


Направленная селекция психрофильного штамма *Trichoderma asperellum* Г-034 ВИЗР для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы

И.И. Новикова , Ю.А. Титова , И.В. Бойкова, И.Л. Краснобаева

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия
 e-mail: irina_novikova@inbox.ru; juli1958@yandex.ru


Штаммы рода *Trichoderma* – природные биодеструкторы растительных остатков, высокоактивные антагонисты почвенных фитопатогенов и фиторегуляторы с широчайшим диапазоном оптимальных для своего развития условий, масштабно используются в создании биопрепаратов. Огромное значение в северных регионах России, особенно при выращивании озимых культур, имеет способность штамма микроорганизма, используемого в агротехнологиях, сохранять жизнеспособность и целевую биологическую активность при низких температурах. В связи с этим целью данной работы – отбор психротолерантного штамма *T. asperellum* для ускоренной утилизации основных полимеров растительных остатков и оздоровления почвы при низкой температуре, а также оценка его активности в лабораторных и полевых условиях. В процессе работы решали задачи по отбору психротолерантных штаммов *T. asperellum* с высокой целлюлозолитической активностью; дальнейшей направленной селекции психрофильных штаммов, способных к быстрому росту, активной колонизации растительного субстрата и высокой споропродуктивности при 4–8 °С; оценке целевой активности отселектированного психрофильного штамма в качестве целлюлозолитика и антагонистической активности в отношении фитопатогенов зерновых культур; получению лабораторных образцов препаративных форм путем глубинно-поверхностного культивирования на нестерильном торфе и мультikonверсионных отходах производства съедобных грибов при их последовательном культивировании на одном и том же субстрате и оценке их эффективности в полевых мелкоделяночных опытах. Использовали методы культивирования и создания инокулюма, определения споропродуктивности, модифицированной влажной камеры, оценки антагонистической активности и качества биопрепаратов, организации полевых испытаний, количественных оценок потерь биомассы и содержания целлюлозы и лигнина. Селекцию активного психрофильного штамма для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы осуществили в процессе четырехступенчатого скрининга 29 штаммов *T. asperellum* из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР) с высокими целлюлозолитической и антагонистической активностями. По показателям линейной скорости роста, антагонистической и гиперпаразитической активности при 4–8 °С, высокой скорости колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы отобран перспективный психрофильный штамм *T. asperellum* Г-034 для наработки на его основе лабораторных образцов биопрепаратов и проведения полевых опытов. В полевых испытаниях выявили активное разложение пожнивных остатков кукурузы под воздействием *T. asperellum* Г-034, приводящее к биодеструкции более 80 % целлюлозы и более 20 % лигнина, а за 12 месяцев – к полной потере растительными остатками интактного состояния. Максимальные потери биомассы пожнивными остатками кукурузы за 12 месяцев составили более 70 %. Штамм-продуцент *T. asperellum* Г-034 находился в активном состоянии после перезимовки в полевых условиях в количестве $\times 10^4$ КОЕ/г, приводящем к нарастанию титра с сезонными возрастанием температуры и расширением доступности трофической базы.

Ключевые слова: *Trichoderma asperellum* Г-034 ВИЗР; направленная селекция; психротолерантный штамм-продуцент; психрофильные штаммы-продуценты; мультikonверсионные биопрепараты; биопрепараты для оздоровления почвы; биодеструкторы пожнивных остатков; целевая активность штаммов-продуцентов; эффективность биопрепаратов; разложение растительных остатков.

Для цитирования: Новикова И.И., Титова Ю.А., Бойкова И.В., Краснобаева И.Л. Направленная селекция психрофильного штамма *Trichoderma asperellum* Г-034 ВИЗР для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):328-336. DOI 10.18699/VJ19.497

Controlled breeding of the psychrophilic strain G-034 VIZR of *Trichoderma asperellum* for fast crop residues' polymers utilization and soil enhancement

I.I. Novikova , J.A. Titova , I.V. Boykova, I.L. Krasnobaeva

All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia
 e-mail: irina_novikova@inbox.ru; juli1958@yandex.ru

Genus *Trichoderma* strains as the natural plant residues' biodestructors, highly active antagonists of soil phytopathogens and phyto regulators with the widest range of optimum conditions for their development, are widely used in biologicals development. Of particular importance in Russia's northern regions, especially in winter crop cultivation, is the ability of a

microorganism's strain used in agro-technologies to maintain viability and target biological activity at low temperatures. In this connection, this work purpose is to select a psychrotolerant strain of *T. asperellum* for the rapid crop residues' polymer utilization and soil enhancement at low temperature, as well as to evaluate its activity under laboratory and field conditions. In the work process, the following tasks were addressed: selecting psychrotolerant strains of *T. asperellum* with high cellulolytic activity; further controlled breeding of psychrophilic strains capable of rapid growth, active colonization of plant substrates and high sporulation at 4–8 °C; evaluating the target activity of the selected psychrophilic strain as a cellulolytic as well as antagonistic activity against cereal pathogens; obtaining laboratory samples of bioformulations by deep-surface cultivation on non-sterile peat and multirecycled wastes from the edible mushrooms production and assessing their efficacy in field small-plot trials. The methods for inoculum cultivation, sporulation capacity determination, modified wet chamber, estimating antagonistic activity and biologics' quality, field small-plot trials management, quantitative estimates of biomass losses, cellulose and lignin content were used in the work. The active psychrophilic strain for the rapid crop residues' polymer utilization and soil enhancement controlled breeding was selected during a four-step screening of 29 *T. asperellum* strains from All-Russian Research Institute of Plant Protection (VIZR) State Microorganisms' Collection with high cellulolytic and antagonistic activities. In terms of linear growth rate, antagonistic and hyperparasitic activities at 4–8 °C, a high rate of wheat and maize stubble residues' colonization, a perspective psychrophilic strain G-034 of *T. asperellum* was selected for developing the laboratory samples of biologics and for running field trials. In small-plot trials, the active maize crop residues' decomposition under the *T. asperellum* G-034 influence was revealed, resulting in the complete loss of plant intact state in 12 months due to more than 80 % cellulose and 20 % lignin biodestruction. The maximum loss of maize crop residues biomass for 12 months was more than 70 %. The *T. asperellum* strain G-034 was active after field hibernation in an amount of $\times 10^4$ cfu/g, resulting in a titer increase with seasonal temperature rising and the trophic base bioavailability growth.

