

УДК 632.1

**ОТБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ  
БИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ДЛЯ  
ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ  
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА <sup>1</sup>**

Асатурова Анжела Михайловна  
канд. биол. наук  
Дубяга Валентина Михайловна  
Томашевич Наталья Сергеевна  
Жарникова Марина Дмитриевна

*Государственное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт биологической защиты растений  
Российской академии сельскохозяйственных  
наук, Краснодар, Россия*

В статье представлены результаты первичного скрининга бактериальных штаммов по признакам ферментативной и антифунгальной активности в отношении грибов рода *Fusarium* (на примере *Fusarium graminearum*). Отобраны активные штаммы, перспективные для разработки на их основе биопрепаратов полифункционального типа действия для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза.

Ключевые слова: БАКТЕРИИ-АНТАГОНИСТЫ, СКРИНИНГ, ОЗИМАЯ ПШЕНИЦА, FUSARIUM GRAMINEARUM, БИОПРЕПАРАТЫ, АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ.

**SELECTION OF PERSPECTIVE  
BIOLOGICAL CONTROL AGENTS FOR  
FALL WHEAT PROTECTION FROM  
FUSARIUM DISEASES**

Asaturova Anzhela Michailovna  
Dr.Sc. (Biology)  
Dubyaga Valentina Michailovna  
Tomashevich Natalia Sergeevna  
Zharnikova Marina Dmitrievna

*State Scientific Institution  
All-Russian Research Institute of Biological Plant  
Protection  
Russian Academy of Agricultural Sciences,  
Krasnodar, Russia*

The results of primary screening of bacterial strains on the basis of cell-wall degrading enzymes and antifungal activity against the fungi of genus *Fusarium* (for example *Fusarium graminearum*). Selected active strains perspective for the development of biopreparations based on their type of multifunctional action to protect fall wheat from *Fusarium* pathogens.

Keywords: BACTERIA-ANTAGONISTS, SCREENING, FALL WHEAT, FUSARIUM GRAMINEARUM, BIOPREPARATIONS, ANTIFUNGAL ACTIVITY, ENZYMES ACTIVITY.

**Введение**

На протяжении последних 15 лет в России широко распространилось поражение сельскохозяйственных культур возбудителями фузариоза, которые вызывают корневые гнили всходов, трахеомикозные увядания растений, а также загнивание семян. Наблюдается тенденция к увеличению доли пораженных растений как в фазе всходов, так и в фазе созревания,

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке МЦП ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2011-2015 гг. Министерства образования и науки РФ, государственный контракт № 16.М04.11.0026.

что свидетельствует о неблагоприятной фитосанитарной ситуации в агроценозах России. Отмечается, что при проявлении болезни после цветения и формирования семян потери урожая составляют 30-40 %. В частности, Северо-Кавказский регион – основной производитель зерна в России ежегодно теряет от 4,5 до 10,5 ц/га урожая озимой пшеницы, одной из причин этого являются возбудители болезней [1-3].

Химический метод, бесспорно, продолжает оставаться важнейшим средством оперативного сдерживания патогенов, однако, фитосанитарная нестабильность агробиоценозов, а также ухудшение общей экологической ситуации в регионах России требуют новых подходов в развитии и использовании средств и способов биологической защиты. Поэтому разработка биотехнологий получения и применения современных экологически безопасных микробных препаратов для сельского хозяйства становится первоочередной задачей социально-экономического развития государств.

Микробиологическая защита растений на современном этапе включает использование веществ биотического происхождения и применение биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов. При этом отмечается, что в борьбе с фузариозными заболеваниями растений наиболее целесообразным подходом является использование живых культур микроорганизмов.

Успешность микробиологического метода во многом определяется выбором микроорганизмов-антагонистов, способных обеспечить эффективную защиту в течение вегетационного периода. Поэтому поиск и исследование таких штаммов с целью разработки на их основе биопрепаратов полифункционального типа действия продолжает оставаться актуальной задачей. Исследования в этом направлении включают ряд этапов: выбор мест для поиска микроорганизмов, выделение

и скрининг штаммов, исследование потенциальных биоагентов и полевые испытания [4].

