact of a natural soil salinity gradient on fungal endophytes in wild barley (*Hordeum maritimum* With.) // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2016. - Vol. 32(11). – P. 184. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2142-0>.

52 Jin H., Yan Z., Liu Q., Yang X., Chen J., Qin B. Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China // Antonie Leeuwenhoek. – 2013. - Vol. 104. – P. 949–963. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0014-2>.

53 Wearn J.A., Sutton B.C., Morley N.J., Gange A.C. Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants // J. Ecol. – 2012. - Vol. 100. – P. 1085–1092.

54 Jia M., Chen L., Xin H.L. et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review // Front Microbiol. – 2016. - Vol. 7. – P. 906. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00906>.

55 Iniguez A.L., Dong Y., Carter H.D., Ahmer B.M., Stone J.M., Triplett E.W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses // Mol Plant

Microbe Interact. – 2005. - Vol. 18(2). – P. 169-78. <https://doi.org/10.1094/mpmi-18-0169>.

56 Miché L., Battistoni F., Gemmer S., Belghazi M., Reinhold-Hurek B. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. // Mol Plant Microbe Interact. – 2006. - Vol. 19(5). – P. 502-11. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-0502>.

57 Кудоярова Г.Р., Кудриш И.К., Мелентьев А.И. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2011. – № 3-4. – С. 5-16.

58 Kalayu G. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers // Int J Agron. – 2019. - Vol. 2019. – P. 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.

59 Jones D.L, Oburger E. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms // In: Phosphorus in Action. Soil Biology. –Heidelberg: Springer Berlin, 2011. - P. 169-198. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_7.

60 Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils // Springerplus. – 2013. - Vol. 2. – P. 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

61 Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture // Front Microbiol. – 2017. - Vol. 8. – P. 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.

62 Kuo C.Y., Fu S.F., Chou F.C., Chen R.Y., Chou JY. Phosphate-solubilizing characteristics of yeasts // Mycosphere. – 2018. - Vol. 9(6). – P. 1117–1131. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/6/4>.

63 Emami-Karvani Z., Chitsaz-Esfahani Z. Phosphorus Solubilization: Mechanisms, Recent Advancement and Future Challenge // In: Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity. – Cham: Springer, 2021. – P. 85–131. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73507-4_4.

64 Richardson A.E., Simpson R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus // Plant Physiol. – 2011. - Vol. 156(3). – P. 989-996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>.

65 Chanclud E., Morel J.B. Plant hormones: a fungal point of view // Mol Plant Pathol. – 2016. - Vol. 17(8). –P.1289-97. <https://doi.org/10.1111%2Fmpp.12393>.

66 Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов Л.И. Микроорганизмы - продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42 (2). – С. 133-143.

67 Mariana U.B., Hernández-Mendoza J., Armando G.C., Veronica A., Larios-Serrato V. Independent Tryptophan pathway in *Trichoderma asperellum* and *T. koningiopsis*: New insights with bioinformatic and molecular analysis // bioRxiv. – 2020. - Vol. 6. – P. 1-16. <https://doi.org/10.1101/2020.07.31.230920>.

68 Jahn L., Hofmann U., Ludwig-Müller J. Indole-3-Acetic Acid Is Synthesized by the Endophyte *Cyanodermella asteris* via a Tryptophan-Dependent and -

Independent Way and Mediates the Interaction with a Non-Host Plant // Int. J. Mol. Sci. – 2021. - Vol. 22. – P. 2651. <https://doi.org/10.3390/ijms22052651>.

69 Fonseca S., Radhakrishnan D., Prasad K., Chini A. Fungal Production and Manipulation of Plant Hormones // Curr Med Chem. – 2018. - Vol. 25(2). – P. 253-267. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170314150827>.

70 Spoel S.H., Dong X. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses // Cell Host Microbe. – 2008. - Vol. 3(6). – P. 348-351. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.009>.

71 Ghorbanpour M., Omidvari M., Abbaszadeh-Dahaji P., Omidvar R., Kariman K. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases // Biological Control. – 2018. - Vol. 117. – P. 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>.

72 Newitt J.T, Prudence S.M.M., Hutchings M.I., Worsley S.F. Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using Streptomyces // Pathogens. – 2019. - Vol. 8(2). – P. 78. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020078>.

73 Roca-Couso R., Flores-Félix J.D., Rivas R. Mechanisms of Action of Microbial Biocontrol Agents against *Botrytis cinerea* // J Fungi. – 2021. - Vol. 7(12). – P. 1045. <https://doi.org/10.3390%2Fjof7121045>.

74 Wang X., Gong X., Li P., Lai D., Zhou L. Structural Diversity and Biological Activities of Cyclic Depsipeptides from Fungi // Molecules. – 2018. - Vol. 23(1). – P. 169. <https://doi.org/10.3390/molecules23010169>.

75 Веселова М.А., Плюта В.А., Хмель И.А. Летучие вещества бактерий: структура, биосинтез, биологическая активность // Микробиология. – 2019. - Т. 88, № 3. – С. 272–287.

76 Hummadi E.H., Cetin Y., Demirbek M., Kardar N.M., Khan S., Coates C.J., Eastwood D.C., Dudley E., Maffei T., Loveridge J., Butt T.M. Antimicrobial Volatiles of the Insect Pathogen *Metarhizium brunneum* // J Fungi (Basel). – 2022. - Vol. 8(4). – P. 326. <https://doi.org/10.3390/jof8040326>.

77 Karsli A., Şahin, Y.S. The role of fungal volatile organic compounds (FVOCs) in biological control // Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi. – 2021. - Vol. 12 (1). – P. 79-92.

78 Morath S.U., Hung R., Bennett, J.W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential // Fungal Biology Reviews. – 2012. - Vol. 26. – P. 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>.

79 Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. - 194 с.

80 Пищик В.Н., Воробьев Н.И., Проворов Н.А., Хомяков Ю.В. Механизмы адаптации растений и микроорганизмов в растительно-микробных системах к тяжелым металлам // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 231–247.

81 Савич В.И., Парахин Н.В., Сычев В.Г., Степанова Л., Лобков В.Т., Амергужин Х.А., Щербаков А.Ю., Романчик Е.А. Почвенная экология. - Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2002. - 546 с.

82 ГОСТ 17.4.1.02-83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения. - Введ. 1985-01-01. - М.: Стандартинформ, 2008. - 9 с.

83 Казнина Н.М. Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений семейства *Poaceae* к тяжелым металлам: дис. ... докт. биол. наук: 03.01.05. - Санкт-Петербург, 2016. - 358 с.

84 Fazli M.M., Soleimani N.N., Mehrasbi M., Darabian S., Mohammadi J., Ramazani A. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential // J Environ Health Sci Eng. – 2015. - Vol. 13. - P.19. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>.

85 Manguilimotan L.C., Bitacura J.G. Biosorption of Cadmium by Filamentous Fungi Isolated from Coastal Water and Sediments // Journal of Toxicology. – 2018. - Vol. 2018. – P. 7170510. <https://doi.org/10.1155/2018/7170510>.

86 Shadmani L., Jamali S., Fatemi A. Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation // Braz J Microbiol. – 2021. - Vol. 19. – P. 1097-1106. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00493-4>.

87 Oladipo O.G., Awotoye O.O., Olayinka A., Bezuidenhout C.C., Maboeta M.S. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites // Braz J Microbiol. – 2018. - Vol. 49(1). – P. 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.003>.

88 An H., Liu Y., Zhao X., Huang Q., Yuan S., Yang X., Dong J. Characterization of cadmium-resistant endophytic fungi from *Salix variegata* Franch. in Three Gorges Reservoir Region, China // Microbiol Res. – 2015. - Vol. 176. – P. 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.013>.

89 Li X., Li W., Chu L., White J.F.Jr, Xiong Z., Li H-Y. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from *Dysphania ambrosioides*, a hyperaccumulator from Pb–Zn contaminated soils // J Plant Interact. – 2016. - Vol. 11(1). – P. 186–192. <https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1266043>.

90 Châu N.T.T. Heavy metal resistance and biosorption of acid-tolerant yeasts isolated from tea soil // VNU J Earth Environ Sci. – 2013. - Vol. 29 (4). – P. 21-31.

91 Rehman A., Sohail Anjum M., Hasnain S. Cadmium biosorption by yeast, *Candida tropicalis* CBL-1, isolated from industrial wastewater // J Gen Appl Microbiol. – 2010. - Vol. 56(5). – P. 359-368. <https://doi.org/10.2323/jgam.56.359>.

92 Li Z., Yuan H. Responses of *Rhodotorula sp.* Y11 to cadmium // Biometals. – 2008. - Vol. 21(6). – P. 613-621. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9147-6>.

93 Li C., Jiang W., Ma N., Zhu Y., Dong X., Wang D., Meng X., Xu Y. Bioaccumulation of cadmium by growing *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* // Bioresour Technol. – 2014. - Vol. 155. – P. 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.098>.

94 Mowll J.L., Gadd G.M. Cadmium Uptake by *Aureobasidium pullulans* // J Gen Microbiol. – 1984. - Vol. 130. – P. 279-284. <https://dx.doi.org/10.1099/00221287-130-2-279>.

95 Белимов А.А., Тихонович И.А. Микробиологические аспекты устойчивости и аккумуляции тяжелых металлов у растений (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2011. - № 3. - С. 10-15.

96 Gajewska J., Floryszak-Wieczorek J., Sobieszczuk-Nowicka E., Mattoo A., Arasimowicz-Jelonek M. Fungal and oomycete pathogens and heavy metals: an

inglorious couple in the environment // IMA Fungus. – 2022. - Vol. 13(1). – P. 6. <https://doi.org/10.1186/s43008-022-00092-4>.

97 Багаева Т.В., Ионова Н.Э., Надеева Г.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов. – Казань: Казанский университет, 2013. – 56 с.

98 González-Chávez M.C., Carrillo-González R., Wright S.F., Nichols K.A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements // Environ Pollut. – 2004. - Vol. 130(3). – P. 317-23. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>.

99 Chandwani S., Amaresan N. Role of ACC deaminase producing bacteria for abiotic stress management and sustainable agriculture production // Environ Sci Pollut Res Int. – 2022. - Vol. 29(16). – P. 22843-22859. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18745-7>.

100 Тихонович И.А., Завалин А.А., Благовещенская Г.Г., Кожемяков А.П. Использование биопрепаратов - дополнительный источник элементов питания растений // Плодородие. - 2011. - №3. - С.9-13.

