

РОЛЬ *TRICHODERMA* В ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ ЦИНКА

А.Ф. Валиулина, Т.И. Голованова

Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия, biolog@krasnou.ru

Аннотация. Цинк (1×10^{-5} моль/л и 5×10^{-5} моль/л) оказывал влияние на физиолого-биофизические показатели растений томатов. Приводил к деградации общего содержания зеленых пигментов, изменению соотношения пулов зеленых и желтых пигментов, происходило снижение скорости электронного потока, квантового выхода у *Solanum lycopersicum*. *Trichoderma* снижала токсическое действие цинка. Их влияние на ростовые процессы растений зависело от содержания цинка в среде, времени его воздействия, от возраста растения.

Ключевые слова: *Trichoderma*, цинк, пигменты, квантовый выход, скорость электронного потока

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-175-179

На рост и развитие растений оказывают влияние целый ряд как абиотических, так и биотических факторов окружающей среды. Во многих случаях эти условия складываются неблагоприятно, что приводит к резкому снижению урожая и даже гибели посевов. Среди многочисленных абиотических факторов особое место занимают тяжелые металлы [Чиркова, 2002]. Тяжелые металлы составляют особую группу загрязнителей, неподверженных биодеструкции и способных аккумулироваться в почвах до токсических концентраций. Токсическое действие тяжелых металлов проявляется в нарушении метаболизма, снижении продуктивности растений. Среди группы тяжелых металлов уникальная роль принадлежит цинку, который в качестве кофактора входит в состав всех известных классов ферментов. Цинк характеризуется высокой интенсивностью поглощения растительностью, а увеличение техногенной эмиссии в окружающую среду делает его одним из опасных загрязнителей биоты [Савочкин, 2012]. Влияние цинка на растения зависит от микроорганизмов-антагонистов, совместно обитающих с растениями, они оказывают положительное влияние на целый комплекс физиолого-биохимических программ, протекающих в растительном организме, обеспечивают их необходимыми элементами питания и регуляторами роста, защищают растения от патогенных микроорганизмов, способствуют повышению устойчивости к различным стрессовым факторам [Кому et al., 2015]. К таким микроорганизмам-антагонистам патогенов относятся грибы рода *Trichoderma* [Голованова, Логинова, 2005], которые являются продуцентами комплекса антибиотических веществ, обладающих высокой физиологической активностью и подавляющие рост и развитие целого ряда фитопатогенных микроорганизмов путем индуцирования системной и локальной резистентности растений. Под действием метаболитов, выделяемых грибом-антагонистом, происходит изменение транспорта и распределение ассимилятов в растении, изменяется биохимическая направленность, увеличивается рост, развитие корневой системы и масса хозяйственно-ценных органов растения, что может быть связано с интенсивностью фотосинтеза.

Цель данного исследования – изучить влияние *Trichoderma asperellum* на биофизические показатели *Solanum lycopersicum*, выращенных при различных концентрациях цинка.

В качестве тест-объекта использовали растения томатов (*Solanum lycopersicum*), сорта Лакомка. Это высокоурожайный, раннеспелый сорт. Растение детерминантное, высотой 55-60 см. В качестве микроорганизмов-антагонистов – грибы *Trichoderma asperellum* штамма МГ-97.

Растения выращивали в условиях естественного освещения в течение 60 суток, освещенность на уровне проростков составляла $300 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, относительная влажность воздуха – $75 \pm 3\%$, температура воздуха колебалась в пределах $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Количество растений в каждом варианте – 50 штук. Перед посевом семян проводили их поверхностную стерилизацию. Часть семян опудривали спорами *Trichoderma asperellum*. Семена проращивали рулонным методом [Бенкен., Хацкевич, 1980]. Проросшие семена помещали в емкости с отстоянной водопроводной водой. На восьмые сутки часть проростков оставляли в емкостях с отстоянной водопроводной водой, а другую помещали в отстоянную водопроводную воду, содержащую цинк в различных концентрациях ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/литр и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/литр).

