

УДК 532.532.2

СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫХ К ПОДАВЛЕНИЮ РОСТА МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *FUSARIUM*

Э.А. Кабрера Фуентес, Р.Т. Мухаметшина, Р.А. Габитов,
Н.Г. Захарова, Т.В. Багаева, Р.П. Ибатуллина

Аннотация

В качестве основы для биопрепаратов по защите растений от фузариозов изучены изоляты бактерий и микромицетов, выделенные из различных экологических ниш Татарстана. Установлено, что два вида бактерий – *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. – и один моноспоровый изолят микромицета *T. koningii* 406 (1) обладают наибольшей биофунгицидной активностью относительно фитопатогенных грибов рода *Fusarium*.

Ключевые слова: бактерии, микромицеты, род *Fusarium*.

Введение

Одним из аспектов повышения урожайности сельскохозяйственных культур является возможность предотвращения потерь сельскохозяйственной продукции благодаря использованию биопрепаратов по защите растений. Основу предлагаемой стратегии составляют процессы, связанные со сдерживанием развития и размножения патогенных организмов с помощью микроорганизмов-антагонистов, культивируемых в лабораторных условиях и интродуцируемых в агроценоз. К примеру, положительные результаты были получены при применении таких биопрепаратов, как триходермин (на основе грибов рода *Trichoderma*), фитоспорин (на основе бактерий *Bacillus subtilis*), агат (*Pseudomonas aureofaciens*), планриз (*Pseudomonas fluorescens*), фитолавин (*Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces griseus*), и других [1–3]. Однако поиск новых штаммов, обладающих комплексом положительных свойств (высокий уровень биопестицидной, биофунгицидной активности, рост регулирующей активности), а также соответствующих определенным эколого-географическим условиям, продолжается. Особое внимание уделяется созданию биопрепаратов, способных подавлять рост наиболее опасных и плохо регулируемых типов возбудителей заболеваний, к числу которых относятся и микромицеты рода *Fusarium*, вызывающие угнетение и гибель практически всех важных сельскохозяйственных растений.

Настоящая работа посвящена скринингу микроорганизмов, перспективных в качестве средств биологической регуляции роста сельскохозяйственных растений и способных к подавлению возбудителей фузариоза.

1. Материалы и методы

Цель исследования состояла в изучении действия изолятов бактериальных культур и микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных из образцов различных экологических ниш Республики Татарстан, с поверхности овощных культур (картофель), с поверхности семян и вегетативных органов зерновых культур (пшеница, кукуруза), из ризосферы декоративных растений (розы), на штаммы фитопатогенных микромицетов. В экспериментах использовали природный штамм *Fusarium oxysporium* (KP) и музейный штамм *Fusarium oxysporium*. Штамм *Fusarium oxysporium* был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пушкино). Штамм *Fusarium oxysporium* (KP) был выделен из образцов с поверхности картофеля, культивируемого в Республике Татарстан, идентифицирован по принятым методам и проверен на фитопатогенность [4].

Родовую принадлежность бактериальных штаммов определяли по принятым морфологическим и физиолого-биохимическим показателям. Морфолого-культуральные свойства бактерий и грибов изучали на средах: МПА и картофельно-глюкозном агаре (PDA) [4].

Гетерогенность популяции изолятов микромицетов оценивали по их принадлежности к определенному культурально-морфологическому типу (КМТ) [5, с. 159–163]. Моноспоровые культуры грибов получали по принятым методам при выращивании на жидких питательных средах [6]. Вегетативную совместимость изолятов исследовали сращиванием от двух до восьми колоний в чашках Петри со стерильной средой PDA. Характер проявления реакций при визуальной оценке и микроскопировании сравнивали с описаниями, приведенными в работе Ю.Т. Дьякова и А.В. Долговой [7].

Антагонистическую активность изолятов бактерий проверяли методом лунок и блоков [8]. Биофунгицидную активность определяли методом встречных культур как при оптимальной температуре для роста микроорганизмов (28 °С), так и при 15 °С в опытах с микромицетами [9]. Тип взаимоотношений между исследуемыми организмами характеризовали используя шкалу Джонсона и Карла [10].

