

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЧВООБИТАЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЗАЩИТЫ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ОТ КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ

USE OF PGPR BACTERIA FOR PROTECTION SUGAR BEET FROM ROOT ROT

Леманова Н.Б.

Институт генетики, физиологии и защиты растений
Республика Молдова, Кишинев, Пэдурий, 20
E-mail: lemanova@list.ru

В последние годы повышенный интерес вызывает использование почвообитающих микроорганизмов для защиты растений от болезней. Актуальность: применение PGPR бактерий для увеличения урожайности, улучшения качества продукции растениеводства и снижения пестицидной нагрузки на окружающую среду. Цель исследований — изучение способности сапрофитных почвообитающих бактерий проявлять антагонистические свойства по отношению к возбудителям корневых гнилей. Материалы: из больных корнеплодов свеклы были выделены 2 изолята патогенных грибов, идентифицированных как *Fusarium oxysporum* и *Fusarium gibbosum*, которые снижали всхожесть семян на 60–75%. Результаты. Определена *in vitro* антагонистическая способность 4-х видов почвообитающих диазотрофных бактерий по отношению к грибным патогенам по радиусу зон их угнетения при совместном культивировании, среди которых *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05, *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04, *Pseudomonas putida*-PsB-06, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 (депонированы в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Молдовы). Полив высеванных в почву инокулированных патогенами семян свеклы бактериальными суспензиями увеличилось всхожесть семян на 20–30%, стимулировало развитие растений и вес корнеплодов в 2,2–4 раза.

Ключевые слова: корневые гнили, почвообитающие ризосферные бактерии, антагонизм.

Для цитирования: Леманова Н.Б. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЧВООБИТАЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЗАЩИТЫ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ОТ КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ. *Аграрная наука*. 2019; (2): 72–74.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-2-72-74>

Среди возбудителей корневых гнилей растений в Молдове представители рода *Fusarium* spp. занимают в разные годы 47,0–66,0% [1]. Грибы этого рода наиболее вредоносные почвенные патогены-возбудители корневых гнилей многих видов растений. Возбудитель способен вести сапрофитный образ существования, усиливая вредоносность на ослабленных растениях. Урожайность сахарной свеклы из-за фузариоза в засушливые годы по пшенице в качестве предшественника, снижалась в 10 раз до 2,6 т/га [5]. При выращивании сахарной свеклы в севообороте после озимой пшеницы наблюдалась гибель всходов под влиянием *Fusarium* spp. [2]. Распространение возбудителя на растениях пшеницы, посеянной после сахарной свеклы, составляло 78% (после черного пара — 20,5%) [6].

Целью исследований было изучение способности сапрофитных почвообитающих бактерий из коллекции лаборатории фитопатологии и биотехнологии ИГФЗР проявлять антагонистические свойства по отношению к возбудителю корневой гнили *Fusarium* spp. Бактериальные штаммы депонированы в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Республики Молдова.

Материалы и методы

Исследования проводили по общепринятым в микробиологической практике методам [3]. Для культи-

Natalia Lemanova

Institut of Genetic, Physiology and Plant Protection of Moldova .
2060, Kishinev. Lesnaja, 26. e-mail: lemanova@list.ru

In the recent years, the use of soil microorganisms has generated great interests in crop production by reducing the damage of diseases. Actualite. The application of PGPR bacteria makes possible to improve the quantity and quality of plant s harvest and to reduce chemical pressure on the environment. The aim of investigations — study of the ability of the soil saprophytic diazotrophs bacteria (PGPR) reducing the infectious background of root rot diseases. deposited in the National Collection of nonpathogenic microorganisms of Moldova — *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05, *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04, *Pseudomonas putida*-PsB-06, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08. Materials. The agents pathogens from the beet tuber were isolated on potato-glucose agar and were identification as *Fusarium oxysporum* and *Fusarium gibbosum*, They reduce the shoots of beet seeds for 60–75%. The ability for antagonism strains *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05, *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04, *Pseudomonas putida* — PsB-06, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08, deposited in the National Collection of nonpathogenic microorganisms of Moldova was defined in laboratory tests. Results. The suspension of bacterial strains with titre 108 CFU/ml show the antagonism *in vitro* toward the fitopathogens in time cultivation combine in Petri plates: the radius of delay growth *Fusarium* spp. were establish. Traitment of beet seeds, inoculate with pathogens, in time sowing with bacterials suspensions decreased the level of infection from agents pathogens of root rot, increased the shoots of beet seeds for 20–30%, the weight of tuber in 2.2–4,0 one and improved production of plants.