101 Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты // Сельскохозяйственная биология. – 2011. - № 3. - С. 3-9.

102 Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай. - М.: Издательство ВНИИА, 2005. - 302 с.

103 МИКОЛАР: препарат против вредителей [Электронный ресурс] <https://www.niizkr.kz/produkty/biopreparat-mikolar/> (дата обращения 21.06.2022).

104 Заядан Б.К., Маторин Д.Н., Баймаханова Г.Б., Болатхан К., Ораз Г.Д., Саданов А.К. Консорциумы микроорганизмов, перспективных при получении биоудобрения для рисовых культур // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 4. – С. 467–474.

105 Пахолкова А.В., Слаквенко М.А., Приходько Н.А. Экологически чистый биопрепарат «Олжа» для повышения плодородия почвы // Вестник КАСУ. – 2006. - № 3. – С.168-176.

106 Саданов А.К., Смирнова И.Э., Айткельдиева С.А. Повышение урожайности агрокультур и укрепление кормопроизводства приаральского региона на основе отечественных биопрепаратов // Микробиология және вирусология. – 2014. - №1(4). – С. 93-103.

107 Alison S., Robert H. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion // In: Biotechnology and biology of *Trichoderma*. – Amsterdam: Elsevier, 2014. – P. 415–428. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X>.

108 Altaf M.M., Imran M., Abulreesh H.H., Khan M.S., Ahmad I. Diversity and Applications of *Penicillium* spp. in Plant-Growth Promotion // In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. - Amsterdam: Elsevier, 2018. – P. 261-276.

109 Берестецкий А.О., Леднев Г.Р., Ху Ц. Перспективные подходы к поиску метаболитов грибов для борьбы с вредными членистоногими // Вестник защиты растений. – 2021. –Т. 104, №1. – С. 6–27.

- 110 Anjos L, Gaistardo C, Deckers J, Dondeyne S, Eberhardt E, Gerasimova M, Harms B, Jones A, Krasilnikov P, Reinsch T, Vargas R, Zhang G. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. –Rome: FAO 2015. – 203 p.
- 111 Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем. - М.: МАКС Пресс, 2001. - 92 с.
- 112 Huang W.Y., Cai Y.Z., Hyde K.D., Corke H., Sun M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants // *Fungal Divers.* – 2008. - Vol. 33. – P. 61-75.
- 113 Barnett H.L., Hunter B.B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi.* - New York: Amer Phytopathological Society, 1998. – 240 p.
- 114 Ellis M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes.* - CABI, 1988. – 608 p.
- 115 Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. *The yeasts: a taxonomic study.* - Burlington: Elsevier Science, 2011. – 2354 p.
- 116 Watanabe T. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species.* - New-York: CRC Press, 2010. – 426 p.
- 117 Morales A, Alvear M, Valenzuela E, Castillo CE, Borie F (2011) Screening, evaluation and selection of phosphate-solubilising fungi as potential biofertiliser. *J Soil Sci Plant Nutr* 11(4):89-103. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162011000400007>.
- 118 Murphy J., Riley J.P. A Modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters // *Analytica Chimica Acta.* – 1962. - Vol. 27. – P. 31-36. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).
- 119 Della Mónica I.F., Godoy M.S., Godeas A.M., Scervino J.M. Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability // *J Appl Microbiol.* – 2018. - Vol. 124(1). – P.155-165. <https://doi.org/10.1111/jam.13620>.
- 120 Glickmann E., Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria // *Appl Environ Microbiol.* – 1995. - Vol. 61(2). P. 793-6. <https://doi.org/10.1128%2Faem.61.2.793-796.1995>.
- 121 Brazhnikova Y.V., Shaposhnikov A.I., Sazanova A.L., Belimov A.A., Mukasheva T.D., Ignatova L.V. Phosphate mobilization by culturable fungi and their capacity to increase soil p availability and promote barley growth // *Curr Microbiol.* – 2022. – Vol. 79(8). - 240. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02926-1>.
- 122 Khunnamwong P., Lertwattanasakul N., Jindamorakot S., Suwannarach N., Matsui K., Limtong S. Evaluation of antagonistic activity and mechanisms of endophytic yeasts against pathogenic fungi causing economic crop diseases // *Folia Microbiol (Praha).* – 2020. - Vol. 65(3). – P. 573-590.
- 123 Берестецкий А.О., Григорьева Е.Н., Петрова М.О., Степанычева Е.А. Инсектицидные и фитотоксические свойства экстрактов из культур некоторых патогенов злаков // *Микология и фитопатология.* – 2018. – Т. 52, № 6. – С. 408–419.
- 124 Li C., Xu Y., Jiang W., Dong X., Wang D., Liu B. Effect of NaCl on the heavy metal tolerance and bioaccumulation of *Zygosaccharomyces rouxii* and

Saccharomyces cerevisiae // Bioresour Technol. – 2013. - Vol.143. – P. 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.114>.

125 Honma M., Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // Agric Biol Chem. – 1978. - Vol. 42. – P. 1825–1831. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863261>.

126 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. - Vol. 72. – P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

127 Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу. - М.: Академия, 2003. — 256 с.

128 Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. - Vol. 39. – P. 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.

129 Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Curr Protoc Mol Biol. – 2001. - Vol.2. – P. 24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>.

130 White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics // In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. - Academic Press: London, 1990. - P. 315-322.

131 Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Molecular Biology and Evolution. – 2018. - Vol. 35. – P.1547-1549.

132 Бражникова Е.В., Мукашева Т.Д., Игнатова Л.В. Количественный состав комплексов микромицетов в почвах агроценозов // Вестник КазНУ. Серия экологическая. - 2017. - №4 (53). - С. 23-31.

133 Бражникова Е.В., Мукашева Т.Д., Игнатова Л.В. Таксономическая структура микромицетных сообществ почв под посевами сельскохозяйственных культур // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2018. - №1 (54). - С. 92-100.

134 Attia E.Z., Farouk H.M., Abdelmohsen U.R., El-Katatny M.H. Antimicrobial and extracellular oxidative enzyme activities of endophytic fungi isolated from alfalfa (*Medicago sativa*) assisted by metabolic profiling // South African Journal of Botany. – 2020. - Vol. 134. – P. 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.003>.

135 Beilei W., Mei L., Xiaoli C., Xiliang J., Wang X. Exploration of Endophytes from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) as Biocontrol Agents // Genetics and Genomics. – 2020. - Vol. 1 (1). – P. 3-8. <http://dx.doi.org/10.31487/j.GG.2020.01.01>.

136 Impullitti A.E., Malvick D.K. Fungal endophyte diversity in soybean // J. Appl. Microbiol. – 2013. - Vol. 114 (5). – P. 1500-1506. <https://doi.org/10.1111/jam.12164>.

137 Fernandes E.G., Pereira O.L., da Silva C.C., Bento C.B., de Queiroz M.V. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max* // Microbiol. Res. - 2015. - Vol. 181. - P. 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010>.

138 Schmidt C.S., Mrnka L., Lovecká P. et al. Bacterial and fungal endophyte communities in healthy and diseased oilseed rape and their potential for biocontrol of *Sclerotinia* and *Phoma* disease // Sci Rep. – 2021. - Vol. 11. – P. 3810. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81937-7>.

- 139 Zhang Q., Zhang J., Yang L., Zhang L., Jiang D., Chen W., Li G. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus* // *Biological Control*. - 2014. - Vol. 72. – P. 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.018>.
- 140 Ignatova L., Kistaubayeva A., Brazhnikova Y., Omirbekova A., Mukasheva T., Savitskaya I., Karpenyuk T., Goncharova A., Egamberdieva D., Sokolov A. Characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from soybean (*Glycine max*) and barley (*Hordeum vulgare*) // *Heliyon*. – 2021. – Vol. 7(11). - e08240. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08240>.
- 141 Бражникова Е.В., Мукашева Т.Д., Игнатова Л.В. Скрининг штаммов микромицетов, перспективных для стимуляции роста сельскохозяйственных культур // *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. - 2019. – №3(80). –С.40-47
- 142 Oliveira C.A., Alves V.M., Marriel I.E., Gomes E.A., Scotti M., Carneiro N.P., Guimarães C.T., Schaffert R.E., Sa N.M. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome // *Soil Biol Biochem*. – 2009. - Vol. 41. – P. 1782-1787. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>.
- 143 Yadav R.S., Tarafdar J.C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds // *Soil Biol Biochem*. – 2003. - Vol. 35. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>.
- 144 Stefanoni Rubio P.J., Godoy M.S., Della Mónica I.F., Pettinari M.J., Godeas A.M., Scervino J.M. Carbon and nitrogen sources influence tricalcium phosphate solubilization and extracellular phosphatase activity by *Talaromyces flavu* // *Curr Microbiol*. – 2016. - Vol. 72(1). – P. 41-47. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0914-7>.
- 145 Mehta P., Walia A., Shirkot C.K. Functional diversity of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacteria isolated from apple trees in the trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India // *Biol Agr Hort*. – 2015. - Vol. 31(4). – P. 265–288. <https://doi.org/10.1080/01448765.2015.1014420>.
- 146 Climate change fans spread of pests and threatens plants and crops, new FAO study [Электронный ресурс] <https://www.fao.org/news/story/en/item/1402920/icode/> (дата обращения 21.06.2022).
- 147 Behera B.C., Yadav H., Singh S.K., Mishra R.R., Sethi B.K., Dutta S.K., Thatoi H.N. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India // *J Genet Eng Biotechnol*. – 2017. - Vol. 15(1). – P.169-178. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>.
- 148 Spohn M., Ermak A., Kuzyakov Y. Microbial gross organic phosphorus mineralization can be stimulated by root exudates: a 33P isotopic dilution study // *Soil Biol Biochem*. – 2013. - Vol. 65. – P. 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.028>.
- 149 Wang X., Wang C., Sui J., Liu Z., Li Q., Ji C., Song X., Hu Y., Wang C., Sa R., Zhang J., Du J., Liu X. Isolation and characterization of phosphofungi, and

screening of their plant growth-promoting activities // AMB Expr. – 2018. - Vol. 8. – P. 63. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0593-4>.

150 Li C., Li Q., Wang Z., Ji G., Zhao H., Gao F., Su M., Jiao J., Li Z., Li H. Environmental fungi and bacteria facilitate lecithin decomposition and the transformation of phosphorus to apatite // Sci Rep. – 2019. - Vol. 9. – P. 15291 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51804-7>.