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ Excel.

2. Результаты и их обсуждение

Известно, что основу большинства биопрепаратов по защите растений составляют бактерии и грибы-антагонисты. Однако разнообразие микроорганизмов, их активность в определенных эколого-географических зонах требуют расширения продуцентов, способных к комплексной защите растений от патогенов и насекомых.

В наших исследованиях поиск средств биозащиты растений был проведен по двум направлениям. Во-первых, он был направлен на изучение бактериальных микроорганизмов, способных к биофунгицидной активности относительно возбудителей наиболее опасного типа заболеваний растений – фузариоза. Во-вторых – на изучение изолятов гриба рода *Trichoderma*.

Табл. 1

Биофунгицидное действие бактериальных изолятов

№	Штаммы	Антагонистическая активность (зоны подавления, мм)	
		<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> (KP)
1	<i>B. subtilis</i>	35.6 ± 2.0	40.2 ± 2.2
2	<i>B. megaterium</i>	28.0 ± 1.8	30.2 ± 1.9
3	<i>B. mycoides</i>	36.6 ± 2.8	41.6 ± 2.4
4	<i>Micrococcus</i> sp.	17.2 ± 0.9	18.4 ± 0.8
5	<i>Serratia marcescens</i>	20.8 ± 0.4	22.4 ± 0.6
6	<i>Arthrobacter</i> sp.	17.6 ± 0.4	18.2 ± 0.4
7	<i>Pseudomonas</i> sp.	30.0 ± 1.2	32.0 ± 1.4

Из образцов различных типов почв Татарстана, с поверхности овощных культур (картофель), с поверхности семян и вегетативных органов зерновых культур (пшеница, кукуруза), из ризосферы декоративных растений (розы) были выделены представители более 25 различных родов бактерий, среди которых преобладали микроорганизмы р. *Bacillus*, р. *Pseudomonas*, были представлены в меньшем количестве – р. *Micrococcus*, р. *Sarsina*, р. *Arthrobacter*, р. *Serratia* и других. Все выделенные изоляты характеризовались активным ростом и способностью в той или иной мере подавлять рост тест-объектов (*F. oxysporium* и *F. oxysporium* (KP)).

Изучение биофунгицидного действия изолятов проводили на двух штаммах патогенных грибов *Fusarium oxysporium*. Выбор данных микроорганизмов не случаен: они вызывают одно из наиболее опасных и распространенных заболеваний растений – фузариоз.

Результаты исследований показали, что биофунгицидной активностью обладало значительно меньшее число выделенных изолятов. Среди полученных и идентифицированных штаммов биофунгицидным действием обладали 3 штамма рода *Bacillus* (предположительно *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*), штамм *Pseudomonas* sp., штамм отнесенный к *Serratia marcescens*, штамм *Micrococcus* sp. и штамм *Arthrobacter* sp. (табл. 1).

Проверка действия этих штаммов на фитопатогенные грибы рода *Fusarium* выявила группу микроорганизмов, обладающих наибольшей антагонистической активностью: ее составляли бактерии рода *Bacillus*. Наиболее высокую антагонистическую активность проявлял штамм *B. mycoides* (размер зоны подавления роста *F. oxysporium* и *F. oxysporium* (KP) – 36.6 ± 2.8 мм и 41.6 ± 2.4 мм соответственно) и штамм *Pseudomonas* sp. (30.0 ± 1.2 мм и 32.0 ± 1.4 мм).

Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований, где основу разрабатываемого биопрепарата (бацизулин) составлял штамм бактерий рода *Bacillus* [11].