Key words: plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), root rot diseases, antagonism.

For citation: Lemanova N. USE OF PGPR BACTERIA FOR PROTECTION SUGAR BEET FROM ROOT ROT. *Agrarian science*. 2019; (2): 72–74. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-2-72-74>

вирования бактерий использовали жидкие и агаризованные питательные среды, специфичные для каждого вида бактерий [4]. Стерилизация — автоклавированием согласно составу ингредиентов. Культивирование бактерий в термостате в течение 2-х суток при 27...290C. Определение титров жидких концентрированных суспензий производится методом последовательных разведений.

Суспензии бактериальных штаммов культивировали в жидкой и агаризованной питательной среде King B. Для получения инокулюма грибной патоген культивировали на жидкой КГА среде в течение 3-х суток на качалке с 160 об/мин при 28 °C. Для установления патогенности штаммов семена сахарной свеклы (гибрид SZM-34), погружали на 1 час в суспензии инокулюма различных разведений с последующим размещением их на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Для определения антагонистических по отношению к фузариуму свойств бактерий культуру патогенного гриба наносили в центр чашки Петри с КГА, а по периферии газона располагали по 6 блоков агара с живой культурой бактериальных штаммов *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06, *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08, *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04, вырезанных из выросших колоний на питательной среде King B. Размещали чашки Петри в термостате

на 7 дней при температуре 28 °С. По зонам отсутствия и угнетения роста определили взаимоотношения между грибом и бактериями.

В вегетационных опытах *in vivo* готовили рабочие суспензии с титром 108 КОЕ/мл для внесения в почву, с титром 106 КОЕ/мл для бактериализации семян сахарной свеклы. Для создания инфекционного фона суспензию патогена *Fusarium spp.* вносили в почву за 2 недели до посева семян из расчета 500мл/кг субстрата.

Результаты

Выделено из поврежденных корнеплодов свеклы 2 изолята гриба на картофельно-глюкозный агар (КГА). По морфологическим и культуральным свойствам изоляты идентифицированы как *Fusarium gibbosum* (FG) и *Fusarium oxysporum* (FX). У первого штамма — мицелий гриба бело-розовый с обильным пушистым спороношением белого цвета, у второго — мицелий серо-фиолетовый с грязно-беловатым спороношением.

Патогенность грибов проверяли, проращивая обработанные суспензией жидкой культуры гриба семена свеклы сахарной во влажной камере чашек Петри при комнатной температуре в течение 11 дней. В контроле без инокуляции проросло 80% семян; при разведении инокулята гриба с водой 1:25 и 1:50 — 5% семян; при разведении 1:100 — 20% семян. При этом семена и семядольные листья, корешки были покрыты мицелием патогена.

Антагонистические свойства бактерий по отношению к штаммам *Fusarium* определяли по зонам отсутствия и угнетения роста. В контроле мицелий гриба заселял всю площадь газона чашки Петри. Размер зон отсутствия роста патогена (радиус) под воздействием метаболитов бактериальных культур представлен в таблице № 1 (средний показатель измерений между 15 блоками и мицелием гриба в 3-х чашках Петри).

Диапазон антагонистических способностей исследуемых микроорганизмов обусловлен разнообразием свойств их метаболитов. Грамположительные бактерии рода *Bacillus sp.* известны как продуценты экзополисахаридов, внеклеточных протеиназ, липопептидов, хитинолитических ферментов, способных разрушать клеточные стенки патогенов, этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот, в том числе эссенциальных, в состав которых входит арахидоновая кислота *Bacillus sp.* проявляют антибиотическую и антигрибную активность [8]. Биологически — активные вещества метаболитов грамотрицательных бактерий рода

Таблица 1.