Key words: *Trichoderma asperellum* G-034 VIZR; controlled breeding; psychrotolerant strain-producer; psychrophilic strain-producers; multirecycled biologics; biologics for soil inancement; stubble residues' biodestructors; producer strains' target activity; biologics' efficacy; plant residues' destruction.

For citation: Novikova I.I., Titova J.A., Boykova I.V., Krasnobaeva I.L. Controlled breeding of the psychrophilic strain G-034 VIZR of *Trichoderma asperellum* for fast crop residues' polymer utilization and soil enhancement. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):328-336. DOI 10.18699/VJ19.497 (in Russian)

Введение

Улучшению структуры почвы и накоплению гумуса способствует запахивание пожнивных остатков или внесение соломы на поля. При этом снижается эрозия почвы, улучшаются водный и воздушный режимы, ее впитывающая способность, а также стимулируются процессы азотфиксации. При разложении пожнивных остатков в почву поступает на 1 га около 12–15 кг азота, до 7 кг фосфора, 30 кг калия, 4 кг натрия (Лабынцев, Целуйко, 2013). Пожнивные остатки – источник питания почвенных микроорганизмов, которые в значительной степени обеспечивают доступность отдельных нутриентов для сельскохозяйственных растений (Зиганшин и др., 2016). Вместе с тем растительные остатки на полях являются резерватом и источником фитопатогенов – возбудителей болезней сельскохозяйственных культур. Без создания необходимого пула антагонистов, способствующих восстановлению и усилению супрессивности почвы, невозможно стабилизировать фитосанитарную ситуацию в агроценозах, сохранить плодородие и получить высокие урожаи (Новикова, 2007, 2016).

Решению этой проблемы способствует все возрастающее использование микробиологического метода в защите растений. Современные биопрепараты обладают ростостимулирующей активностью, их продуценты выделяют множество биологически активных веществ, подавляющих развитие популяций фитопатогенов, повышающих болезнестойчивость и урожайность сельскохозяйственных растений (Whipps, Lumsden, 2001; Садыкова и др., 2010). Успешность применения микробиологического метода зависит от эффективности агентов биоконтроля. Для создания биопрепаратов наибольший интерес представляют виды и штаммы микроорганизмов, обладающие разнообразием метаболических процессов,

неприхотливостью к условиям культивирования, высокой технологичностью и экологической пластичностью (Nagan et al., 1996; Новикова, 2007, 2016; Зиганшин, Сироткин, 2017). Всеми этими качествами обладают штаммы рода *Trichoderma* – природные биодеструкторы растительных остатков и других целлюлозосодержащих материалов, занимающие особое положение как продуценты полифункциональных биопрепаратов (Коломбет и др., 2001; Boureghda, Renane, 2011). Они способны быстро осваивать органический субстрат путем активного разложения простых и сложных соединений, в десятки раз ускоряя процесс их минерализации и улучшая физико-химические свойства почвы (Алимова, 2005; Vheemaraya et al., 2011; Рязанова и др., 2014). Благодаря высокой антагонистической и гиперпаразитической активности в отношении почвообитающих возбудителей болезней, штаммы *Trichoderma* в 2.5–3 раза снижают заболеваемость растений, повышают их болезнестойчивость, проявляют фиторегуляторную активность за счет стимуляции развития азотфиксирующих бактерий, способствуя обогащению почвы аминным азотом, связыванию солей минеральных удобрений, усилению мобилизации фосфора и калия (Садыкова и др., 2009; Alamri et al., 2012; Devi et al., 2012; Heidi, Abo-Elnaga, 2012; Parra, Maniscalco, 2012). Особое значение в условиях северных регионов России имеет способность штамма микроорганизма, используемого в агротехнологиях, сохранять жизнеспособность и целевую биологическую активность при низких температурах, особенно при выращивании озимых культур.

Целью работы были отбор психрофильного штамма *Trichoderma asperellum* для ускоренной утилизации основных полимеров растительных остатков, оздоровления почвы при низкой температуре и оценка его активности в лабораторных и полевых условиях. Для этого решались

следующие задачи: отбор из «Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей» (ГКМ) Центра коллективного пользования научным оборудованием «Инновационные технологии защиты растений» (ВИЗР) ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР) ФАНО, сайт <http://www.vizrspb.chat.ru> (Постановление Правительства РФ № 725-47 от 24 июня 1996 г., приказ по Министерству сельского хозяйства и Правительству РФ от 15 августа 1996 г., зарегистрирована в WFCC WDCM 760 (Япония) 28.01.98) психрофилерантных штаммов *T. asperellum* с высокой целлюлозолитической активностью; дальнейшая направленная селекция психрофильных штаммов, способных к быстрому росту, активной колонизации растительного субстрата и высокой споропродуктивности при 4–8 °С; оценка целевой активности отобранного психрофильного штамма в качестве целлюлозолитика при колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы, а также антагонистической активности в отношении фитопатогенов зерновых культур; получение лабораторных образцов препаративных форм (ЛЮ) путем глубинно-поверхностного культивирования на различных органических субстратах, в том числе отходах производства съедобных грибов, и оценка их эффективности в полевых мелкоделяночных опытах.

Материалы и методы

Работу проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений с использованием чистых культур из ГКМ ФГБНУ ВИЗР. Объектами исследований были штаммы *T. asperellum* с высокой целлюлозолитической и антагонистической активностью, тест-объектами служили штаммы фитопатогенов зерновых культур – возбудители наиболее вредоносных болезней, и сухие пожнивные остатки пшеницы и кукурузы (табл. 1). Для получения и хранения чистых культур микромицетов для лабораторных опытов *in vitro* использовали питательные среды: синтетическую среду Чапека (ООО «Биокомпас-С», Углич, Россия); полусинтетические (селективные) агаризованные среды на основе растительных экстрактов (картофеля, зерна злаков и т. п.). Растительный субстрат предварительно измельчали и кипятили в течение часа в объеме 200 г/л, фильтровали, восстанавливали до исходного объема с добавлением агар-агара (20 г/л), в некоторых случаях – с добавлением сахарозы (20 г/л). Режим стерилизации для всех сред, содержащих сахара в низкомолекулярной форме, – 30 мин при 0.5–0.8 атм (Методы..., 1982).