Среди грибов-антагонистов активно изучаются представители рода *Trichoderma* (они продуцируют антибиотики, комплексы различных ферментов, обладающих антибактериальными и антигрибковыми свойствами) [12]. Однако следует заметить, что для промышленного использования грибов рода *Trichoderma* важна стабильность признаков, характерная только для моноспоровых изолятов, в то время как природные штаммы представляют собой, как правило, комплекс

Табл. 2

Биофунгицидное действие изолятов микромицета и их характеристика

<i>T. koningii</i> № изолята	КМТ	ТАА	Тип вегетативной совместимости	Кинетические параметры, мм/ч ⁻¹
1	II	B	Барраж, мелдинг-реакция	0.085–0.092
1 (1)	II	B	Бордюр	0.082–0.088
1 (2)	II	B	мелдинг-реакция	0.081–0.086
183	II	B	Валик, мелдинг-реакция, индифферентная реакция	0.088–0.094
183 (1)	II	D	Индифферентная реакция	0.081–0.085
183 (6)	II	D	Индифферентная реакция	0.120–0.125
406	IV	B	Бордюр, мелдинг-реакция, индифферентная реакция	0.125–0.132
406 (1)	IV	E	Бордюр	0.125–0.134
406 (2)	IV	D	Индифферентная реакция	0.118–0.125

КМТ – культурально-морфологический тип.

ТАА – тип антагонистической активности.

клонов с различными физиологическими и морфологическими признаками. В связи с этим на первом этапе исследований было проведено изучение структуры аборигенных штаммов *Trichoderma koningii* 1, 183, 406. Полученные результаты показали, что в состав гетерогенной популяции изолята *Trichoderma koningii* 1 входят 2 клона: *T. koningii* 1 (1) и *T. koningii* 1 (2); *Trichoderma koningii* 183 – 2 клона: *T. koningii* 183 (1) и *T. koningii* 183 (6); *Trichoderma koningii* 406 – 2 клона: *T. koningii* 406 (1) и *T. koningii* 406 (2).

Все выделенные изоляты принадлежали к двум стабильным культурально-морфологическим типам из четырех ранее описанных в литературе [5] (табл. 2). Гетероспоровые популяции в большей степени (66%) были представлены вторым культурально-морфологическим типом (изоляты *T. koningii* 1, *T. koningii* 183 и их клоны). К четвертому типу были отнесены 25% исследованных нами изолятов (изолят *T. koningii* 406 и его клоны).

Между гетероспоровыми популяциями и моноспоровыми клонами были обнаружены различные реакции вегетативной совместимости: образование мицелиального валика из гиф воздушного мицелия и взаимное проникновение мицелия (индифферентная реакция). Кроме того, были выявлены следующие реакции несовместимости: барраж, бордюр, ограничение роста, а также мелдинг-реакция, которая по своим признакам ближе к реакциям несовместимости (табл. 2). Результаты исследований показали, что если для гетероспоровых изолятов наблюдается смешанный тип вегетативной совместимости, например сочетание реакции несовместимости *бордюр* и реакции совместимости *индифферентной*, то для моноспоровых изолятов характерен определенный тип реакции. В целом у изолятов выявляется тенденция относительного сдвига реакций в сторону вегетативной совместимости.

Сравнительное исследование антагонистической, биофунгицидной активности аборигенных гетероспоровых комплексов *T. koningii* и полученных при расщеплении моноспоровых клонов в отношении патогенного гриба *F. oxysporium* показало, что в их действии наблюдаются значительные различия (табл. 2). Было

установлено, что наибольшей антагонистической активностью обладают моноспоровые изоляты. Особенно четко это различие наблюдалось для гетероспоровой популяции *T. koningii* 406, где для исходного изолята был характерен тип реакции В, когда наблюдается обоюдное подавление роста микроорганизмов при контакте, в то время как для клонов *T. koningii* 406 (1), *T. koningii* 406 (2) – типы реакций Е и Д соответственно (подавление одного организма при контакте, при этом антагонист продолжает расти с неизменной скоростью поверх колонии или обрастает колонию подавляемого организма). Степень колонизации антагонистом *T. koningii* 406 (1) колонии фитопатогенного микромицета на пятые сутки составила 180%, при этом скорость роста антагониста в опыте увеличилась в 2 раза по сравнению с контрольным вариантом.