151 Pandey A., Das N., Kumar B., Rinu K., Trivedi P. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region // World J Microbiol Biotechnol. – 2008. - Vol. 24. – P. 97–102. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9444-1>.

152 Takeda M., Knight J.D. Enhanced solubilization of rock phosphate by *Penicillium bilaiae* in pH-buffered solution culture // Can J Microbiol. – 2006. - Vol. 52(11). – P. 1121-1129. <https://doi.org/10.1139/w06-074>.

153 Пат. 34350 РК. Штамм мицелиального гриба *Penicillium bilaiae* Pб14, обладающий фосфат-мобилизующей и целлюлозолиитической активностями / Е.В. Бражникова, Т.Д.Мукашева, Л.В. Игнатова; опубл. 26.06.2020, Бюл. № 25. - 5 с.

154 Bashan Y., Kamnev A.A., de-Bashan L.E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure // Biol Fertil Soils. – 2013. - Vol. 49. – P. 465–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0737-7>.

155 Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А., Курамшина З.М., Смирнова Ю.В. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2011. – Т. 4 (2). – С. 172-182.

156 Adhikari P., Pandey A. Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots // Rhizosphere. – 2019. - Vol.9. – P. 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.002>.

157 Zúñiga-Silgado D., Rivera-Leyva J.C., Coleman J.J., Sánchez-Reyez A., Valencia-Díaz S., Serrano M., de-Bashan L.E., Folch-Mallol J.L. Soil type affects organic acid production and phosphorus solubilization efficiency mediated by several native fungal strains from Mexico // Microorganisms. – 2020. - Vol. 8(9). – P. 1337. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091337>.

158 Mardad I., Serrano A., Soukri A., Vespucio A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit // Afr J Microbiol Res. – 2013. - Vol. 7. – P. 626-635. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1431>.

159 Zeng Q., Wu X., Wen X. Effects of Soluble Phosphate on Phosphate-Solubilizing Characteristics and Expression of *gcd* Gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 // Curr Microbiol. – 2016. - Vol. 72. – P. 198–206. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0938-z>.

160 Hefnawy M.A., Gharieb Omima M.M., Eissa O., Ammar A.M. Evaluation and optimization of rock phosphate and tricalcium phosphate solubilization by some soil fungi // Egypt J Exp Biol (Bot). - 2009. - Vol. 5. – P. 75 – 84.

161 Li Z., Bai T., Dai L., Wang F., Tao J., Meng S., Hu Y., Wang S., Hu S. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger* // Sci Rep. – 2016. - Vol. 6. – P. 25313. <https://doi.org/10.1038/srep25313>.

162 Scervino J.M., Mesa M.P., Della Mónica I., Recchi M., Moreno N.S., Godeas A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization // Biol Fertil Soils. – 2010. - Vol. 46. – P. 755–763. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0482-8>.

163 Jiang Y., Tian J., Ge F. New Insight into carboxylic acid metabolisms and pH regulations during insoluble phosphate solubilisation process by *Penicillium oxalicum* PSF-4 // Curr Microbiol. – 2020. - Vol. 77(12). – P. 4095-4103. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02238-2>.

164 Wang J., Zhao Y.G., Maqbool F. Capability of *Penicillium oxalicum* y2 to release phosphate from different insoluble phosphorus sources and soil // Folia Microbiol. – 2021. - Vol. 66(1). – P. 69-77. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00822-4>.

165 Abbasi M.K., Musa N., Manzoor M. Mineralization of soluble P fertilizers and insoluble rock phosphate in response to phosphate-solubilizing bacteria and poultry manure and their effect on the growth and P utilization efficiency of chilli (*Capsicum annuum* L.) // Biogeosciences. – 2015. – Vol. 12, №15. – P. 4607–4619. <https://doi.org/10.5194/bg-12-4607-2015>.

166 Wakelin S.A., Gupta V.V.S.R., Harvey P.R., Ryder M.H. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia // Can J Microbiol. – 2007. - Vol. 53(1). – P. 106-115. <https://doi.org/10.1139/w06-109>.

167 Anil K., Lakshmi T. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. // Braz J Microbiol. – 2010. - Vol. 41(3). – P. 787–795. <https://dx.doi.org/10.1590%2FS1517-83822010005000031>.

168 Canbolat M.Y., Bilen S., Çakmakçı R., Şahin F., Aydın A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora // Biol Fertil Soils. – 2006. - Vol. 42. – P. 350–357. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0034-9>.

169 Peix A., Rivas-Boyer A.A., Mateos P.F., Rodriguez-Barrueco C., Martínez-Molina E., Velazquez E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions // Soil Biol Biochem. – 2001. - Vol. 33. – P. 103–110. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00120-6).

170 Ласточкина О.В. Адаптация и устойчивость растений пшеницы к засухе, опосредованная природными регуляторами роста *Bacillus* spp.: механизмы реализации и практическая значимость (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56, № 5. – С. 843-867.

- 171 Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Dumova V.A., Shaposhnikov A.I., Ladatko A.G., Davies W.J. Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth // *Plant Physiol Biochem.* – 2014. - Vol. 74. – P. 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.032>.
- 172 Sah S.K., Reddy K.R., Li J. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants // *Front Plant Sci.* – 2016. - Vol. 7. – P. 571. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>.
- 173 Ribot C., Wang Y., Poirier Y. Expression analyses of three members of the AtPHO1 family reveal differential interactions between signaling pathways involved in phosphate deficiency and the responses to auxin, cytokinin, and abscisic acid // *Planta.* – 2008. - Vol. 227(5). – P.1025-36. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0677-x>.
- 174 Golo P.S., Gardner D.R., Grilley M.M., Takemoto J.Y., Krasnoff S.B., Pires M.S. et al. Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants // *PLoS One.* – 2014. - Vol. 9(8). - e104946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104946>.
- 175 Sree K.S., Padmaja V. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura* // *Journal of Applied Entomology.* – 2008. - Vol. 132. – P. 68-78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01239.x>.
- 176 Yadav R.N., Mahtab Rashid M., Zaidi N.W., Kumar R., Singh H.B. Secondary Metabolites of *Metarhizium* spp. and *Verticillium* spp. and Their Agricultural Applications // In: *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms.* – Singapore: Springer, 2019. – 404 p. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_2.
- 177 Liu J., Leng L., Liu Y. et al. Identification and quantification of target metabolites combined with transcriptome of two rheum species focused on anthraquinone and flavonoids biosynthesis // *Sci Rep.* – 2020. - Vol. 10. – P. 20241 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77356-9>.
- 178 Zhao X., Wei J., Yang M. Simultaneous Analysis of Iridoid Glycosides and Anthraquinones in *Morinda officinalis* Using UPLC-QqQ-MS/MS and UPLC-Q/TOF-MS^E // *Molecules.* – 2018. - Vol. 23(5). – P. 1070. <https://doi.org/10.3390/molecules23051070>.
- 179 Ravindran K., Chitra S., Wilson A., Sivaramakrishnan S. Evaluation of Antifungal Activity of *Metarhizium anisopliae* Against Plant Phytopathogenic Fungi // In: *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security.* - New Delhi: Springer, 2014. – 610 p. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_2.
- 180 Guigón-López C., Holguín-Ibarra P.D., Torres-Zapien J.H., García- Cruz I., Villapando I., Salas-Salazar N.A. *Metarhizium anisopliae* reduces conidial germination and mycelium growth of the apple gray mold *Botrytis cinerea* // *Biological Control.* – 2021. - Vol. 160. – P. 104660. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104660>.
- 181 Lozano-Tovar M.D., Garrido-Jurado I., Quesada-Moraga E., Raya-Ortega M.C., Trapero-Casas A. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and

Phytophthora megasperma olive pathogens // Crop Protection. – 2017. - Vol. 100. – P. 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.06.026>.

182 Kang S.C., Bark Y.G., Lee D.G. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alteraria solani* // Korean J. Mycol. – 1996. - Vol. 24, № 1. – P. 49-55.

183 Фокина А.И., Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Горностаева Е.А., Огородникова С.Ю. Тяжёлые металлы как фактор изменения метаболизма у микроорганизмов (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. - 2015. – №2. - С. 5-18.

184 Иванова А.Е., Марфенина О.Е. Морфологические адаптации грибного мицелия и величина минимального ростового модуля в разных экологических условиях // Вестник ТвГУ. – 2008. – Т. 9. – С. 86-93.

185 Neumann G., Veeranagouda Y., Karegoudar T.B., Sahin O., Mausezahl I., Kabelitz N., Kappelmeyer U., Heipieper H.J. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. Extremophiles. - 2005. - Vol. 9. – P. 163–168.

186 Baldrian P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi // Enzyme Microb Technol. – 2003. - Vol. 32. – P. 78–91. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00245-4).

187 Пат. 34305 РК. Штамм микромицета *Beauveria bassiana* Т7, обладающий антагонистической активностью и устойчивостью к тяжелым металлам / Е.В. Бражникова, Т.Д.Мукашева, Л.В. Игнатова; опубл. 28.08.2020, Бюл. № 34. - 5 с.

188 Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A, Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K.-J., Stepanok V.V. Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase // Canadian Journal of Microbiology. – 2001. – Vol. 47. – P. 642-652.

189 Дерендовская А.Н., Жосан С. Хлорофильные показатели и их связь с продуктивностью растений озимого ячменя // Аграрная наука. - 2008. - № 1. - С. 3-7.

190 Прядкина Г.А., Шадчина Т.М. Прогнозирование зерновой продуктивности озимой пшеницы по хлорофильному фотосинтетическому потенциалу листьев // Физиология и биохимия культ. растений. - 2010. - Т. 42, № 1. - С. 50-60.

191 Лыскова И.В., Лисицын Е.М., Лыскова Т.В. Реакция пигментного комплекса листьев клевера лугового на погодные условия и элементы минерального питания // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. - 2020. – Т. 21 (4). – С. 387-396.

192 Sharkey T.D. Emerging research in plant photosynthesis // Emerg Top Life Sci. – 2020. - Vol. 4(2). – P. 137-150. <https://doi.org/10.1042/etls20200035>.

193 Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. Proline mechanisms of stress survival // Antioxid Redox Signal. – 2013. - Vol. 19(9). - P. 998-1011. <https://doi.org/10.1089%2Fars.2012.5074>.