В качестве контроля использовали растения, семена которых не обработаны спорами *Trichoderma* и выращены на водопроводной воде.

Концентрацию пигментов измеряли спектрофотометрическим методом по молярным коэффициентам экстинкции на приборе Specol 1300 (analytic jena, Германия).

Вычисление концентрации зеленых и желтых пигментов проводили по формулам [Wintermans, Mots, 1965]:

$$C_a = 13,7 \times (D_{665} - D_{720}) - 5,76 \times (D_{649} - D_{720})$$

$$C_b = 25,8 \times (D_{649} - D_{720}) - 7,6 \times (D_{665} - D_{720}),$$

$$C_{\text{кар}} = ((D_{470} - D_{720}) - C_a \times 0,001666 - C_b \times 0,03315) / 0,21, \text{ где}$$

C_a – концентрация хлорофилла *a*, C_b – концентрация хлорофилла *b*, $C_{\text{кар}}$ – концентрация желтых пигментов, D – оптическая плотность раствора при заданной длине волны.

Количество пигментов рассчитывали по формуле:

$$M = (C \times V) / m, \text{ где}$$

C – концентрация пигментов (мг/мл), V – объем навески (мл), m – масса навески (г).

Функциональную активность фотосинтетического аппарата ассимилирующих тканей оценивали по показателям индукции флуоресценции хлорофилла РАМ-флуориметром (Heinz Walz GmbH, Германия) [Walz, 2006].

Определяли реальный квантовый выход фотосистемы II ($Y(II)$) в адаптированном к свету состоянии, учитывали относительную скорость транспорта электронов фотосистемой II (ETR). Для этого проводили регистрацию изменений показателей флуоресценции хлорофилла при фотосинтетической активной радиации в диапазоне от 0 до 800 фотонов/ $\text{м}^2\text{с}$. Данный прибор позволил визуализировать данные параметры. Скорость электронного транспорта (ETR) рассчитывали по формуле:

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

I_{PAR} – интенсивность света, ETR-Factor равен 0,84, который отражает эффективность поглощения фотонов пигментами; $Y(II)$ – эффективность квантового выхода ФС II рассчитывали на основе нулевого F_0 и максимального F_m уровней [Kitajima, Butler, 1975]:

$$Y(II)_m = (F_m - F_0) / F_m.$$

Для статистической обработки экспериментальных результатов использовали пакет программы Microsoft Excel 2007. Оценку достоверности различий средних проводили на основе критерия Стьюдента при уровне вероятности не менее 95%. Достоверность действия фактора проводили с использованием дисперсионного анализа. На рисунках приведены средние арифметические значения с двухсторонним доверительным интервалом из 3-5 независимых экспериментов, каждый из которых проведен в 50 биологических повторностях.

Показателем, который характеризует состояние растений в условиях стресса, является содержание пигментов в листьях растений. Оптимальное соотношение пигментов обеспечивает работу фотосинтетического аппарата и позволяет создавать большой запас ассимилятов для формирования урожая. Пигменты являются фотоакцепторами, от их количества и эффективности работы зависит продуктивность растений. Цинк привел к уменьшению количества хлорофилла *a* и *b*, снижению их отношения, что, возможно, связано с влиянием цинка на их деградацию, что экспериментально было доказано Ауени et al. Отмечено негативное действие цинка на содержание желтых пигментов и на соотношение пулов зеленых и желтых фотосинтетических пигментов.

В качестве показателя состояния и эффективности функционирования фотосинтетического аппарата были использованы параметры флуоресценции, которые широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях [Schreiber, 2004].

Показано, что на 25-е сутки развития растения цинк в концентрации 1×10^{-5} не оказывал существенного воздействия на скорость электронного потока (ETR) растений, кривые скорости электронного транспорта у подверженных и неподверженных стрессу растений совпадали (рис. 1А).