Материалами исследований были субстраты для опытно-промышленного культивирования съедобного макромицета *Lentinula edodes* (шии-таке) на основе отходов техногенной сферы, блоки с развивающимся мицелием шии-таке, а также отработанные в процессе жизнедеятельности последнего целлюлозо-лигнинсодержащие отходы. Кроме того, материалами служили мультиконверсионные субстраты, полученные после последовательного культивирования на отработанном отходе производства плодовых тел шии-таке другого вида съедобного макромицета – *Pleurotus ostreatus* НК-35 (вешенка). Используемые для мультибиоконверсии субстраты в интактном и отработанном состояниях имеют оформленный состав

(табл. 2). В отработанных (конверсионных) субстратах все ингредиенты (см. табл. 2) находятся в переработанном предыдущим участником биоконверсии состоянии, происходит накопление водорастворимых легко усваиваемых веществ – аминокислот, витаминов, моносахаридов и др.

При этом наблюдается сужение соотношения азота к углероду, что делает отработанные субстраты наиболее доступными для последующей утилизации как макро-, так и микромицетами и бактериями (Бисько и др., 1986; Бисько, Дудка, 1987; Титова, 2013; Титова и др., 2014, 2017а–в). Превалировал в конверсионных субстратах грибной белок в виде мицелия предыдущего участника биоконверсии, пронизывающего практически всю толщу используемого субстрата (как компонент в табл. 2).

В работе использовали следующие методы исследований: культивирования и создания инокулюма, определения споропродуктивности (титра), модифицированной влажной камеры, оценки антагонистической активности, оценки качества лабораторных образцов биопрепаратов, организации полевых испытаний, количественных оценок потерь биомассы и содержания целлюлозы и лигнина.

Культуры микромицетов поддерживали на агаре Чапека с обеспечением необходимой чистоты материала. Чистые культуры вводили в работу по созданию инокулюмов путем жидкофазной и твердофазной ферментаций при температуре 24–28 °С. Для определения линейного роста изучаемый штамм высевали в центр поверхности агаризованной питательной среды одинакового слоя многочисленным инокулюмом практически однородной плотности. Культивирование вели в условиях холодильной камеры при 4–8 °С. Через определенные промежутки времени (двое суток) измеряли диаметр колоний в двух взаимоперпендикулярных направлениях от точки инокулирования до конца зоны роста мицелия. Повторность пятикратная. Расчетные параметры линейного роста мицелия и споропродуктивности: дифференциальная скорость роста мицелия, представляемая как производная функции приращения диаметра в единицу времени (мм/сут); время наступления спороношения; споропродуктивность (Методы..., 1982).

Определение споропродуктивности штаммов проводили с помощью создания маточных суспензий колониеобразующих единиц (КОЕ) в единице объема, массы и т. п., в которых число КОЕ подсчитывали прямым способом в камере Горяева или путем последовательных десятичных разведений маточной суспензии. Наиболее оптимальное для количественного и качественного учета споропродуктивности серийное разведение маточной суспензии КОЕ исследуемого штамма высевали на агаризованные среды (Лилли, Барнетт, 1953; Методы..., 1982). Для оценки целевой активности штаммов *T. asperellum* при колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы использовали метод модифицированной влажной камеры в чашках Петри. Кусок фильтровальной бумаги обрезали по размеру камеры и помещали в ее основание. Чашки Петри с фильтровальной бумагой стерилизовали автоклавированием при 132 ± 2 °С в течение 1 ч. Далее образцы (по 10 г сухих пожнивных растительных остатков пшеницы и кукурузы) помещали поверх фильтровальной бумаги так, чтобы отрезки стеблей закрыли основание, но

Table 1. Micromycete strains studied

Species	Characterization	Origin
<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. et Nirenberg (29 strains)	Deposited and categorized in the State Micro-organism Collection of the All-Russia Institute of Plant Protection (SCM FSBSI VIZR)	Leningrad region (LR). Natural conditions (NC)
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. (strains 173 and 11D)	Deposited and categorized in SCM FSBSI VIZR (<i>Fusarium</i> fungi)	LR, NC (wheat and barley root rot)
<i>F. sambucinum</i> Fuckel	»	»
<i>F. graminearum</i> Schwabe	»	LR, NC (in the <i>Fusarium</i> head blight complex)
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb., mycotoxins' producer	»	»
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl., mycotoxins' producer	Deposited and categorized in SCM FSBSI VIZR	LR, NC (in leaf spot complex)
<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kuhn.	»	LR, NC (wheat and barley root rot)
<i>Cochliobolus sativus</i> (S. Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur	»	LR, NC (in leaf spot complex and cereal root rot)

Table 2. Composition of intact (for inoculation with edible basidiomycetes) and multirecycled substrates

Edible macromycete species	Substrate*	
	for inoculation	wasted (recycled)
<i>L. edodes</i>	Sawdust of hardwood trees, wheat bran (10% of the substrate weight), CaCO ₃ (whitening) 0.1%, CaSO ₄ ×7H ₂ O (gypsum) 1%	Sawdust of hardwood trees, wheat bran (10% of the substrate weight), CaCO ₃ (whitening) 0.1%, CaSO ₄ ×7H ₂ O (gypsum) 1%, shiitake mycelium deep in the substrate
<i>L. edodes</i> + <i>P. ostreatus</i> HK-35	Sawdust hardwood trees, wheat bran (10% of the substrate weight), CaCO ₃ (whitening) 0.1%, CaSO ₄ ×7H ₂ O (gypsum) 1%, shiitake mycelium deep in the substrate	Sawdust hardwood trees, wheat bran (10% of the substrate weight), CaCO ₃ (whitening) 0.1%, CaSO ₄ ×7H ₂ O (gypsum) 1%, shiitake and oyster mushrooms mycelium deep in the substrate

* Percentages are indicated with respect to substrate weight at 70% humidity.