Цель настоящих исследований – провести первичный скрининг бактериальных штаммов из рабочей коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИБЗР Россельхозакадемии по ферментативной и антагонистической активности в отношении грибов рода *Fusarium* (на примере *Fusarium graminearum*).

### **Материалы и методы**

Объектами исследования служили: штаммы бактерий-антагонистов возбудителей фузариоза, тест-культуры возбудителей фузариоза озимой пшеницы. Используемые в работе патогенные изоляты *Fusarium graminearum* Schwabe были взяты из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИБЗР Россельхозакадемии.

Определение антагонистической активности бактериальных штаммов проводили методом двойных (встречных) культур [5, 6] на картофельно-глюкозном агаре (КГА) и среде Кинга В (КВ). В чашку Петри (ЧП) высевали агаровый блок с мицелием патогена, бактериальный штамм при этом наносили методом штриха на расстоянии 6 см от блока патогена. Культуры инкубировали в течение 20 дней при температуре + 28 °С. Контрольные варианты – чистые культуры гриба патогена и бактерии, посеянные отдельно. Учеты проводили ежедневно. Отмечался характер взаимоотношений гриба и бактерии: наличие или отсутствие зон, их размер, изменение цвета, плотности, толщины и направления роста мицелия патогена.

Степень ингибирования роста мицелия патогена определяли по формуле [7]:

$$И = (1 - (A / B)) \times 100, \text{ где}$$

И – % ингибирования;

А – рост гриба в варианте;

В – рост гриба в контроле.

Определение ферментативной активности штаммов бактерий-антагонистов осуществляли с использованием различных тестов [8, 9].

#### Тест на липазу

Для определения липолитической активности использовали желточный агар (г/л): пептон – 40,0; глюкоза – 2,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 5,0;  $\text{NaCl}$  – 2,0;  $\text{MgSO}_4$  0,5 % раствор – 2,0 мл; агар – 25,0; вода дистиллированная.

Среду стерилизовали автоклавированием, охлаждали до + 60 °С. Скорлупу яйца дезинфицировали спиртом и давали обсохнуть. Яйцо разбивали и отделяли желток от белка. Желток, с соблюдением правил асептики, переносили в расплавленный агар и перемешивали до получения однородной суспензии, которую разливали в ЧП и оставляли для затвердевания. После посева бактерий и инкубации (до 14 дней) снимали крышку ЧП и внимательно просматривали поверхность при косом освещении. Положительный результат на липолитическую активность: образование маслянистого блестящего с переливами или перламутрового слоя над колонией бактерии и вокруг нее на поверхности агара.

#### Тест на гидролиз казеина.

Стерильное (автоклавированное) обезжиренное молоко смешивали при + 50 °С с равным объемом 4 %-ного расплавленного водного агара. ЧП с инокулированной штрихом средой инкубировали до 14 дней. Положительный результат на гидролиз казеина: образование зон просветления вокруг колонии бактерии.

### Тест на хитиназу

Для определения хитиноподобной активности использовали синтетическую среду следующего состава (г/л): сахароза – 20,0;  $\text{NaNO}_3$  – 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,3; мел – 10,0; агар – 20,0; вода дистиллированная.

ЧП с инокулированной штрихом средой инкубировали 7-14 дней. Положительный результат на хитиноподобную активность: образование зон просветления вокруг колонии.

### **Результаты и обсуждения**

Образование специфических продуктов обмена – антифунгальных веществ, угнетающих или полностью подавляющих развитие патогенных микромицетов, является наиболее существенной и яркой формой антагонизма, широко распространенной в мире микроорганизмов. Поэтому для выявления возможных механизмов антагонистических взаимодействий бактерий с грибами рода *Fusarium* была изучена их антифунгальная активность *in vitro* методом встречных культур [5, 6].

