

УДК 579.64

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РИЗОСФЕРНОЙ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS ASPLENII* 11RW ПРОТИВ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов

Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия

АО «Щелково Агротим, Щелково, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенные грибы ежегодно приводят к значительным потерям и повреждению сельскохозяйственной продукции, снижают урожайность, негативно влияют на хранение зерновых и овощных культур и представляют серьезную опасность для здоровья человека и животных из-за синтеза и накопления микотоксинов.

Одним из наиболее многообещающих способов контроля фитопатогенных грибов является использование микробиологических агентов [1–4]. Использование бактерий, способствующих росту растений (PGPR), с антифунгальными свойствами является более безопасной альтернативой химическим средствам защиты [5]. Бактерии рода *Pseudomonas* в этом отношении являются одними из наиболее перспективных объектов благодаря синтезу различных биологически активных веществ: фитогормонов (ИУК, цитокинины, гиббереллины), гидролитических ферментов [6], хелатирующих железо сидерофоров, циклических липодепептидов [7], антибиотиков [8, 9] (2,4–диацетилфлороглюцин, пиолотеорин, пирролнитрин и цианистый водород) и др. Поэтому поиск новых эффективных штаммов является перспективной и актуальной задачей сельскохозяйственной микробиологии.

Целью данного исследования явился анализ антагонистической активности ризосферного штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW против фитопатогенных грибов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали бактериальный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW, выделенный из ризосферной почвы озимой пшеницы (Краснодарский край).

Исследуемую культуру выращивали на жидкой среде King's B в шейкере-инкубаторе (Infors HT Ecotron) при 220 об/мин и 30 °С в течение 24 ч.

Анализ фунгицидной активности штамма

Для анализа в чашки Петри разливали по 20 мл стерильной картофельно-сахарозной среды с 2 % агара. Готовили суспензию спор и мицелия гриба. Для этого 1/8 часть агара, засеянного грибом,

переносили в стерильную чашку Петри, добавляли 10 мл стерильной воды и смывали конидии и мицелий стерильным шпателем. После чего добавляли 20 мкл полученной суспензии в 4,98 мл остуженной до 45 °С картофельно-сахарозной среды с 1,2 % агара, тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри вторым слоем. Через 1 час в агаре делали «лунки», в которые вносили по 100 мкл суспензии *P. asplenii* 11RW. Посевы культивировали 4–10 суток при температуре 20 °С, после чего регистрировали наличие или отсутствие зон угнетения роста фитопатогенов.

Изучение активности летучих органических соединений

Для *in vitro* анализа эффекта летучих органических соединений (ЛОС) использовали методику, описанную Гарбевой с соавт. [10]. Анализируемая бактериальная суспензия вносилась в стерильный картофельно-сахарозный агар (40–45 °С) и разливалась по 20 мл на дно чашек Петри. В качестве контроля выступал КСА без внесения бактериальной суспензии. На крышки чашек разливали по 12 мл стерильного водного агара, в центр которых помещали блоки агара диаметром 1 см, вырезанные из посевов фитопатогенных грибов. Чашки Петри закрывали, стык заклеивали парафином. Посевы инкубировали при 25 °С в течение 4–10 суток (в зависимости от скорости роста гриба), после чего измеряли средний диаметр колонии, сравнивали с контрольными значениями и оценивали влияние ЛОС на развитие гриба.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фунгицидная активность исследуемой культуры проверялась на 46 штаммах фитопатогенных грибов различной таксономической принадлежности (р. *Alternaria*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Phytophthora*, *Bipolaris*, *Pyricularia* и др.) из коллекции патогенных микроорганизмов АО «Щелково Агрохим». Результаты анализа выявляют мощное фунгицидное действие штамма *P. asplenii* 11RW: данная бактерия активно ингибирует рост 44 из 46 проанализированных тест-объектов различного таксономического положения при высокой нагрузке фитопатогенного фона. Результаты представлены в табл. 1.