- 194 Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M.E. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis* // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2004. - Vol. 17(4). – P. 343-50. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.4.343>.
- 195 Zengin F.K., Munzuroğlu O. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings // *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica.* – 2005. – Vol. 47. - P.157-164.
- 196 Sarangthem J., Jain M., Gadre R. Inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity by cadmium in excised etiolated maize leaf segments during greening // *Plant Soil Environ.* – 2011. - Vol. 57. – P. 332-337. <https://doi.org/10.17221/45/2011-PSE>.
- 197 Begum N., Hu Z., Cai Q., Lou L. Influence of PGPB inoculation on HSP70 and HMA3 gene expression in switchgrass under cadmium stress // *Plants.* – 2019. - Vol. 8 (11). – P. 504. <https://doi.org/10.3390%2Fplants8110504>.
- 198 Mitra S., Pramanik K., Sarkar A., Ghosh P.K., Soren T., Maiti T.K. Bioaccumulation of cadmium by *Enterobacter* sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2018. - Vol. 156. – P. 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.001>.
- 199 Gupta S., Pandey S. Enhanced salinity tolerance in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) plants using twin ACC deaminase producing rhizobacterial inoculation // *Rhizosphere.* – 2020. - Vol. 16. – P. 100241. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100241>.
- 200 Robison M.M., Shah S., Tamot B., Pauls K.P., Moffatt B. A., Glick B.R. Reduced symptoms of *Verticillium* wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase // *Molec. Plant Pathol.* – 2001. - Vol. 2, № 3 – P. 135–145. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2001.00060.x>.
- 201 Муродова С.С., Давранов К.Д. Комплексные микробные препараты. применение в сельскохозяйственной практике // *Biotechnologia Acta.* – 2014. – Т. 7, № 6. - С. 92-101.
- 202 Киприянов Ф.А., Савиных П.А., Устюжанин И.А. Влияние прайминга семян на всходы сельскохозяйственных культур // *Вестник АПК Верхневолжья.* – 2002. – Т. 1 (57). - С 5-10.
- 203 Brazhnikova Y., Ignatova L., Omirbekova A., Mukasheva T., Kistaubayeva A., Savitskaya I., Egamberdieva D., Usmanova A., Batlutskaya I. Effect of plant growth promotion fungi on agricultural crops // *BIO Web Conf.* - 2021. – Vol. 40. – P. 01004. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20214001004>.
- 204 Иванов Л.А., Ронжина Д.А., Юдина П.К., Золотарева Н.В., Калашникова И.В., Иванова Л.А. Сезонная динамика содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях степных и лесных растений на уровне вида и сообщества // *Физиология растений.* – 2020. – Т.67, № 3. – С. 278–288.
- 205 Liu J., Liu X., Zhang Q. et al. Response of alfalfa growth to arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria under different phosphorus application levels // *AMB Expr.* – 2020. - Vol. 10. – P. 200 <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01137-w>.

206 Su Z.Z., Wang T., Shrivastava N., Chen Y.Y., Liu X., Sun C., Yin Y., Gao Q.K., Lou B.G. *Piriformospora indica* promotes growth, seed yield and quality of *Brassica napus* L. // Microbiol Res. – 2017. - Vol. 199. – P. 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.02.006>.

207 Garcia J., Schmidt J.E., Gidekel M., Gaudin A.C.M. Impact of an antarctic rhizobacterium on root traits and productivity of soybean (*Glycine max* L.) // Journal of Plant Nutrition. – 2021. - Vol. 44, №12. – P. 1818-1825. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1884704>.

208 Zeffa D.M., Fantin L.H., Koltun A., de Oliveira A., Nunes M., Canteri M. G., Gonçalves L. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018 // PeerJ. – 2020. - Vol. 8. – P. 7905. <https://doi.org/10.7717/peerj.7905>.

209 Nosheen A., Bano A., Ullah F., Farooq U., Yasmin H., Hussain I. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on root morphology of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) // African Journal of Biotechnology. – 2011. - Vol. 10, № 59. – P. 12639-12649. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1647>.

210 Sharifi R., Namvar A. Grain filling and fatty acid composition of safflower fertilized with integrated nitrogen fertilizer and biofertilizers // Pesquisa Agropecuaria Brasileira – 2017. - Vol. 52. – P. 236-243. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000400003>.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Патенты на изобретение



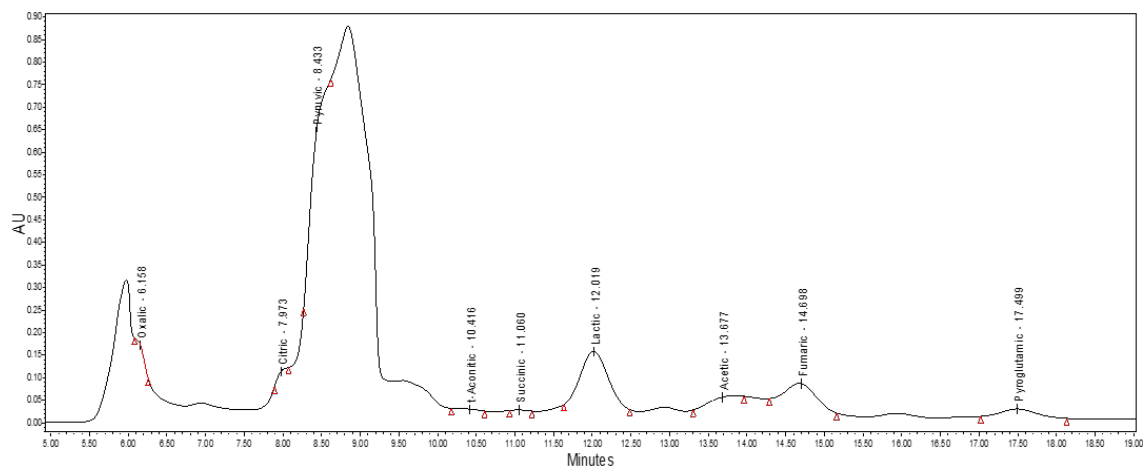
Рисунок А1 – Патент на изобретение № 34350



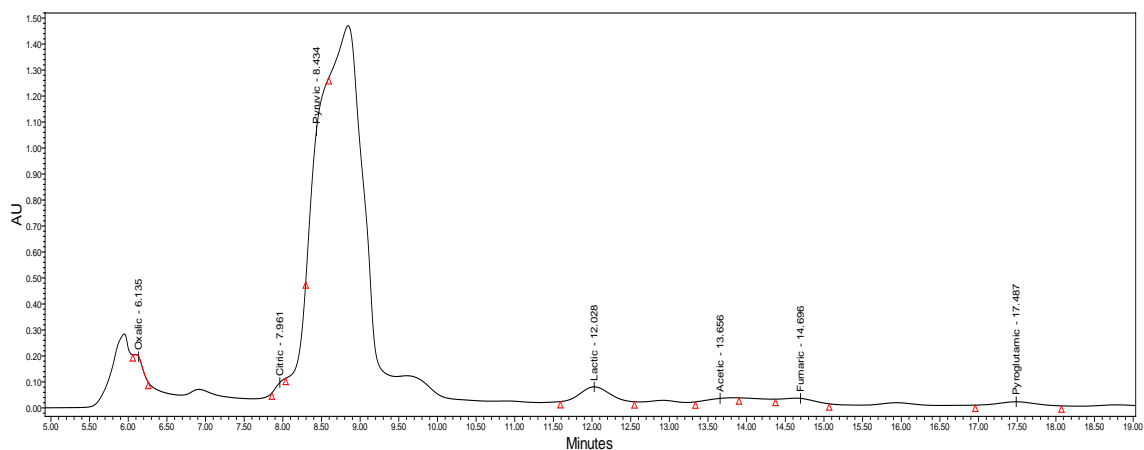
Рисунок А2 – Патент на изобретение № 34305

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

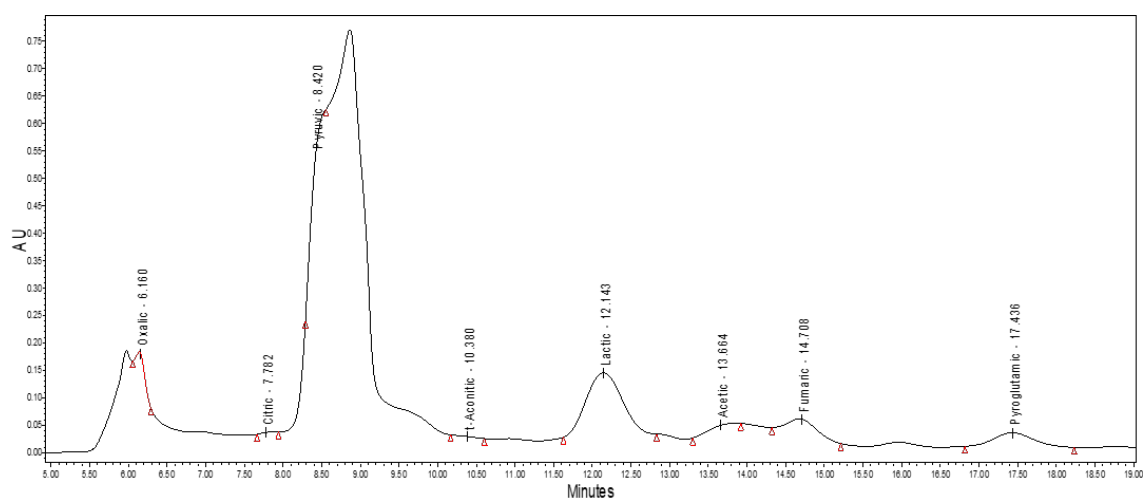
Хроматограммы низкомолекулярных органических кислот