В результате предварительного тестирования пяти различных изолятов гриба *F. graminearum* по признакам агрессивности и патогенности в качестве тест-объекта на начальном этапе скрининга был отобран изолят № 4 *F. graminearum* как один из наиболее вредоносных представителей рода *Fusarium* для культуры озимой пшеницы.

В результате проведенного скрининга по признаку антагонистической активности из 530 исследованных штаммов было отобрано 30 перспективных бактериальных культур, которые по механизму антифунгального действия на патоген можно разделить на две группы:

- штаммы, образующие стерильную зону антагонистического действия (табл. 1; рис. 1 в, г);

- штаммы, ингибирующие развитие патогена, занимая бóльшую площадь питательной среды ЧП (гиперпаразитизм) (табл. 2; рис. 1 д, е).

Таблица 1 – Активность бактериальных штаммов, образующих стерильную зону антагонистического действия, в отношении возбудителя фузариоза *F. graminearum*

Штамм	Ингибирование роста мицелия, %			
	инкубация, сутки			
	5 <sup>е</sup>	10 <sup>е</sup>	15 <sup>е</sup>	20 <sup>е</sup>
BZR 148	32,5	46,0	46,0	46,0
BZR 187	41,3	51,1	51,1	51,1
BZR 658	36,4	50,4	41,7	41,7
BZR 576	34,4	46,8	45,3	45,3
BZR 577	29,5	45,3	45,3	45,3
BZR 673	27,6	42,4	42,4	42,4
BZR 348	13,0	42,1	48,2	47,5
BZR 441	20,7	47,8	51,8	51,8
BZR 472	18,2	42,1	48,2	48,2
BZR 538	29,7	42,9	45,3	45,3
BZR 416	25,8	42,9	47,5	47,5
BZR 435	22,0	48,6	54,7	54,7
BZR 504	22,0	41,3	48,2	46,8
BZR 537	20,7	45,4	51,1	49,6
BZR 523	25,0	47,3	54,4	54,4
BZR 430	10,5	39,6	44,6	44,6
BZR 367	14,3	47,8	50,4	48,2
BZR 417	24,6	42,1	48,9	48,9

Штаммы BZR 148, BZR 187, BZR 577, BZR 673 и BZR 441 проявили высокую ингибирующую активность в отношении *F. graminearum*, которая сохранялась с десятых суток до конца инкубации. Тогда как штаммы BZR 367 и BZR 504 к десятым-пятнадцатым суткам совместной инкубации

оказывали примерно равное антагонистическое действие на тест-объект, однако, к двадцатым суткам культивирования *F. graminearum* активнее преодолевал воздействие бактериальных метаболитов (табл. 1).

Максимальную ингибирующую активность по отношению к *F. graminearum* проявили высокоподвижные штаммы BZR 241, BZR 337 и BZR 455, которые уже на пятые сутки совместной инкубации занимали большую площадь питательной среды ЧП, блокируя развитие патогена (табл. 2; рис. 1 д, е).

Таблица 2 – Активность бактериальных штаммов, ингибирующих развитие возбудителя фузариоза *F. graminearum*

Штамм	Ингибирование роста мицелия, %			
	инкубация, сутки			
	5 <sup>е</sup>	10 <sup>е</sup>	15 <sup>е</sup>	20 <sup>е</sup>
BZR 86	45,2	56,8	54,0	52,5
BZR 241	53,0	56,8	55,4	53,2
BZR 277	35,4	50,4	50,4	49,6
BZR 261	44,6	48,2	46,8	48,2
BZR 480	0	41,3	48,2	49,6
BZR 336-г	37,3	58,4	62,6	61,9
BZR 336-с	32,2	51,9	56,8	56,8
BZR 462	29,7	55,1	59,0	57,6
BZR 512	30,9	45,4	50,4	49,6
BZR 413	37,3	54,3	59,7	56,8
BZR 337	55,2	64,1	59,0	57,6
BZR 455	55,2	46,2	52,5	56,8

Среди особенностей воздействия метаболитов выделенных активных штаммов бактерий на *F. graminearum* необходимо отметить следующее: в зоне антагонистического действия бактерий в некоторых вариантах патогенный изолят не сформировал воздушный мицелий, также наблюдался лизис уже сформировавшегося мицелия, ингибирование роста и потемнение мицелия патогена (рис. 1).