Особой группой антифунгальных соединений являются летучие бактериальные экзопродукты, к которым относятся цианиды. Благодаря активному выделению летучих цианидов, обладающих высокой проникающей способностью, ризобактерии могут обладать активными защитными свойствами. Многие штаммы *Pseudomonas*, обладающие фунгицидной активностью, могут продуцировать цианиды в виде летучего цианистого водорода в присутствии предшественника глицина, широко встречающегося в корневых экзопродуктах [11].



Рисунок 1 – Результаты анализа фунгицидной активности штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW против *Alternaria tenuissima* 481–101 (A), *Fusarium culmorum* 63 (B), *Fusarium graminearum* 58918 (C), *Fusarium oxysporum* F-55071 (D)

Показано, что штамм *P. asplenii* 11RW продуцирует летучие органические соединения, обладающие антагонистическим действием против фитопатогенных грибов (рисунок 2), к примеру, в бесконтактных системах разрастание мицелия грибов *A. tenuis*, *D. avenae*, *Rh. solani* и *Septoria* sp. под влиянием летучих метаболитов штамма 11RW полностью отсутствовало.

Таблица 1 – Результаты анализа фунгицидной активности штамма

Источник выделения	Фитопатоген	Средний диаметр зоны подавления роста фитопатогенного гриба, мм
Пшеница	<i>Alternaria tenuissima</i> 481–101	47
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	42
	<i>Fusarium avenaceum</i> 45	25
	<i>Fusarium graminearum</i> 58918	35
	<i>Fusarium graminearum</i> 159811	25
	<i>Fusarium oxysporum</i> F-55071	44
	<i>Fusarium oxysporum</i> 96801	0
	<i>Fusarium solani</i> 104803	17
	<i>Fusarium sporotrichioides</i> 58871	35
	<i>Fusarium sporotrichioides</i> 58878	35
	<i>Fusarium tricinctum</i> 58869	18
	<i>Fusarium verticillioides</i> 58919	18
	<i>Fusarium ussurianum</i> 29813	72
	<i>Septoria</i> sp.	70
Ячмень	<i>Fusarium culmorum</i> 30	70
	<i>Fusarium sibiricum</i> 11007	72
	<i>Fusarium sporotrichioides</i> 88503	20
Овёс	<i>Drechslera avenae</i>	53
	<i>Fusarium poae</i> MFG 103403	32
	<i>Penicillium</i> sp. 126900	19
Рожь	<i>Fusarium culmorum</i> 63	40
Сахарная свёкла	<i>Alternaria alternata</i>	51
	<i>Cercospora beticola</i> B-3191	58
	<i>Cladosporium herbarum</i>	58
	<i>Epicoccum purpurascens</i>	37
	<i>Fusarium solani</i>	0
	<i>Helminthosporium sativum</i>	45
Картофель	<i>Phoma betae</i>	46
	<i>Alternaria solani</i> 473	47
Лён	<i>Phytophthora infestans</i> 40	24
	<i>Colletotrichum lini</i> 707	52
	<i>Colletotrichum lini</i> 713	39
	<i>Fusarium oxysporum</i> 352	22
	<i>Ozonium vinogradovi</i> 2	72
Рис.	<i>Pyricularia oryzae</i> 16	77
	<i>Pyricularia oryzae</i> 18	72
Хлопчатник	<i>Verticillium dahliae</i> 34/1	33
	<i>Verticillium dahliae</i> TA-4	52
Подсолнечник	<i>Aspergillus niger</i>	25
Нут	<i>Ascochyta rabiei</i>	33
Дыня	<i>Fusarium</i> sp. F-846	33
Фитопатогены, выделенные из почвы	<i>Alternaria alternata</i> 245	43
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> 130	40
	<i>Microdochium nivale</i>	18
	<i>Monilia fructigena</i> 483	60
	<i>Rhizoctonia solani</i> 170	60