не накладывались друг на друга. Добавляли достаточное количество стерильной дистиллированной воды, чтобы образец был погружен в воду. Затем чашки закрывали и инкубировали 1 сут при комнатной температуре для выпитывания образцами максимального количества воды. На следующий день остатки воды сливали, образцы инокулировали 2 мл суспензии исследуемого штамма с титром × 10⁸ КОЕ/мл. Образцы инкубировали в течение 14 сут в термостатированных условиях как при 24–28 °С, так и при 4–8 °С в темноте. В последующие сутки воды не добавляли. Влажные камеры ежедневно просматривали в течение периода инкубации, на ранних сроках развития с использованием лупы с увеличением ×16–54 или бинокулярной лупы (Методы..., 1982).

Для оценки антагонистической активности отобранных штаммов *T. asperellum* на тест-объектах в лабораторных опытах *in vitro* использовали метод встречных культур на агаризованных питательных средах (Рудаков, 1981, 1986; Методы..., 1982; Егоров, 2004; Алимова, 2005; Богданов, Титова, 2014). Исследовали взаимодействие четырех отобранных психрофильных штаммов *T. asperellum* Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034 с восемью видами фитопатогенных микромицетов – возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур: *F. oxysporum* 173, 11Д, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *A. alternata*, *R. solani*, *C. sativus* (см. табл. 1). Для встречных культур использовали агар Чапека. Культивирование проводили в термо-

статах при 24–28 и 4–8 °С в темноте. Вносили взаимодействующие культуры немногочисленным инокулюмом практически однородной плотности (уколом) в центр половины чашки Петри. Повторность опытов пятикратная. Регистрацию производили ежедневно в течение 30 сут до и после образования зоны контакта культур.

Количественной характеристикой антагонистической активности штаммов *T. asperellum* служили изменения скоростей роста мицелия участников взаимодействия. Качественную характеристику типов взаимоотношений изучаемых микромицетов определяли в соответствии с классификацией взаимодействий мицелиев, разработанной на основе качественных параметров взаимодействий мицелиев: наличие границы между колониями; переплетение гиф с образованием мицелиального валика различной структуры, текстуры, размера и плотности и без него; пигментация зоны контакта; наличие зоны отталкивания или барража; ускорение, замедление или остановка роста колонии (Богданов, Титова, 2014). Показатели гиперпаразитической активности штаммов по отношению к тест-культурам рассчитывали, исходя из зависимости соотношения площадей, занимаемых культурами штаммов исследуемых объектов взаимодействия, от роста культур: исследуемый штамм *T. asperellum* обладает гиперпаразитической активностью, если соотношение площадей, занимаемых культурами, будет не менее 1.9 (ТУ 9291-005-59147141-2006).

Полевые испытания проводили на участке со взаимно ортогональной организацией опыта со сплошным размещением организованных повторений стандартного размещения вариантов общей площадью 133.0 м² (66.5 × 2 м): три повторности на вариант опыта (19 вариантов), учетная делянка – 2.0 м² (1 × 2 м); защитная полоса – 1.0 м² (0.5 × 2 м), с убранной основной культурой (кукуруза) и максимально измельченными, запаханнами в почву пожнивными остатками. Повторность опыта трехкратная (Доспехов, 1979).

Для полевых испытаний эффективности были разработаны ЛО гранулированных мультиконверсионных и торфяных биопрепаратов на основе *T. asperellum* Г-034 с титрами: торфяной – ЛО Г-034, П (2.1 × 10⁸ КОЕ/г); мультиконверсионные – ЛО Г-034, ШГ (шиитачный) (0.9 × 10⁸ КОЕ/г) и ЛО Г-034, ШВГ (шиитачно-вешеночный) (1.1 × 10⁸ КОЕ/г). В полевых мелкоделяночных опытах для оценки эффективности использовали следующие нормы применения ЛО: 2.5, 5 и 10 г/м² при норме расхода рабочего раствора 1.5 л/м². Для проведения опыта готовили водные суспензии образцов биопрепарата и вносили их в почву путем полива. В контроле почву поливали водой.

Качество ЛО оценивали по титрам и степени контаминации: по культуральным признакам и с помощью последовательных серийных разведений. Учет результатов полевых испытаний проводили на 10-е, 20-е, 30-е, 180-е и 360-е сутки, дважды через 6 мес после применения биопрепаратов (6 и 12 мес). Анализировали смешанные усредненные почвенные пробы с пожнивными остатками по показателям числа КОЕ/г штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034 в почве учетных делянок, его жизнеспособности и целевой активности, колонизации пожнивных остатков кукурузы и их габитусу, потерям биомассы растительными остатками и изменению содержания мажорных компонентов (целлюлозы и лигнина). В процессе лабораторного контроля полевого опыта 20 смешанных усредненных почвенных проб из вариантов полевого опыта (примерно по 300 г каждая) помещали в керамические вазоны объемом 1 л и выдерживали в условиях 22–25 °С и перманентного увлажнения в течение 6 мес для обеспечения разложения остатков кукурузы комплексом почвенных микроорганизмов на естественном фоне, а также с внесением психрофильного штамма *T. asperellum* Г-034 в разных нормах применения ЛО. Выявление штамма-продуцента и его жизнеспособности в образцах почвы проводили ежемесячно.

Для оценки степени разложения пожнивных остатков применяли визуальные и органолептические характеристики состояния (габитуса) ткани стеблей и корневой шейки кукурузы. Перед проведением химических анализов образцы пожнивных остатков кукурузы высушивали до воздушно-сухого состояния, измельчали на электрической мельнице и просеивали через сито с диаметром пор 1 мм. Содержание целлюлозы определяли по ГОСТ 31675-2012, лигнина – по ГОСТ 26177-84, влажность остатков – по ГОСТ 13525.19-91. Также определяли процентное содержание целлюлозы и/или лигнина от веса исходной пробы растительных остатков по формуле $C = 100 \times m_i / m_0 - m_0 \times \rho$, где ρ – влажность образца растительных остатков; m_i – масса искомого биополимера

(целлюлоза, лигнин); m_0 – общая масса образца растительных остатков (Оболенская и др., 1955; Schwanninger, Hinterstoisser, 2002). Статистическую оценку результатов и визуализацию материала производили с помощью программных пакетов Excel 2010 и STATISTICA 6.