Penicillium bilaiae Pb14

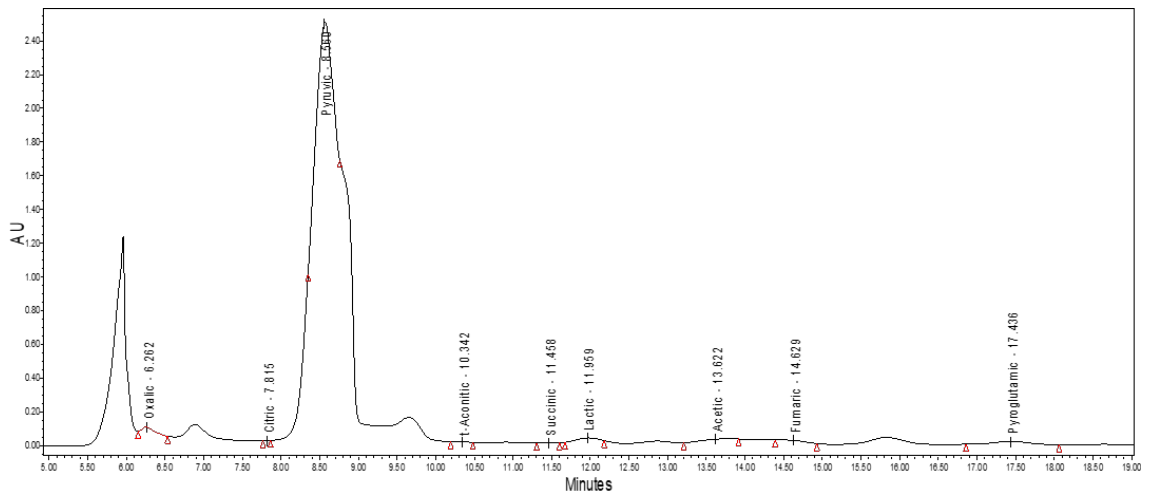


Penicillium bilaiae C11

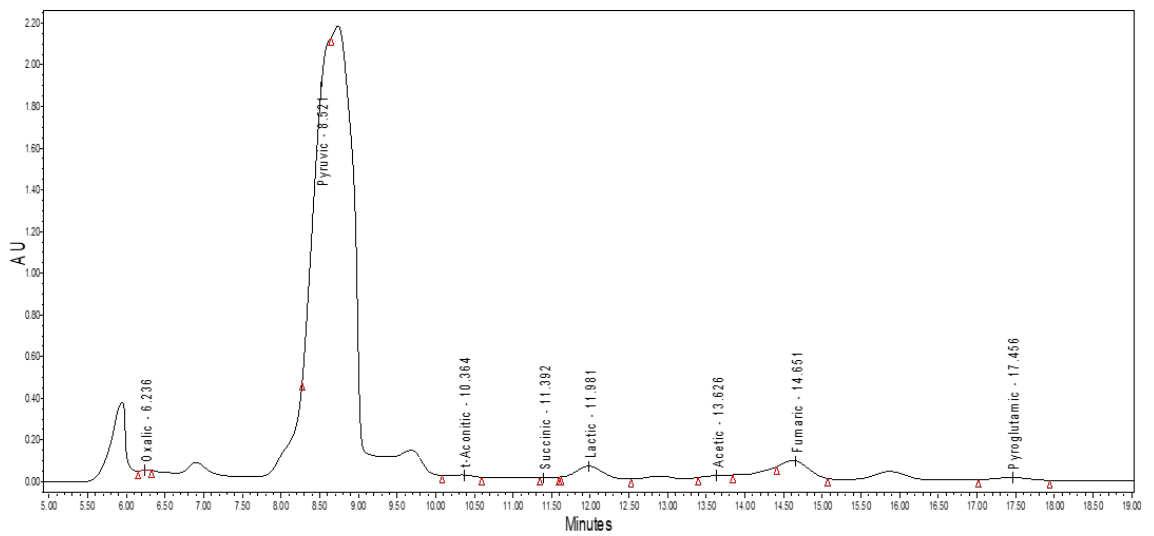


Penicillium rubens EF5

Рисунок Б1 – Органические кислоты, продуцируемые штаммами микромицетов



Talaromyces pinophilus T14

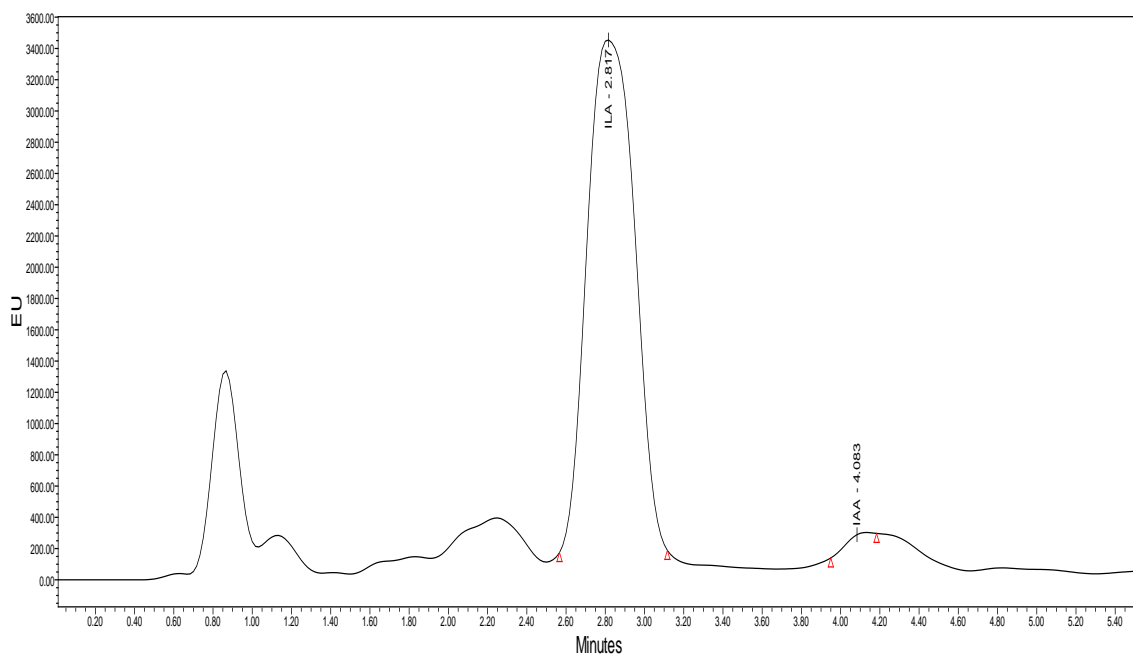


Aspergillus sp. D1

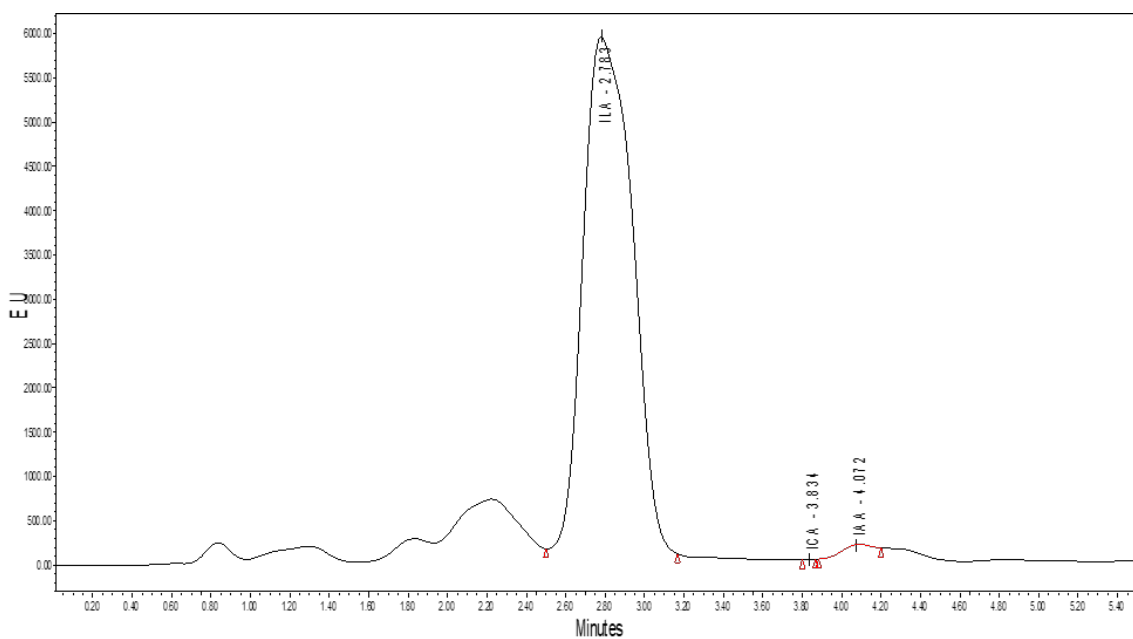
Рисунок Б1 (продолжение) – Органические кислоты, продуцируемые штаммами микромицетов

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Хроматограммы метаболитов с гормональной и сигнальной функциями