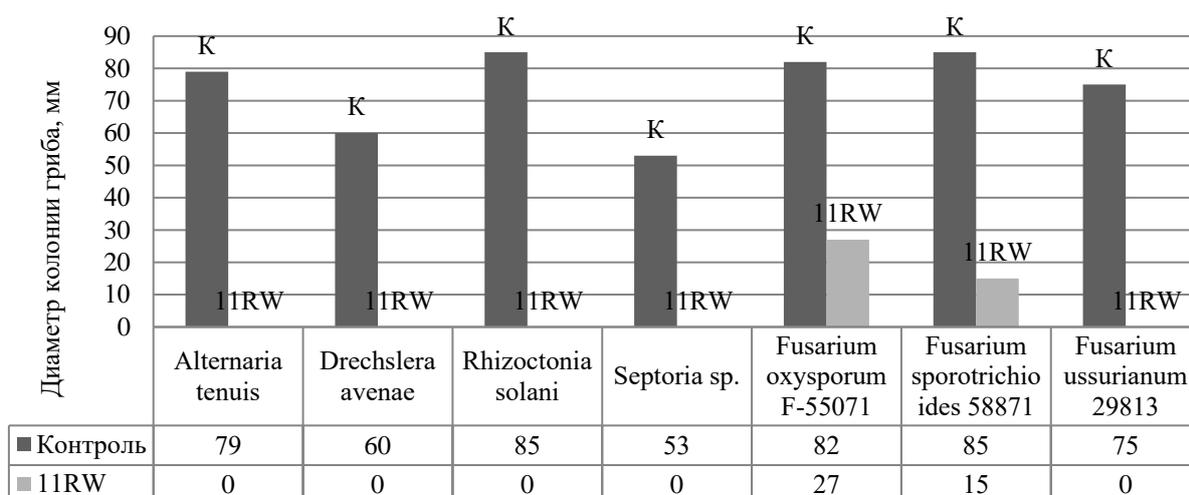


Рисунок 2 – Средний диаметр колоний грибов, культивируемых в условиях влияния ЛОС штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW в сравнении с контролем (К)