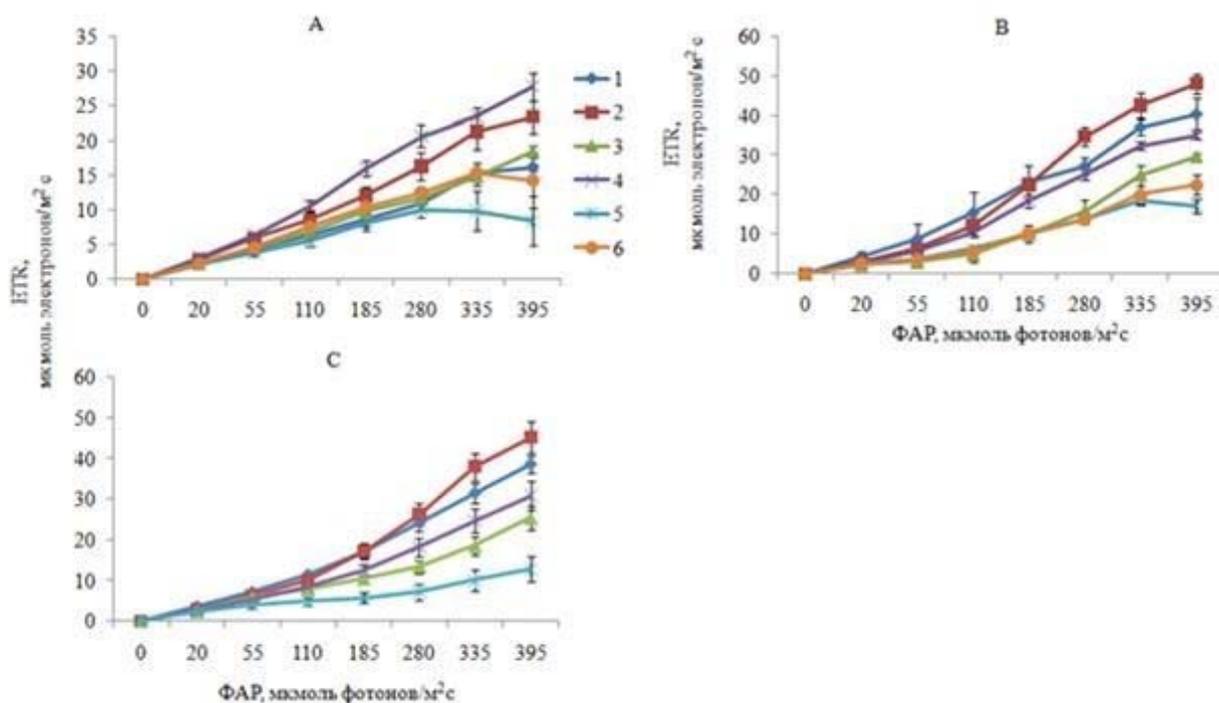


Рис. 1. Влияние цинка на скорость транспорта электронов *Solanum lycopersicum*:

А – на 25 сутки, В – на 45 сутки, С – на 60 сутки

- 1 – растения, выращенные на водопроводной воде;
- 2 – растения, семена которых были обработаны микромицетами;
- 3 – растения, выращенные на растворе, содержащем цинк ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и не обработанные микромицетами;
- 4 – растения, выращенные на растворе, содержащем цинк ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и обработанные микромицетами;
- 5 – растения, выращенные на растворе, содержащем цинк ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и не обработанные микромицетами;
- 6 – растения, выращенные на растворе, содержащем цинк ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и обработанные грибами рода микромицетами.