Результаты

Селекцию активного психрофильного штамма рода *Trichoderma* для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы осуществили в процессе четырехступенчатого скрининга 65 штаммов *T. asperellum* из ГКМ ФГБНУ ВИЗР с высокими целлюлозолитической и антагонистической активностями. На первом этапе было отобрано 29 психрофильных штаммов *T. asperellum*, недостоверно различающихся по скорости роста при 4–8 и 26–28 °С (табл. 3).

Table 3. *T. asperellum* growth dynamics at 4–8° C

Strain accession no.	Mean growth rates at 4–8 °C, mm/per day		
	5 days	7 days	10 days
G-001	6.4	11.8	8.5
G-002	4.1	4.3	6.8
G-003	4.3	6.2	7.5
G-004	7.0	12.0	8.5
G-005	4.1	3.2	5.6
G-006	3.0	2.1	3.4
G-007	6.5	11.5	8.5
G-011	4.2	5.9	7.3
G-012	3.5	3.6	3.5
G-016	4.4	8.8	8.5
G-018	3.6	10.7	8.5
G-020	2.2	4.4	3.5
G-021	3.7	6.5	7.7
G-022	2.8	5.7	7.3
G-024	5.6	9.9	8.5
G-025	6.4	10.7	8.5
G-026	2.6	5.6	7.6
G-027	2.0	3.6	3.5
G-029	4.5	5.7	7.0
G-030	2.7	5.0	8.0
G-033	1.0	4.9	7.8
G-034	6.8	11.9	8.5
G-035	3.4	5.5	7.7
G-039	3.4	9.4	8.5
G-040	4.6	9.1	8.5
G-045	5.3	10.2	8.5
G-047	0.6	4.3	7.4
G-049	5.2	6.2	8.5
G-051	3.4	6.0	7.9
HCP _{0.5}	0.2	1.2	0.8

На втором этапе из этих 29 штаммов были отобраны 5 психрофильных штаммов (Г-001, Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034), отличающихся высокими скоростями роста и спорпродуктивностью при низких температурах (4–8 °С). При исследовании антагонистической активности отселектированных штаммов на второй ступени скрининга были отобраны 4 штамма (Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034), показавшие высокие начальные скорости линейного роста при взаимодействии с тест-культурами фитопатогенных грибов. Максимальную начальную скорость роста при взаимодействии с тест-культурами выявили у штамма Г-034 *T. asperellum*:

Штамм	Средняя скорость роста, мм/сут
Г-004	1.52
Г-007	1.94
Г-025	1.51
Г-034	2.11
НСР _{0,5}	0.2

Анализ антагонистической активности отобранных штаммов Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034 выявил как неполный, так и полный паразитизм *T. asperellum* на большинстве тест-культур и при высоких, и при низких температурах встречного культивирования (Богданов, Титова, 2014). В табл. 4 приведены коэффициенты гиперпаразитической активности отобранных штаммов, соответствующие неполному и полному паразитизму в отношении *F. oxysporum* 173, *F. oxysporum* 11Д, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *A. alternata*, *R. solani*, *C. sativus*.

По совокупности психрофильных показателей – высокой скорости линейного роста и высоким коэффициентам гиперпаразитической активности при 4–8 °С – для оценки эффективности колонизации пожнивных остатков был отобран штамм *T. asperellum* Г-034. Было показано, что в лабораторных условиях колонизация пожнивных остатков пшеницы и кукурузы при 26–28 °С произошла в течение 2 сут с формированием обильного спороношения штамма *T. asperellum* Г-034 на растительных остатках. Таким образом, отобранный психрофильный штамм *T. asperellum* Г-034 обладает высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микромикетов – возбу-

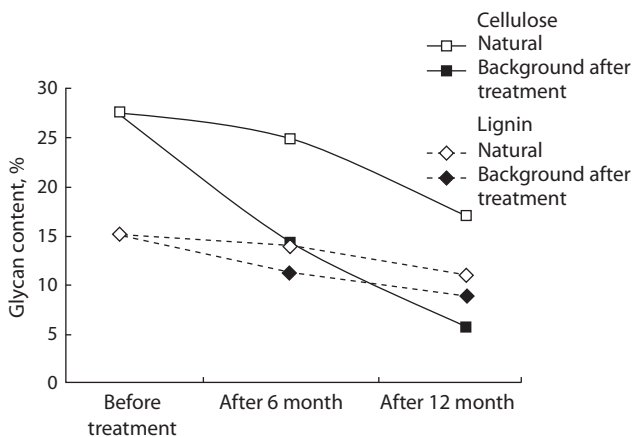
дителей фузариозов и пятнистостей зерновых культур, и способностью эффективно колонизировать растительные остатки в модельных лабораторных опытах.

На следующем этапе исследований необходимо было поработать ЛО препаративных форм и оценить способность штамма-продуцента утилизировать полимеры растительных остатков в условиях полевых испытаний. ЛО на основе штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034 получены путем иммобилизации нестерильного торфа, а также дву- и трехступенчатой биоконверсии отходов сельского хозяйства и деревоперерабатывающей промышленности, первично конвертированных *L. edodes*, далее *P. ostreatus* НК-35 с титрами 2.1×10^8 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 КОЕ/г соответственно. В контроле полевого опыта аборигенных штаммов *Trichoderma* не было выявлено.