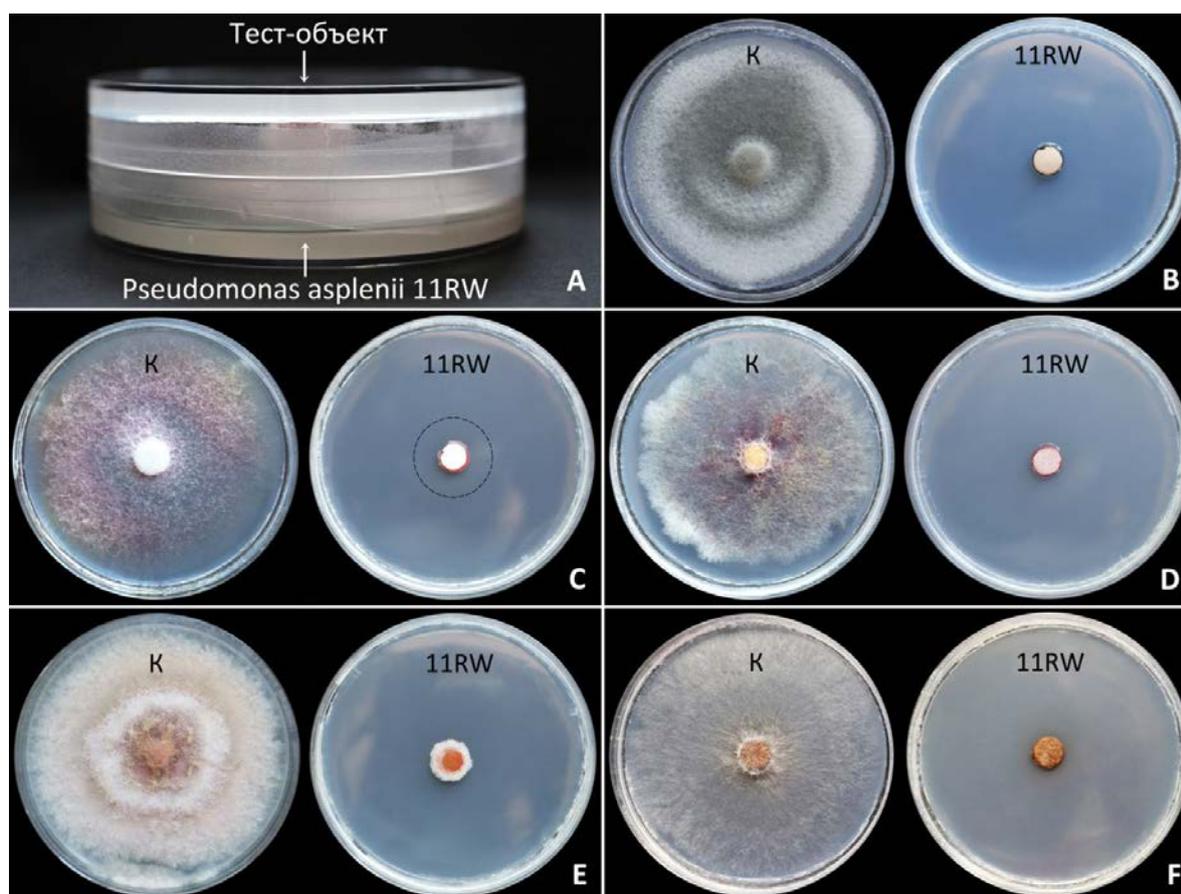


Рисунок 3 – Вид бесконтактной системы (А) и результаты оценки влияния ЛОС, выделяемых штаммом *Pseudomonas asplenii* 11RW, на рост *Alternaria tenuis* (В), *Fusarium oxysporum* F-55071 (С), *Fusarium ussurianum* 29813 (D), *Fusarium sporotrichioides* 58871 (Е) и *Rhizoctonia solani* 170 (F) в сравнении с контролем (К)

Таким образом, было продемонстрировано, что изучаемый штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW обладает высоким антагонистическим потенциалом и способен активно ингибировать рост фитопатогенов за счет синтеза биологически активных соединений при совместном культивировании гриба и бактерии, а также подавлять развитие патогенов без непосредственного контакта за счет синтеза летучих органических соединений. При этом отмечается широкий спектр фунгицидной активности штамма. Поэтому ввиду высокой перспективности штамма планируется дальнейшее исследование возможности использования *Pseudomonas asplenii* 11RW для создания эффективной системы биоконтроля.

ЛИТЕРАТУРА

- Khokhar M.K., Gupta R., Sharma R. Biological Control of Plant Pathogens using Biotechnological Aspects: A Review. 2012; 1:277;
- Perez-Gracia A., Romero D., Zerriouh H., Vicente A. Biological control of phytopathogenic fungi by aerobic endospore-formers. In: Logan NA, Vos PDe. Endospore-forming Soil Bacteria. Soil Biology 27, Berlin Heidelberg: Springer; 2011; 157–180;
- Cal A., Larena I., Guijarro B., Melgarejo P. Use of Biofungicides for Controlling Plant Diseases to Improve Food Availability. 2012; 2:109–124;
- Recep K., Fikretin S., Erkol D., Cafer E. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. 2009; 50:194–198;
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects, Applied and Environmental Microbiology, 2005; 71(9), 4951–4959;
- Chernin L., Chet I. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests, in Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. 2002; 171–225;
- Dalla Serra M., Menestrina G., Carpaneto A., Gambale F., Fogliano V., Ballio A. Molecular mechanisms of action of syringopeptins, antifungal peptides from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, in Pore-Forming Peptides and Proteins Toxins, G. Menestrina, M. Dalla Serra, and P. Lazarovici, Eds. 2003; 272–295;
- Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents, Antonie van Leeuwenhoek. 2002; 81(1–4), 537–547;
- Ramette A., Frapolli M., Defago G., Moëgne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability, Molecular Plant-Microbe Interactions. 2003; 16(6), 525–535;
- Garbeva P., Hordijk C., Gerards S., de Boer W. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. FEMS Microbiol Ecol. 2014; 87: 639–649;
- Voisard C., Bull C.T., Keel C., Laville J., Maurhofer M. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. O'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (eds) Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. 1994; 67–89.