При увеличении плотности светового потока более 280 мкмоль фотонов/(м²с) - концентрация цинка 5×10^{-5} моль/л - скорость ETR существенно снижалась. Особенно сильный ингибирующий эффект цинка независимо от его концентрации проявлялся на последующих сроках вегетации растений, так на 45-е сутки в третьем и пятом вариантах по сравнению с контролем ETR снизилась в 1,4 и 2,4 раза, соответственно (рис. 1B). Причиной этого являются структурные изменения в листьях и прежде всего более длительное время действия стрессового фактора, приводящее к большим изменениям в синтезе пигментов и, как следствие, уменьшение эффективности работы первичных процессов фотосинтеза.

Trichoderma оказывала существенное влияние на поток электронов. Положительный эффект проявлялся уже на первых этапах развития растений: на 25-е сутки микромицеты увеличивали ETR в 1,4 раза, в 1,5 раза и 1,7 раза, соответственно (рис. 1A). Максимальное действие *T. asperellum* обнаружено на фоне тяжелого металла. Из проведенного статистического анализа данных на 45-е сутки установлена значимая разница по влиянию *Trichoderma* на ETR растений (рис. 1B). На 60-е сутки стимулирующий эффект антагониста не ослабевал и отрицательное воздействие цинка нивелировалось (рис. 1C).

Параметры кинетики флуоресценции хлорофилла обладают большой информативностью для характеристики состояния первичных процессов фотосинтеза. Это связано с тем, что изменения состояния фотосинтетического аппарата сопровождаются изменением вероятности тушения энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла, что проявляется в изменении квантового выхода флуоресценции при освещении. Результаты проведенных исследований не выявили достоверных различий по величине квантового выхода на 25-е сутки между растениями контрольного и опытного вариантов. Существенные различия отмечены на более поздних этапах развития растения. *Trichoderma asperellum* снимала отрицательное действие цинка и увеличивала устойчивость растений к стрессовому фактору.

Таким образом, грибы *Trichoderma asperellum* штамм МГ-97 оказывали положительное влияние на физиолого-биофизические параметры растений *Solanum lycopersicum*, снимали ингибирующее действие цинка и способствовали увеличению устойчивости растений к данному фактору.

Литература

Бенкен А.А., Хацкевич Л.К. Оценка устойчивости растений к почвенным фитопатогенам // Микология и фитопатология. – 1980. – Т. 14, Вып. 6. – С. 531–538.

Голованова Т.И., Логинова Е.А. Реакция фотосинтетического аппарата на обработку растений пшеницы спорами гриба рода *Trichoderma* // Вестник Красноярского государственного университета. Красноярск. – 2005. – С. 210–215.

Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений: учеб. пособие. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2002. – 244 с.

El Komy M.H., Saleh A.A., Eranthodi A., Molan Y.Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato fusarium wilt // Plant Pathology J. – 2015. – V. 31, № 1. – P. 50–60.

IMAGING-PAM M-series chlorophyll fluorometer instrument description and information for users / GmbH: Heinz Walz. – 2006. – 215 p.

Kitajima M., Butler W.L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone // Biochim Biophys Acta. – 1975. V. 376. – P. 105–115.

Schreiber U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse Method: An Overview // *Advances in Photosynthesis and Respiration*. – 2004. – V.19. – P. 279–319.

Wintermans J.F.G.M., De Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1965. – V. 109. – P. 448–453.

THE ROLE OF *TRICHODERMA* IN ENHANCING THE RESISTANCE OF PLANTS TO THE ACTION OF ZINC

A.F. Valiulina, T.I. Golovanova

Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia, biolog@krasnou.ru

Abstract. Zinc (1×10^{-5} mol / l and 5×10^{-5} mol / l) influenced the physiological and biophysical characteristics of tomato plants. Reduced the total content of green pigments, the change in the ratio of pools of green and yellow pigments, the rate of electron flow, quantum yield in *Solanum lycopersicum* decreased. Trichoderma reduced the toxic effect of zinc. Their influence on the growth processes of plants depended on the content of zinc in the medium, the time of its exposure, and the age of the plant.

Keywords: *Trichoderma, zinc, pigments, quantum yield, the velocity of the electron beam*