После двукратного применения с 6-месячным переывом ЛО гранулированных биопрепаратов штамм-продуцент *T. asperellum* Г-034 при всех испытанных нормах применения находился в активном и жизнеспособном состоянии в количестве $\times 10^4$ КОЕ/г. Потери биомассы растительных остатков кукурузы перманентно за 10, 20, 30, 180 и 360 сут в два раза превышали этот показатель в контроле с увлажненными пожнивными остатками без обработки *T. asperellum* Г-034. Максимальное снижение биомассы по отношению к воздушно-сухим пожнивным остаткам растений без обработки за 10, 20, 30 и 180 сут составило 5.4, 10.5, 13.8 и 74.7 % соответственно, а по отношению к увлажненным пожнивным остаткам без обработки биопрепаратами – 1.8, 6.1, 11.4 и 72.7 % соответственно. Наблюдали сходное во всех вариантах опыта общее состояние растительных остатков (габитус): изменения цвета до темно-бурого и серого; легкость скручивания и разрыва тканей как мелких, так и крупных фрагментов; оголение лигнинового скелета во фрагментах остатков стеблей; мацерацию кутикулярного слоя и лигнинового остова мелких фрагментов стеблей; полную мацерацию фрагментов листовых пластинок. Габитус разлагаемых остатков кукурузы после двукратного применения штамма (12 мес. с перезимовкой в поле) соответствовал практически полному оголению и значительной мацерации лигнинового скелета стеблей кукурузы. Наряду с исследованием габитусов растительных остатков кукурузы, про-

Table 4. Hyperparasitic activity coefficients of selected *T. asperellum* strains in the interaction with test objects

Test object	G-004		G-007		G-025		G-034	
	Temperature, °C							
	26–28	4–8	26–28	4–8	26–28	4–8	26–28	4–8
<i>F. oxysporum</i> 173	1.79	2.55	1.92	3.21	1.92	2.37	2.21	2.06
<i>F. oxysporum</i> 11D	1.21	1.14	1.57	1.57	1.57	1.29	1.57	1.68
<i>F. sambucinum</i>	2.75	1.68	1.92	3.47	2.21	1.57	2.21	2.37
<i>F. graminearum</i>	1.79	1.92	1.79	1.79	1.79	2.21	1.11	1.92
<i>F. sporotrichioides</i>	2.21	1.47	2.37	2.37	2.55	2.55	2.21	1.79
<i>A. alternata</i>	1.38	2.55	1.29	2.96	1.57	2.96	1.07	2.96
<i>R. solani</i>	1.57	1.47	1.68	1.47	1.68	1.29	1.68	1.11
<i>C. sativus</i>	1.57	6.02	2.21	6.02	2.21	6.02	1.68	6.02



Variation of cellulose and lignin contents in corn crop residues after treatments with a granulated lab specimen (LS, G) based on *T. asperellum* G-034 strain (substrate multirecycled with Shiitake-Oyster mushrooms) at the application rate 10 g/m².

вели реизоляцию штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034, осуществляющего их разложение в комплексе почвенных микроорганизмов естественного фона, присутствующего во всех вариантах опыта. Содержание целлюлозы в растительных остатках после обработки ЛО биопрепаратов на основе *T. asperellum* Г-034 при нормах применения 5 и 10 г/м² уменьшилось в 2 раза за 6 мес. и в 5 раз за 12 мес., а содержание лигнина – в 1.5 раза за 6 мес. и в 2 раза за 12 мес. В контроле содержание целлюлозы и лигнина в растительных остатках на естественном фоне за 6 и 12 мес. снизилось незначительно (см. рисунок).

Обсуждение

Таким образом, по показателям линейной скорости роста, антагонистической и гиперпаразитической активности при 4–8 °С, высокой скорости колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы отобран перспективный психрофильный штамм *T. asperellum* Г-034 для наработки на его основе лабораторных образцов биопрепаратов и проведения полевых опытов. Мелкоделяночные полевые испытания показали высокую эффективность штамма *T. asperellum* Г-034 для ускоренного разложения растительных остатков кукурузы и оздоровления почвы. При проведении исследований по лабораторному контролю полевого опыта выявили активное разложение пожнивных остатков кукурузы под воздействием почвенных микроорганизмов-антагонистов, а главное, под воздействием высокоактивного психрофильного штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034, приводящее к полной потере за 12 мес. интактного состояния растительными остатками за счет биодеструкции более 80 % содержащейся в них целлюлозы и более 20 % лигнина, обеспечивающего механическую прочность. Максимальные потери биомассы пожнивными остатками кукурузы за 12 мес составили более 70 %. Штамм-продуцент *T. asperellum* Г-034 после перезимовки в полевых условиях находился в активном состоянии в количестве $\times 10^4$ КОЕ/г, приводящем к нарастанию титра с сезонными возрастанием температуры, увеличением и расширением биодоступности трофической базы.

Микромицеты *Trichoderma* spp. занимают особое положение как продуценты полифункциональных биофун-

гицидов, синтезирующих богатые комплексы гидролаз. Для реализации антагонистической активности у этой группы микромицетов синтез гидролитических ферментов, таких как хитиназы, глюканы, протеазы и липазы, лизирующих клеточные стенки фитопатогенных грибов и разрушающих ряд эффективных молекул фитопатогенов, имеет определяющее значение (Benítez et al., 2004; Аринбасарова и др., 2017). В ряде работ приведены данные о способности штаммов *Trichoderma* существенно обогащать почву подвижными и доступными для растения формами питательных веществ, участвуя в разложении органических соединений (Kubicek et al., 2001; Алимова и др., 2006). Очевидно, именно этим обусловлено повышение эффективности усвоения азота вследствие активизации развития популяций азотфиксаторов и, в целом, биологической активности почв.

Заключение

Микромицеты рода *Trichoderma*, обладая высокой гиперпаразитарной и антагонистической активностью в отношении почвообитающих возбудителей болезней, синтезируют широкий спектр биологически активных веществ, повышают болезнестойчивость и продуктивность растений (Коломбет и др., 2001; Алимова и др., 2006; Садыкова и др., 2009). Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, а также позволяют существенно расширить возможности применения штаммов *Trichoderma* для разложения растительных остатков и биоконтроля почвообитающих фитопатогенных видов при низких температурах, характерных для северных регионов России.