Выделенные и исследованные изоляты микромицета хорошо росли при оптимальной температуре роста для *T. koningii* – 28 °С. Снижение температуры роста до 15 °С приводило к снижению удельной скорости роста большинства изолятов в интервале от 0.017 до 0.055 мм/ч⁻¹. Исключение составляла гетерогенная популяция *T. koningii* 406 и ее клоны. Наиболее высокая удельная скорость роста при данной температуре наблюдалась у моноспорового изолята *T. koningii* 406 (1) – 0.087–0.098 мм/ч⁻¹.

Заключение

Таким образом, среди изученных изолятов были выявлены микроорганизмы, способные к регуляции роста и размножения *F. oxysporium*. Наиболее перспективными изолятами, обладающими биофунгицидными свойствами, являлись представители двух родов бактерий – *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также моноспоровый изолят *T. koningii* 406 (1). Данные микроорганизмы по своим свойствам могут стать основой для создания биопрепаратов по защите растений.

Summary

H.A. Cabrera Fuentes, R.T. Mukhametshina, R.A. Gabitov, N.G. Zakharova, T.V. Bagaeva, R.P. Ibatullina. Screening Microorganisms Capable of Suppressing the Growth of Micromycetes Genus Fusarium.

The article studies bacteria and micromycetes strains isolated from distinct ecological niches of Tatarstan, which serve as a basis for biological products aimed at protection of plants against Fusarium. It is revealed that two types of bacteria, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp., and one strain of *T. koningii* monospore clone 406 (1), have the highest biofungicide activity on pathogenic fungi of the genus Fusarium.

Key words: bacteria, micromycetes, genus Fusarium.

Литература

1. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В. Биологическая защита растений. – М.: Колос, 2004. – 264 с.
2. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts // Nature Rev. – 2004. – V. 2. – P. 43–55.
3. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. – 2001. – V. 52, No 9. – P. 487–511.

4. *Алимова Ф.К., Кабрера Ф.Х.А., Тухбатова Р.И., Тазетдинова Д.И.* Взаимоотношения *Trichoderma*, распространенной на территории Республики Татарстан, с микроорганизмами и растениями // Материалы междунар. конф., посв. 75-летию биол. фак. МГУ им. М.В. Ломоносова. – М.: Моск. гос. ун-т, 2006. – С. 12–14.
5. *Дьяков Ю.Т., Сергеев Ю.В.* Новое в систематике и номенклатуре грибов. – М.: Нац. акад. микологии; Медицина для всех, 2003. – 496 с.
6. *Лихачев А.Н., Сидорова И.И., Прохоров В.П., Великанов Л.Л.* Биометод – частный случай изменения структурно-функциональной организации биоценоза // Микро-биол. процессы в почвах и урожайность с.-х. культур (Матер. респ. конф., 6–7 июля, 1978 г.). – Вильнюс, 1978. – С. 202–203.
7. *Дьяков Ю.Т., Долгова А.В.* Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов. – М.: Моск. гос. ун-т, 1995. – 161 с.
8. *Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др.* Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
9. *Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M.D., Mateos P.F., Bridge P.D., Monte E. and Garcia-Acha I.* Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63, No 8. – P. 3189–3198.
10. *Weaver M., Vedenyapina E., Kenerley C.M.* Fitness, persistence and responsiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* in soil mesocosms // Appl. Soil Ecol. – 2005. – V. 29, No 2. – P. 125–134.
11. *Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю.* Использование бактерий из рода *Bacillus* // Вест. РАСХН. – 2004. – № 5. – С. 71–75.
12. *Алимова Ф.К.* Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2006. – 210 с.

Поступила в редакцию
16.03.10

Кабрера Фуентес Эктор Александро – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Мухаметшина Регина Талгатовна – аспирант кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

Габитов Рустем Амирович – студент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Захарова Наталья Георгиевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Багаева Татьяна Вадимовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Tatiana.Bagaeva@ksu.ru

Ибатуллина Римма Петровна – директор ООО «Научно-производственный институт “Биопрепараты”», г. Казань.