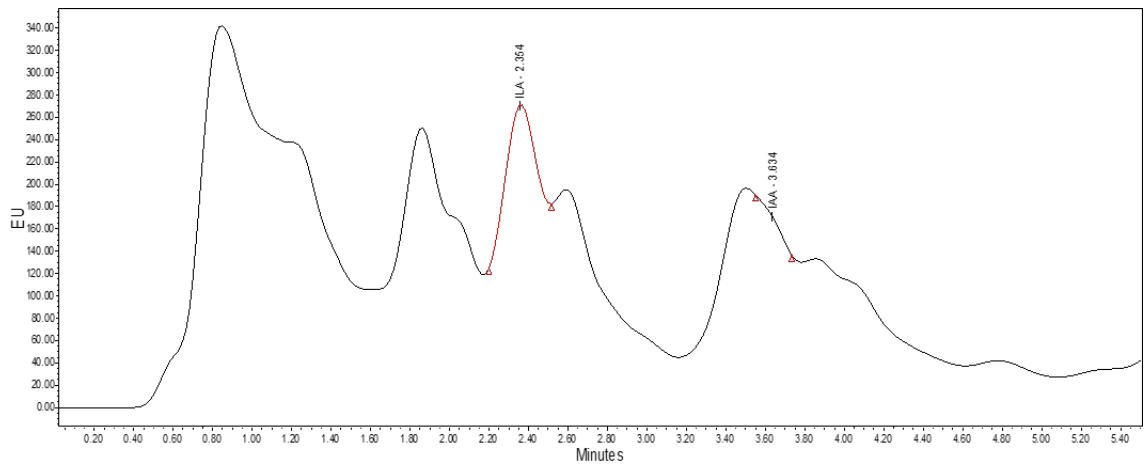


Penicillium bilaiae Pb14

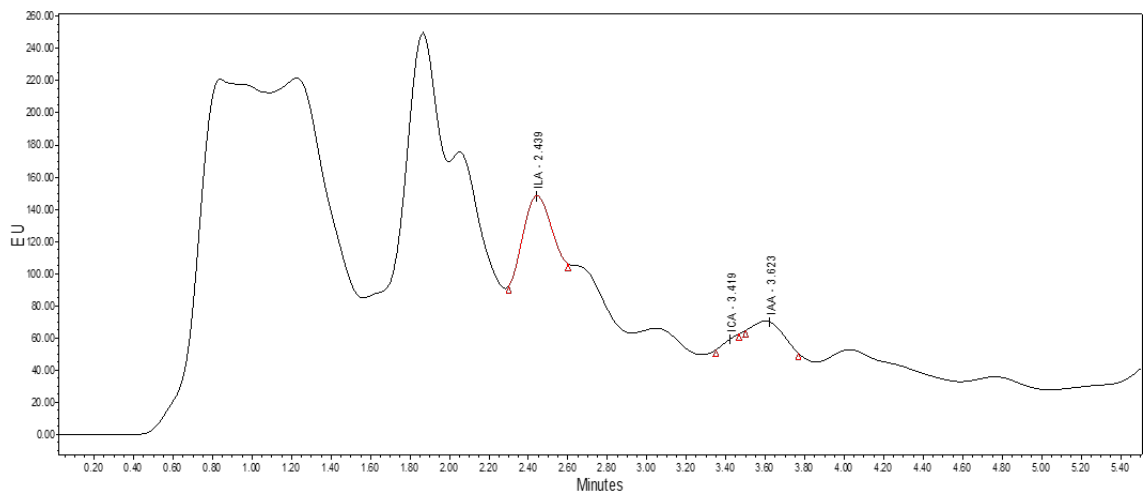


Penicillium bilaiae C11

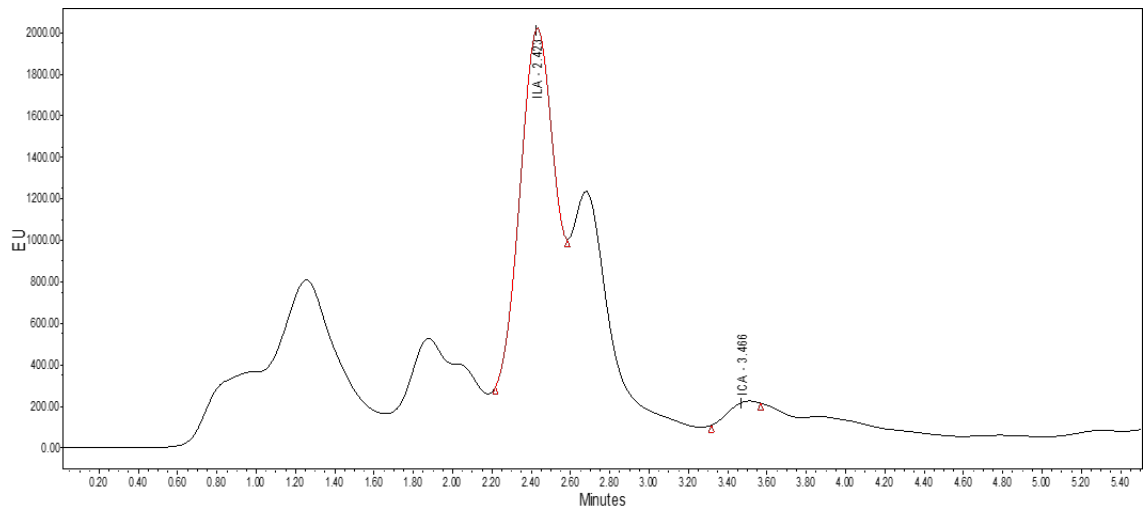
Рисунок В1– Хроматограммы ауксинов, продуцируемых штаммами микроицетов



Penicillium rubens EF5

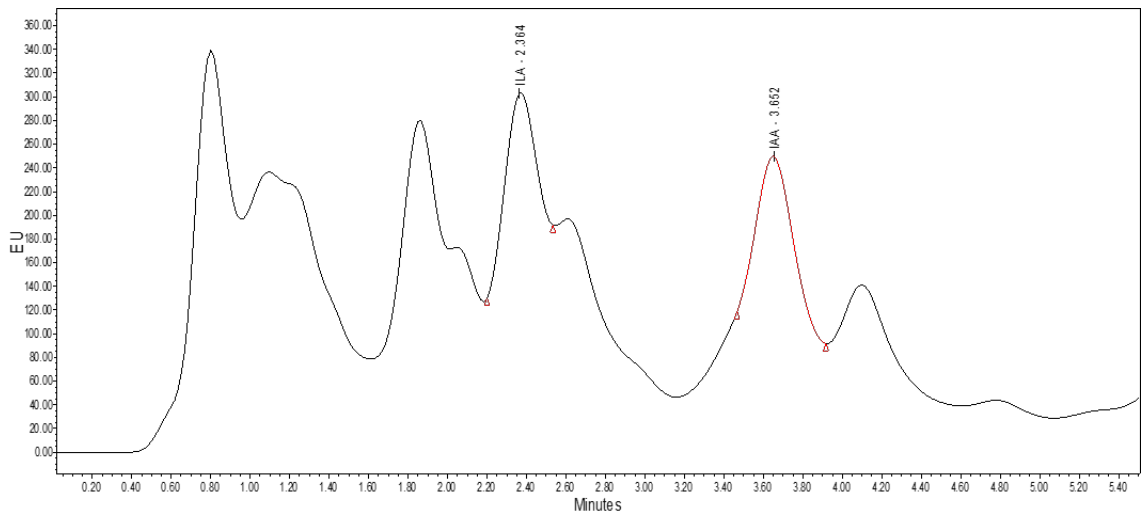


Talaromyces pinophilus T14

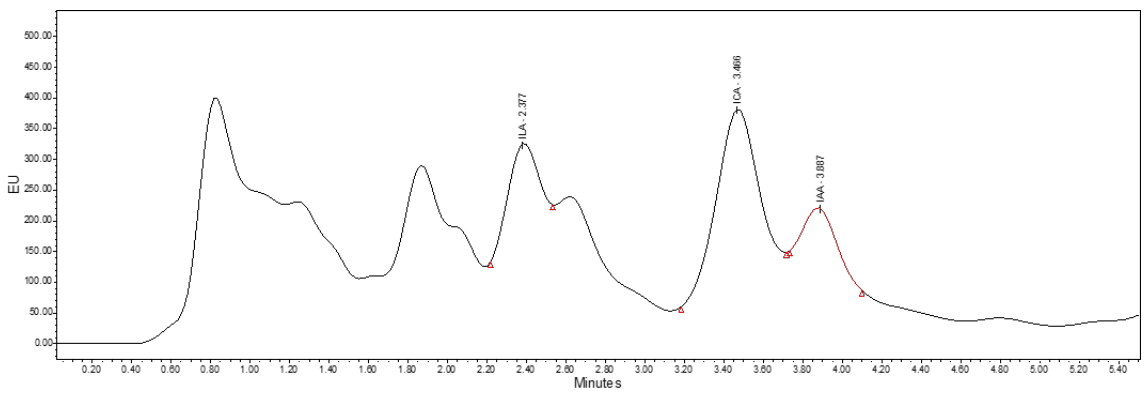


Aspergillus sp. D1

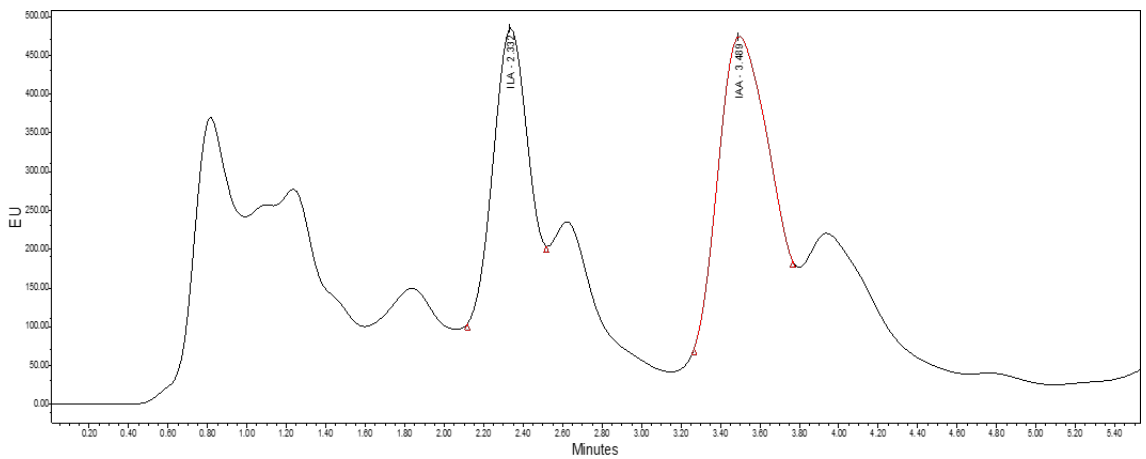
Рисунок В1 (продолжение) – Хроматограммы ауксинов, продуцируемых штаммами микромицетов