Список литературы / References

- Алимова Ф.К. *Trichoderma*/Нупоцреа (Fungi, Ascomycetes, Нупоцреалес): таксономия и распространение. Казань, 2005.
[Alimova F.K. *Trichoderma*/Нупоцреа (Fungi, Ascomycetes, Нупоцреалес): Taxonomy and Distribution. Kazan, 2005. (in Russian)]
- Алимова Ф.К., Тухбатова Р.И., Тазетдинова Д.И., Кабрера Ф.Х.А., Каримова Л.Ю. Взаимоотношения *Trichoderma*, распространенной на территории Республики Татарстан, с микроорганизмами и растениями. Грибы и водоросли в биоценозах: Материалы междунар. конф., посвящ. 75-летию биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Москва, 31 янв.–3 февр. 2006 г. М., 2006; 12–13.
[Alimova F.K., Toukhatova R.I., Tazetdinova D.I., Cabrera F.J.A., Karimova L.Yu. Interactions of *Trichoderma*, widespread throughout the Republic of Tatarstan, with microorganisms and plants. In: Fungi and Algae in Biocenoses: Proc. Int. Conf., dedicated to the 75th anniversary of the Department of Biology, Lomonosov Moscow State University. Moscow, January 31–February 3, 2006. Moscow, 2006; 12–13. (in Russian)]
- Аринбасарова А.Ю., Баскунов Б.П., Меденцев А.Г. Низкомолекулярный антимикробный пептид из *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai VKMF-4268D. *Микробиология*. 2017; 86(2): 258–260.
[Arinbasarova A.Yu., Baskunov B.P., Medentsev A.G. A low-molecular-mass antimicrobial peptide from *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai VKMF-4268D. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2017; 86(2): 258–260. (in Russian)]
- Бисько Н.А., Дудка И.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка. Киев, 1987.
[Bisko N.A., Dudka I.A. Biology and Cultivation of Edible Mushrooms of the Genus *Pleurotus*. Kiev, 1987. (in Russian)]

- Бисько Н.А., Фомина В.И., Володина Е.П., Билай В.Т. Изменение химического состава субстрата при культивировании *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Микология и фитопатология. 1986; 20(5):392-395.
[Bisko N.A., Fomina V.I., Volodina E.P., Bilay V.T. Change in the chemical composition of the substrate during *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. cultivation. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 1986;20(5):392-395. (in Russian)]
- Богданов А.И., Титова Ю.А. Антагонистическая активность штаммов *Trichoderma asperellum* – продуцентов мультиконверсионных биопрепаратов. Вестн. защиты растений. 2014;1:48-52.
[Bogdanov A.I., Titova J.A. Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* strains, multirecycling bioformulation producers. Vestnik Zashchity Rastenii = Plant Protection News. 2014;1:48-52. (in Russian)]
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М., 1979.
[Dospikhov B.A. Methodology of Field Experience. Moscow, 1979. (in Russian)]
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М., 2004.
[Egorov N.S. Fundamentals of the Antibiotics Doctrine. Moscow, 2004. (in Russian)]
- Зиганшин Д.Д., Лукьянцев М.А., Егоршина А.А., Сироткин А.С. Оценка способности консорциума микроорганизмов к утилизации стерни. Вестн. Казан. технол. ун-та. 2016;19(16):103-107.
[Ziganshin D.D., Lukiyansev M.A., Egorshina A.A., Sirotkin A.S. Assessment of the ability of a microbial consortium to utilize stubbles. Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo Universiteta = Bull. Kazan Technol. Univ. 2016;19(16):103-107. (in Russian)]
- Зиганшин Д.Д., Сироткин А.С. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба. Вестн. Казан. технол. ун-та. 2017;20(10):155-158.
[Ziganshin D.D., Sirotkin A.S. Features of *Trichoderma* fungi deep and surface cultivation for obtaining bioformulations based on fungal cells. Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo Universiteta = Bull. Kazan Technol. Univ. 2017;20(10):155-158. (in Russian)]
- Колумбет Л.В., Жиглецова С.К., Дербышев В.В., Ежов Д.В., Косарева Н.И., Быстрова Е.В. Микофунгицид – препарат на основе *Trichoderma viride* для борьбы с болезнями растений. Прикл. биохимия и микробиология. 2001;37(1):110-114.
[Kolombet L.V., Zhigletsova S.K., Derbyshev V.V., Ezhov D.V., Kosareva N.I., Bystrova E.V. Mycofungicide is a biologic based on *Trichoderma viride* to control plant diseases. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology. 2001;37(1):110-114. (in Russian)]
- Лабынцев А.В., Целуйко О.А. Способ разложения растительных остатков. Пат. РФ RU 2485752 С1. 2013.
[Labyntsev A.V., Tseluyko O.A. A method of plant residues destruction. Patent RU 2485752 C1. 2013. (in Russian)]
- Лилли В., Барнетт Г. Физиология грибов. М., 1953.
[Lilly V., Barnett G. Physiology of the Fungi. New York: McGraw-Hill Publ., 1951. (Russ. ed.: Lilly V., Barnett G. Physiology of the Fungi. Moscow, 1953. (in Russian))]
- Методы экспериментальной микологии: Справочник. Киев, 1982.
[Experimental Mycology Methods: Handbook. Kiev, 1982. (in Russian)]
- Новикова И.И. Полифункциональные биопрепараты на основе микробов-антагонистов – основа экологически безопасной системы защиты растений от болезней. Информ. бюл. ВПРС МОББ. 2007;38:173-175.
[Novikova I.I. Polyfunctional bioformulations based on antagonist microbes are the basis of an environmentally safe system of plant protection against diseases. Informatsionnyy Byulleten VPRS MOBB = IOBC EPRS Informational Bull. 2007;38:173-175. (in Russian)]
- Новикова И.И. Биологическое разнообразие микроорганизмов – основа для создания новых полифункциональных биопрепаратов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем. Вестн. защиты растений. 2016;83(3):120-122.
[Novikova I.I. The biological diversity of microorganisms is the basis for new multifunctional bioformulation development for phytosanitary optimization of agroecosystems. Vestnik Zashchity Rastenii = Plant Protection News. 2016;83(3):120-122. (in Russian)]
- Оболенская А.В., Щеголев В.П., Аким Г.А. Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1955.
[Obolenskaya A.V., Shchegolev V.P., Akim G.A. Practical Work on the Chemistry of Wood and Cellulose. Moscow, 1955. (in Russian)]
- Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. М., 1981.
[Rudakov O.L. Mycophilic Fungi: Biology and Practical Importance. Moscow, 1981. (in Russian)]
- Рудаков О.Л. Проблемы и перспективы использования гиперпаразитов и антагонистов в защите растений от инфекционных заболеваний: Микробиологические средства защиты растений. Новосибирск, 1986;139-143.
[Rudakov O.L. Problems and Prospects of Using Hyperparasites and Antagonists in Plant Protection against Infectious Diseases: Microbiological Means for Plant Protection. Novosibirsk, 1986;139-143. (in Russian)]
- Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Лунева Т.А. Воздействие гриба рода *Trichoderma* на лигнин коры хвойных пород. Катализ в промышленности. 2014;6:64-70.
[Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Luneva T.A. Effect of *Trichoderma* fungi on softwood bark lignin. Kataliz v Promyshlennosti = Catalysis in Industry. 2014;6:64-70. (in Russian)]
- Садькова В.С., Лихачев А.Н., Бондарь П.Н. Ограничение развития комплекса возбудителей корневых гнилей ячменя антагонистами рода *Trichoderma*. Микология и фитопатология. 2010;44(6):556-562.
[Sadykova V.S., Likhachev A.N., Bondar P.N. Restriction of barley root rot development by antagonistic fungi of the genus *Trichoderma*. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2010;44(6):556-562. (in Russian)]
- Садькова В.С., Третьякова И.Н., Носкова Н.Е., Бондарь П.Н. Антагонистическая и ростостимулирующая активность штаммов рода *Trichoderma* и перспективы их использования в биоконтроле. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009;2:71-72.
[Sadykova V.S., Tretyakova I.N., Noskova N.E., Bondar P.N. Antagonistic and growth-stimulating activity of the genus *Trichoderma* strains and prospects of their use in biocontrol. Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology. 2009;2:71-72. (in Russian)]
- Титова Ю.А. Методология получения мультиконверсионных биопрепаратов для защиты растений. Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем: Сб. науч. трудов III Всерос. съезда по защите растений. СПб., 2013;2:396-400.
[Titova J.A. Methodology for obtaining multirecycled bioformulations for plant protection. In: Phytosanitary Optimization of Agroecosystems: Proc. III All-Russian Plant Protection Congr. St. Petersburg, 2013;2:396-400. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Бойкова И.В., Бочкова В.Б. Биологическая активность мультиконверсионных биопестицидов на основе актиномицетов. Современная микология в России: IV съезд микологов России. М., 2017а;7:284-286.
[Titova J.A., Boykova I.V., Bochkova V.B. Biological activity of multirecycled biopesticides based on actinomycetes. In: Modern Mycology in Russia: Proc. IV Congr. Russian Mycologists. Moscow, 2017a;7:284-286. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Долгих В.В., Богданов А.И. Особенности биоконверсии компонентов растительных субстратов штаммами-продуцентами биопрепаратов. Вестн. защиты растений. 2014;3:46-49.
[Titova J.A., Dolguikh V.V., Bogdanov A.I. Biorecycling features of plant substrate components by bioformulation producer strains.

- Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News. 2014;3:46-49. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Сокогнова С.В., Полякова О.Ю. Особенности роста энтомопатогенных видов *Beauveria* при мультибиоконверсии отходов производства съедобных грибов. Современная микология в России: IV съезд микологов России. М., 2017б;6:405-406.
- [Titova J.A., Sokornova S.V., Polyakova O.Yu. Growth features of *Beauveria* entomopathogenic species in the multibiorecycling of edible fungi production wastes. In: Modern Mycology in Russia: Proc. IV Congr. Russian Mycologists. Moscow, 2017b;6:405-406. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Хлопунова Л.Б., Федорова Р.А., Зыков И.О. Производство вешенки путем мультибиоконверсии отходов производства шиитаке. Современная микология в России: IV съезд микологов России. М., 2017в;7:389-391.
- [Titova J.A., Khlopunova L.B., Fedorova R.A., Zikov I.O. Oyster mushroom production by shiitake waste multibiorecycling. In: Modern Mycology in Russia: Proc. IV Congr. Russian Mycologists. Moscow, 2017c;7:389-391. (in Russian)]
- ТУ 9291-005-59147141-2006. Технические условия. Триходермин нова. 2006.
- [TS 9291-005-59147141-2006. Technical specifications. Trichodermin nova. 2006. (in Russian)]
- Alamri S., Hashem M., Mostafa Y.S. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their mode of action. *Biocontrol Sci.* 2012;17(4):155-167.
- Benítez T., Rincon F.M., Limon M.C., Codon A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 2004;7(4):249-260.
- Bheemaraya P.M.B., Ramesh N.M.K., Kalyanrao. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma* species. *J. Mycol. Plant Pathol.* 2011;41(4):618-621.
- Bouregghda H., Renane R. *In vitro* study of antagonistic activity of some isolates of *Trichoderma* spp. against *Fusarium* spp. isolates the causal agent of wheat head scab. *Arab. J. Plant Protection.* 2011;29:51-59.
- Devi P., Prabhakaran N., Kamil D., Pandey P., Borah J.L. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their biocontrol efficiency against plant pathogens. *Afr. J. Biotech.* 2012;11(85):15150-15160. DOI 10.5897/AJB12.2007.
- Haran S., Schickler H., Chet I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology.* 1996;142:2321-2331.
- Heidi I.G., Abo-Elnaga. Biological control of damping off and root rot of wheat and sugar beet with *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathol. J.* 2012;11(1):25-31. DOI 10.3923/ppj2012.25.31.
- Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K., Lorito M. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 2001;83:11-23.
- Parra T.J., Maniscalco P.D. Effect of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and some physiological attributes on *Zea mays* L. under greenhouse conditions. *Fitopatol. Venez.* 2012;25:10-15.
- Schwanninger M., Hinterstoisser B. Klason lignin: Modification to improve the precision of the standardized determination. *Holzforchung.* 2002;56:161-166.
- Whipps J.M., Lumsden R.D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential.* Wallingford, UK: CABI Publ., 2001;9-22.

ORCID ID

I.I. Novikova orcid.org/0000-0003-2816-2151
J.A. Titova orcid.org/0000-0002-8188-1852

Acknowledgements. The authors are grateful to the staff of the Testing Laboratory of the Agrophysical Research Institute for assistance in experiments.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received August 2, 2019. Revised February 11, 2019. Accepted February 17, 2019.