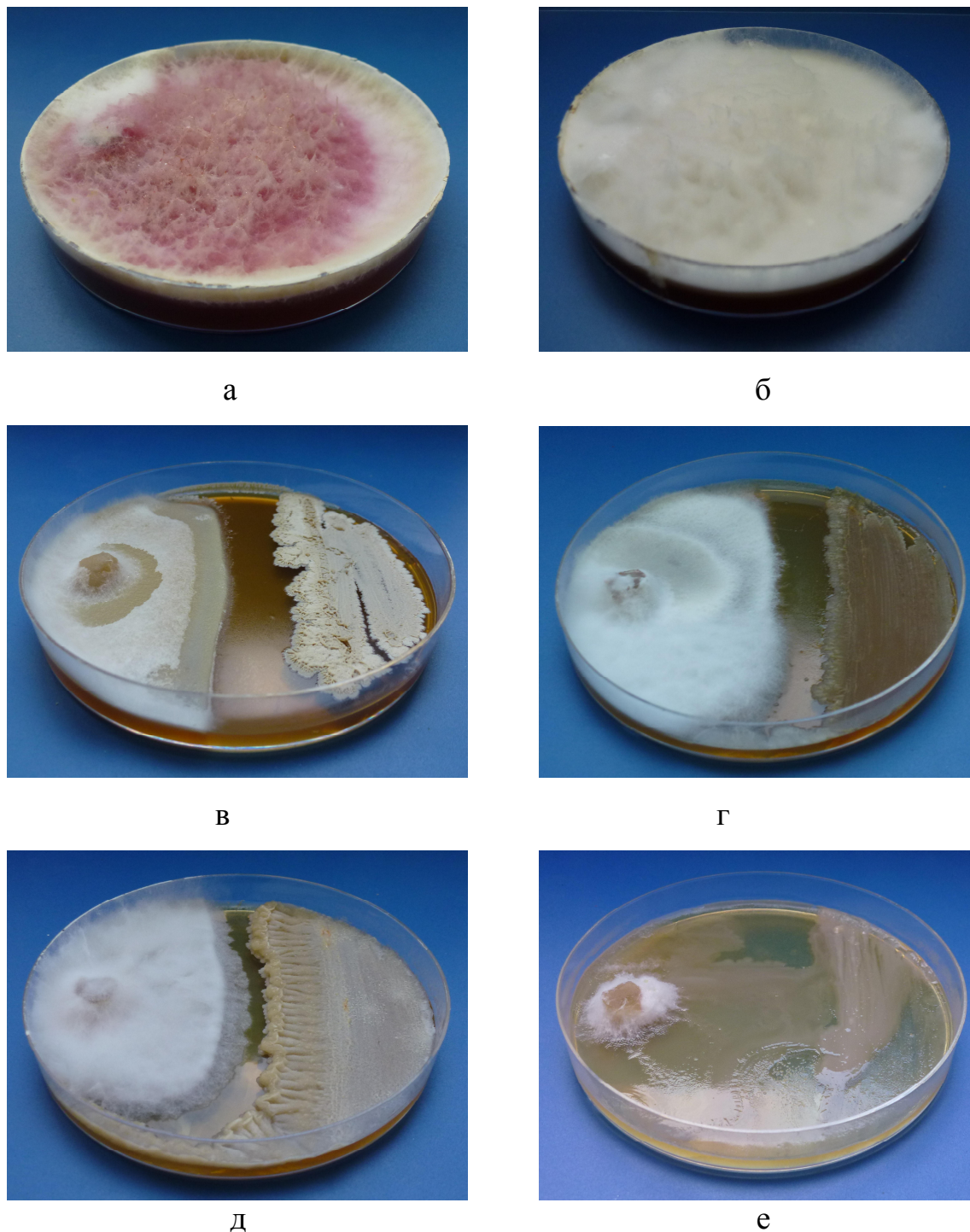


Рисунок 1 - Антифунгальное действие перспективных бактериальных штаммов в отношении гриба *Fusarium graminearum*:

- а – контроль (чистая культура *F. graminearum* без антагониста на КГА);  
б – контроль (чистая культура *F. graminearum* без антагониста на среде KB);  
в – *F. graminearum* и штамм BZR 441 (KB);  
г – *F. graminearum* и штамм BZR 537 (KB);  
д – *F. graminearum* и штамм BZR 336-с (KB);  
е – *F. graminearum* и штамм BZR 455 (КГА).



Некоторые микроорганизмы способны использовать в качестве субстратов самые различные высокомолекулярные соединения. Однако макромолекулы не могут проникать через мембрану клетки. Они подвергаются расщеплению, которое осуществляется под воздействием экзоферментов, относящихся к классу гидролаз. Большая часть гидролитических ферментов относится к категории индуцибельных, то есть эта группа ферментов синтезируется только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата-индуктора. При этом индуцированный синтез ферментов идет, пока в среде присутствует индуктор [10].

Известно, что при избытке питательных веществ в среде, обильно заселенной бактериями, главным фактором подавления прорастания спор фитопатогенов становится конкуренция за питательные вещества. При небольшом количестве бактерий в среде и недостатке питательных веществ, проявляются антагонистические свойства бактерий и их способность лизировать гифы гриба, основным структурным компонентом клеточной стенки которых является хитин-глюкановый комплекс [11]. Наличие высокой хитиназной активности микроорганизмов дает возможность извлечения азота и углерода из труднодоступных соединений, каковым является хитин, и, как следствие, включение этих элементов в круговорот почва-атмосфера [12]. Важно отметить, что обязательным условием эффективного лизиса патогенных грибов и/или использования грибного мицелия как источника питания связано с комплексным действием различных гидролитических ферментов [13, 14].

Вследствие этого была изучена способность перспективных бактериальных штаммов продуцировать гидролитические ферменты. Нами выявлен различный уровень синтеза литических ферментов у исследуемых штаммов бактерий-антагонистов (табл. 3).

Таблица 3 – Производство гидролитических ферментов перспективными штаммами бактерий-антагонистов

Штамм	Ферменты		
	протеаза	липаза	хитиназа
BZR 336-г	++++	+++	-
BZR 336-с	++++	+++	-
BZR 86	-	-	+
BZR 148	-	-	-
BZR 187	++++	++++	-
BZR 241	++++	-	-
BZR 261	-	-	-
BZR 277	++++	+++	-
BZR 337	++++	+++	-
BZR 348	++++	++	-
BZR 367	++++	-	-
BZR 413	++++	++++	+
BZR 416	++++	++++	-
BZR 417	-	++++	-
BZR 430	++++	-	-
BZR 435	++++	++++	-
BZR 441	++++	++++	-
BZR 455	-	++++	-
BZR 462	++++	-	+++
BZR 472	++++	++++	-
BZR 480	++++	+++	-
BZR 504	+++	++	-
BZR 512	++++	-	++
BZR 523	+++	+++	-
BZR 537	++++	+++	-
BZR 538	++++	+++	-
BZR 576	++++	+	-
BZR 577	++++	-	-
BZR 658	++++	++++	+++
BZR 673	++++	-	++

Примечание:

– отсутствие активности; + очень слабая активность; ++ слабая активность; +++ средняя активность; ++++ сильная активность.