Beauveria bassiana T15

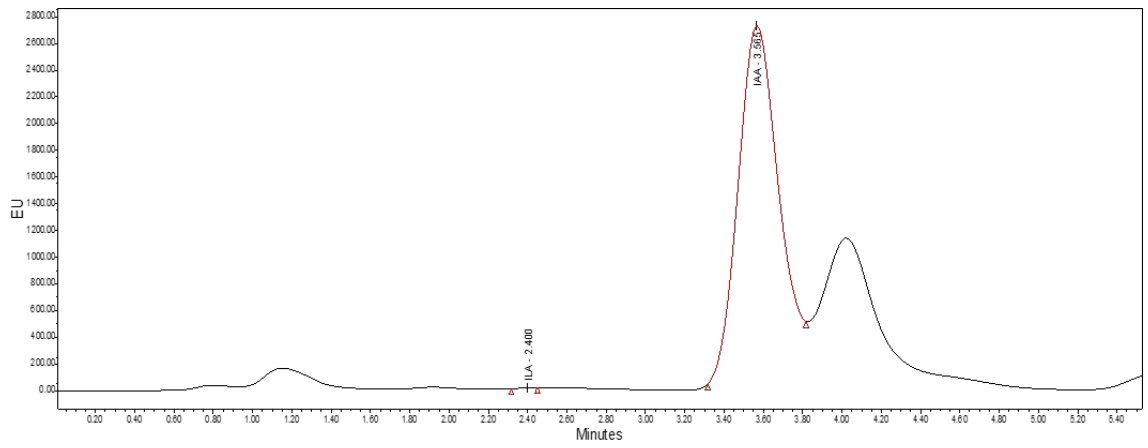


Mortierella sp. EFW1

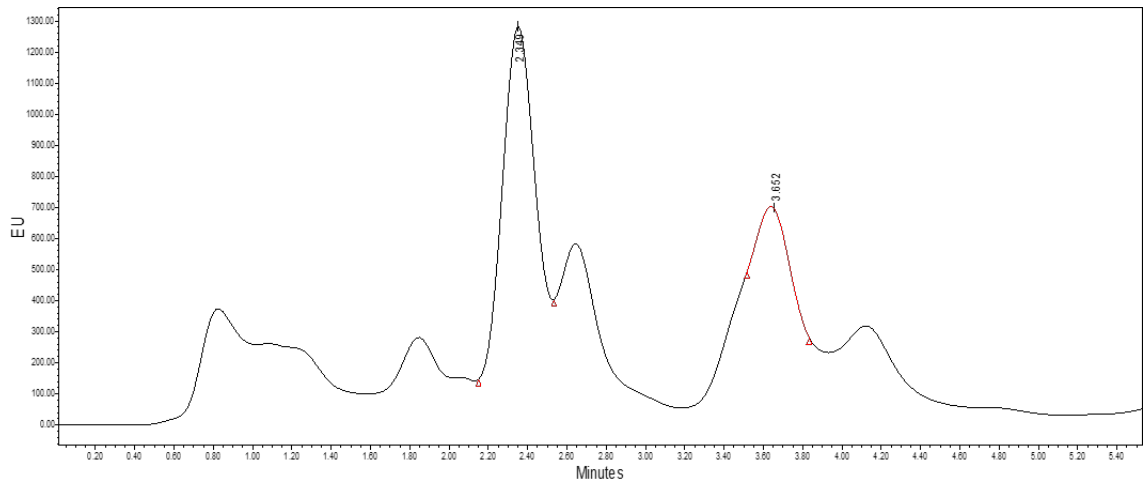


Rhodotorula mucilaginosa MK1

Рисунок В1 (продолжение) – Хроматограммы ауксинов, продуцируемых штаммами микромицетов

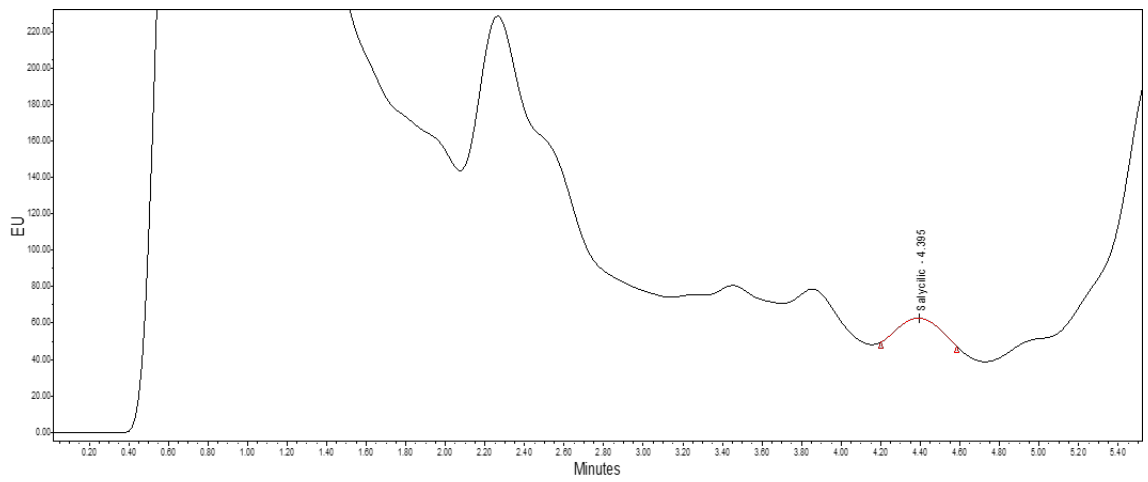


Metschnicowia pulcherrima MP2

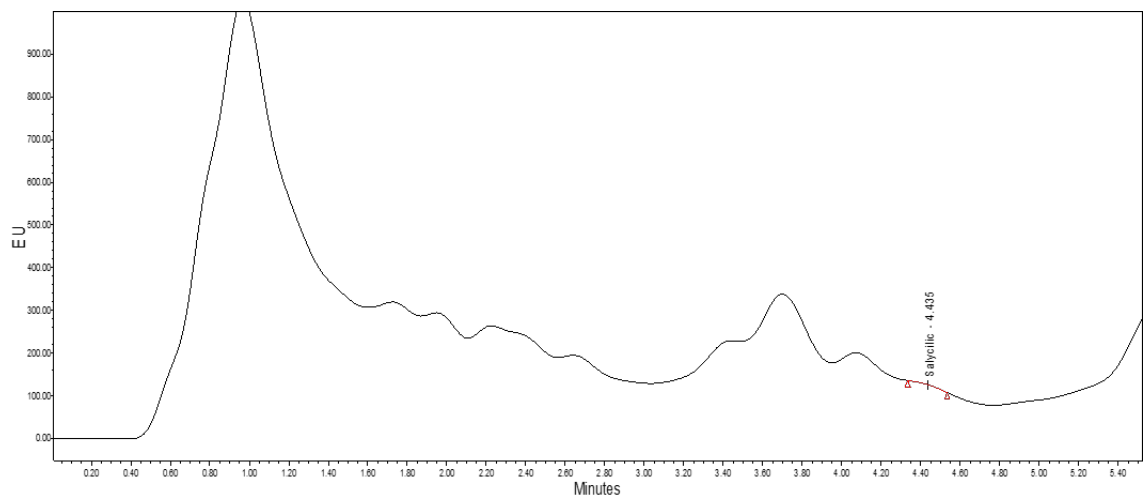


Rhodotorula mucilaginosa RH2

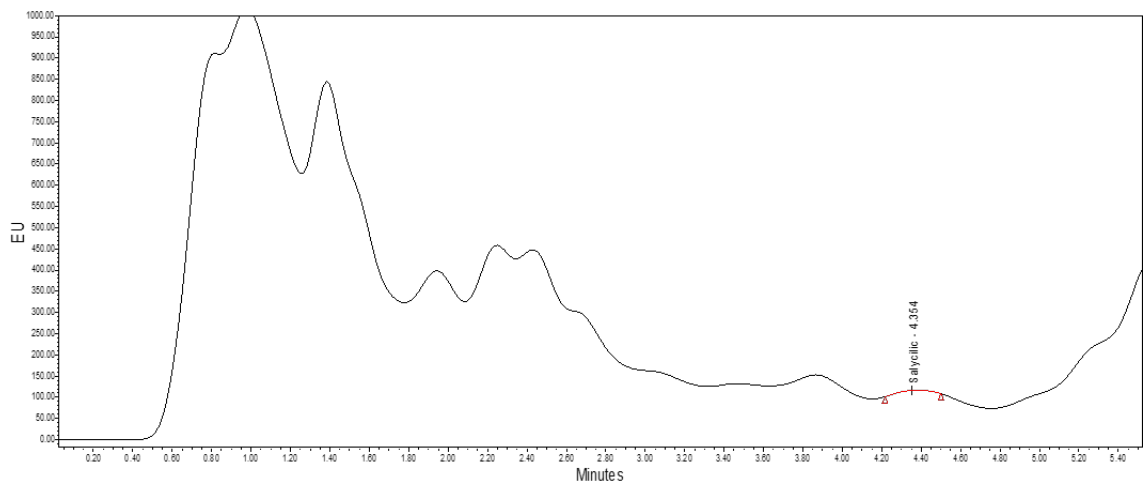
Рисунок В1 (продолжение) – Хроматограммы ауксинов, продуцируемых штаммами микромицетов