Ряд штаммов с высокой антифунгальной активностью показали способность к синтезу трех (BZR 413 и BZR 658), а также двух групп гидролитических ферментов (BZR 336-г, BZR 336-с, BZR 187, BZR 277, BZR 337, BZR 416, BZR 435, BZR 441, BZR 462, BZR 472, BZR 480, BZR 523, BZR 537 и BZR 538) (табл. 3).

Таким образом, установлено, что выделенные и исследованные штаммы бактерий активно подавляют *in vitro* развитие фитопатогенного гриба *F. graminearum*, одного из самых вредоносных возбудителей фузариоза озимой пшеницы.

### **Заключение**

В результате скрининга по признаку антифунгальной активности в отношении одного из наиболее вредоносных представителей грибов рода *Fusarium* (*F. graminearum*) для озимой пшеницы из 530 бактериальных культур отобрано 30 штаммов в качестве возможной основы биопрепаратов с высокой степенью ингибирования тест-культуры: 41,7-61,9 %.

Выявлены две группы штаммов бактерий по механизму антифунгального действия в отношении гриба *F. graminearum*:

- штаммы, образующие стерильную зону антагонистического действия;
- штаммы, ингибирующие развитие патогена, занимая большую площадь питательной среды ЧП (гиперпаразитизм).

Отмечены существенные морфологические изменения патогенного гриба под воздействием вторичных метаболитов перспективных бактериальных штаммов: отсутствие воздушного мицелия, лизис и израстание уже сформировавшегося мицелия, ингибирование роста и потемнение мицелия патогена.

Установлено, что штаммы с высокой антифунгальной активностью в отношении гриба *F. graminearum* проявляли способность к синтезу нескольких групп гидролитических ферментов.

Проведенные исследования открывают перспективы использования в сельскохозяйственной практике новых агентов биоконтроля возбудителей фузариоза озимой пшеницы с последующей разработкой технологий получения и применения новых биопрепаратов полифункционального типа действия.

## Литература

1. Калько Г.В. Биологические обоснование создания биопрепаратов, эффективных в отношении фузариозных заболеваний сельскохозяйственных культур: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб, 1996. – 22 с.
2. Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Назаровская Л.А. Фузариоз колоса хлебных злаков. СПб., 2004. – 164 с.
3. Маслиенко Л.В., Мурадасилова Н.В. Изыскание и первичный скрининг штаммов грибов-антагонистов возбудителей фузариоза // Науч.-технич. бюлл. ВНИИ маслич. культур. – Краснодар, 2002. – Вып. 126. – С. 29-35.
4. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria / Köhl J., Postma J., Nicot P. et al. // Biological control. – 2011. – Vol. 57. – P. 1-12.
5. Ваксман З.А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества. М.: Гос. изд-во иностр. лит., 1947. – 391 с.
6. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. – 78 с.
7. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Risoctonia solani* in tomato/ Montealegre J.R., Reyes R., Perez L.M. et al. // Electronic Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 6, № 2. – P. 116-127.
8. Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС Пресс, 2003. – 120 с.
9. Недорезков В.Д. Биологическое обоснование применения эндофитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале: автореф. дис. ... док. биол. наук. СПб.-Пушкин, 2003. – 42 с.
10. Нетрусов Ф.И. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
11. Возняковская Ю.М., Труфанова А.К. Взаимодействие *Helminthosporium sativum* – возбудителя корневой гнили культур с сапрофитными почвенными бактериями // Микология и фитопатология. – 1988. – Т. 22, № 2. – С. 157-161.
12. Сукцессия хитинолитических микроорганизмов в черноземе / Манучарова Н.А., Белова Э.В., Воробьев А.В. и др. // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 5. – С. 693-698.
13. Выделение и фенотипическая характеристика ростостимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов / Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. и др. // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 4. – С. 521-525.
14. Широков А.В. Миколитические ферменты бактерий *Bacillus Cohn* и их роль в антагонизме к почвенным микромицетам: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2004. – 22 с.