Penicillium rubens EF5

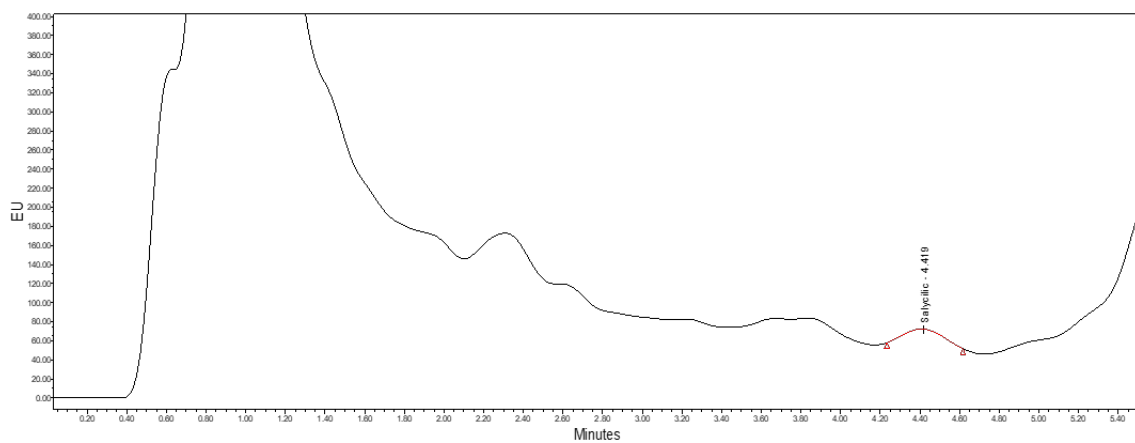


Talaromyces pinophilus T14

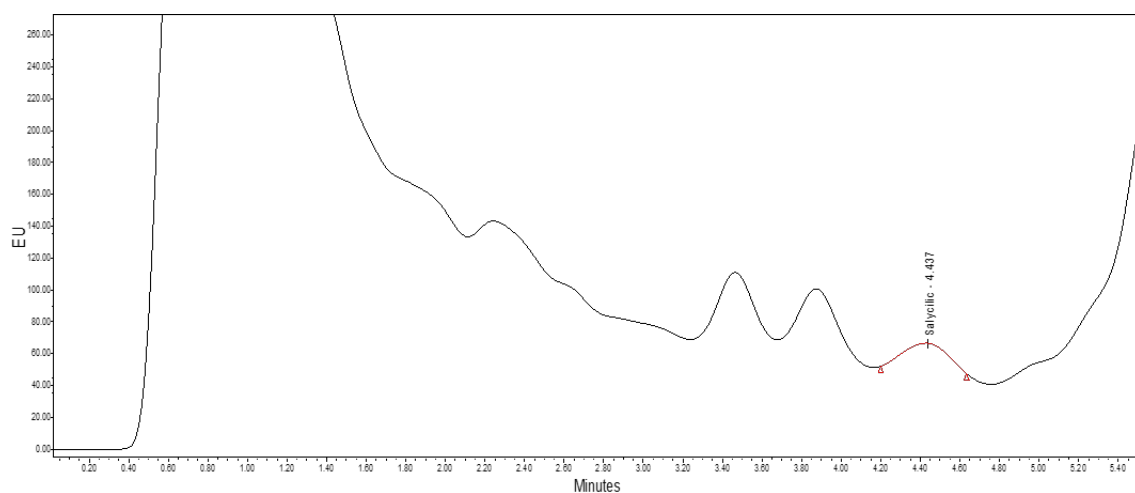


Aspergillus sp. D1

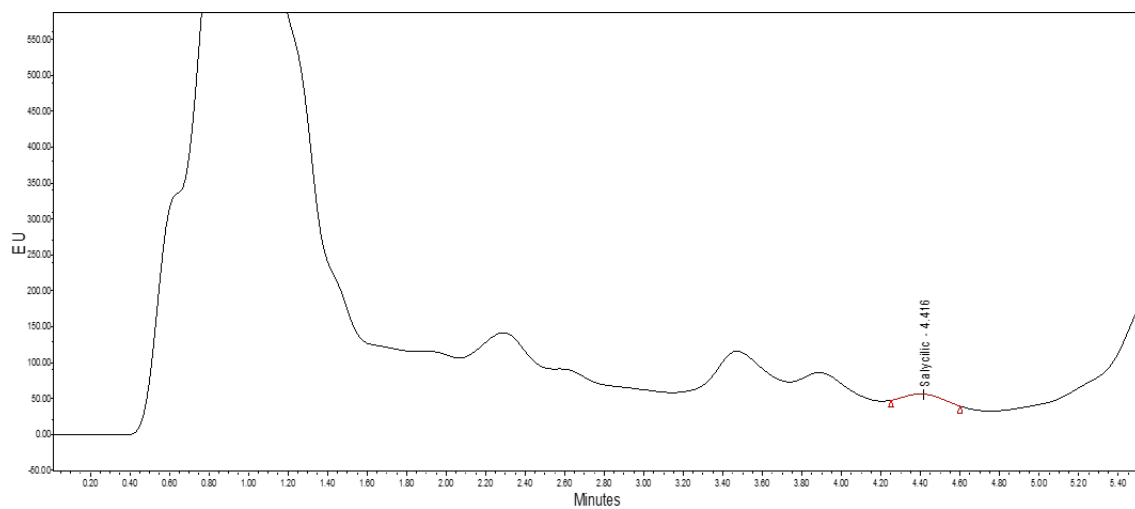
Рисунок В2 - Хроматограммы салициловой кислоты, продуцируемой штаммами микромицетов



Beauveria bassiana T15

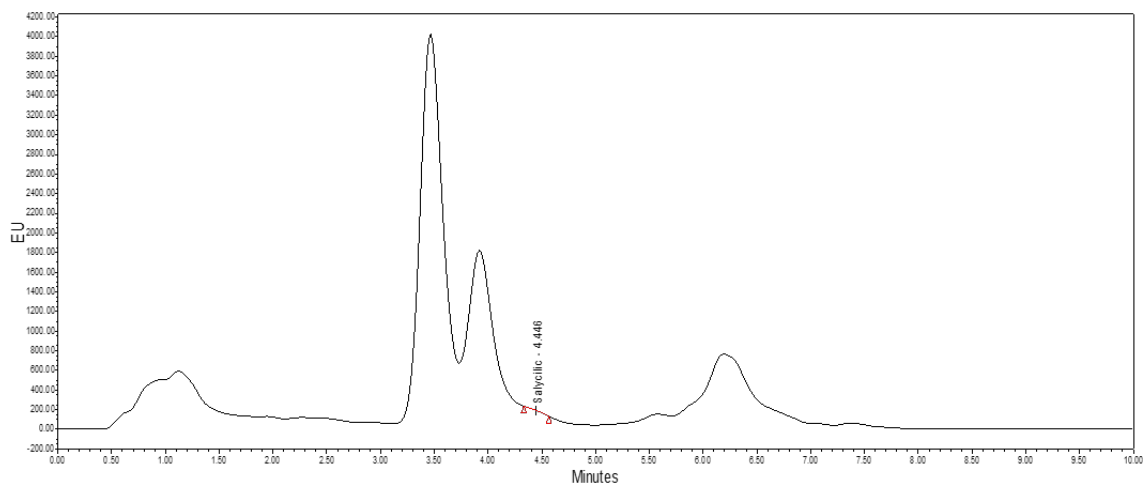


Mortierella sp. EFW1

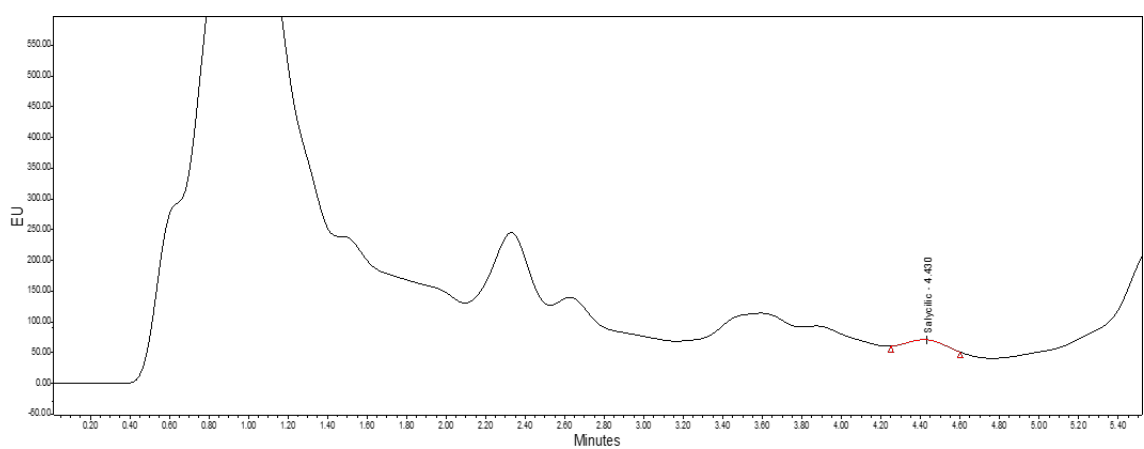


Rhodotorula mucilaginosa MK1

Рисунок В2 (продолжение) - Хроматограммы салициловой кислоты, продуцируемой штаммами микромицетов

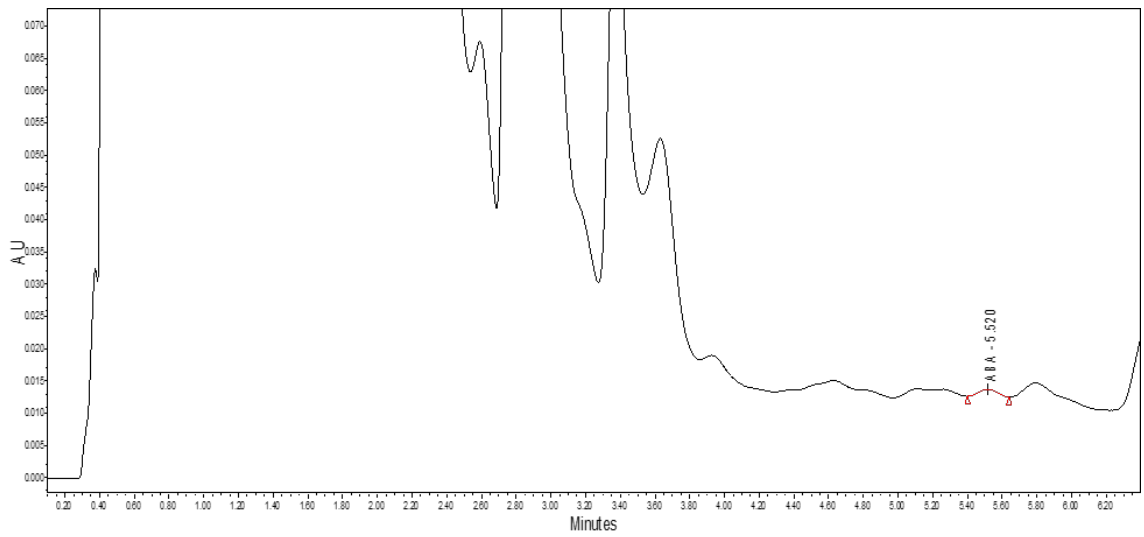


Metschnikowia pulcherrima MP2

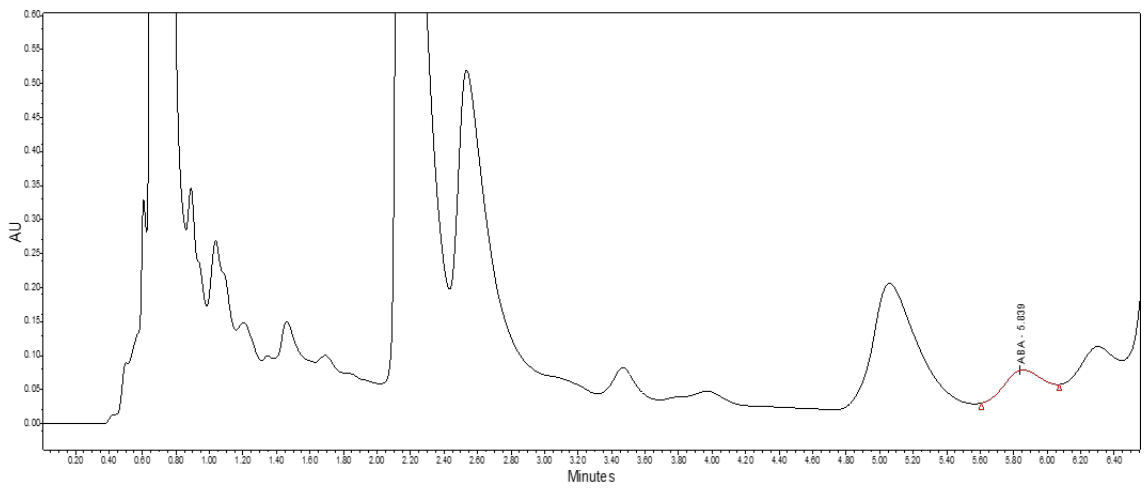


Rhodotorula mucilaginosa RH2

Рисунок В2 (продолжение) - Хроматограммы салициловой кислоты, продуцируемой штаммами микромицетов



Penicillium bilaiae C11



Talaromyces pinophilus T14

Рисунок ВЗ - Хроматограммы абсцизовой кислоты, продуцируемой штаммами микромицетов