Размер зон отсутствия роста мицелия гриба *Fusarium spp.* на КГА в чашках Петри под воздействием метаболитов бактериальных штаммов *in vitro*

Штаммы	Размер зон отсутствия роста колоний патогена <i>Fusarium sp.</i> (см) под влиянием метаболитов бактерий	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium gibbosum</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9,7 мм	9,5 мм
<i>Pseud. aureofaciens</i>	13,9 мм	13,5 мм
<i>Pseudomonas putida</i>	10,5 мм	8,2 мм
<i>Bacillus subtilis</i>	17,0 мм	10,02–10,4 мм
<i>Bacillus polymixa</i>	18,6 мм	10,06–10,14 мм

Рис. 1. Зоны отсутствия роста грибов *Fusarium spp.* под воздействием метаболитов бактериальных штаммов: 5 — *Ps. aureofaciens*; 6 — *Ps. fluorescens*; X — *Ps. putida*; L — *Bac. subtilis*; N — *Bac. polymixa*

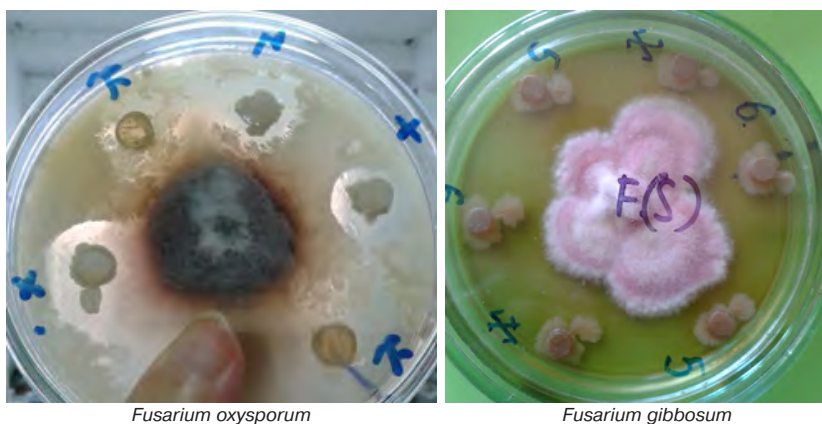


Таблица 2.

Ингибирование *Fusarium gibbosum* в почве под влиянием бактериальных суспензий, внесенных при посеве семян сахарной свеклы

Варианты средние показатели	Суспензия <i>Fusarium</i> в почве	Полив почвы при посеве семян суспензиями			
		<i>Ps. putida</i>	<i>Ps. aureo-faciens</i>	<i>Bac. subtilis</i>	Вода
% всхожести семян	60	80	90	90	80
Размер прироста(см)	6,8	9,7 *	12,5	9,6	9,0
Масса корнеплода (г) 1 растения	0,62	2,5 **	2,5	2,48	2,0

Pseudomonas: пиовердины, феназины, цианиды, гиббереллины, цитокинины, ИУК [7]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования diaзотрофных почвообитающих бактерий-антагонистов возбудителя корневых гнилей для создания биофунгицидов.

Установлено, что надземный прирост растений в вариантах внесения бактериальных суспензий на поверхность семян свеклы при посеве в ранее инокулированную патогеном почву, превышает этот показатель в инфицированной почве в 1,2 раза, а вес корнеплода — в 3,9 раза, что подтверждает способность бактерий ингибировать отрицательное воздействие инфекции *Fusarium gibbosum* на растения сахарной свеклы в почве.

Интродуцированные в почву бактериальные клетки за счет корневых выделений растений получают источ-

ник питания и активизируют свою жизнедеятельность. Метаболиты бактерий повышают содержание ауксинов и цитокининов в растении, увеличивают активность многих ферментов, которые способствуют повышению устойчивости растений к патогенам как в зоне корней, так и при нанесении на поверхность вегетирующих органов. Бактерии рода *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. обладают высокой степенью колонизации корней, длительно поддерживают плотность культуры в субстрате, способны активно растворять труднодоступные для

растений фосфаты почвогрунтов и могут заменять химические удобрения (7, 8).

Выделение гриба из почвы после выкопки растений сахарной свеклы на КГА подтвердило наличие массы колоний *Fusarium* (3/4 площади чашки Петри) в субстрате эталона, снижение числа колоний в вариантах внесения в почву суспензии *Bac.subtilis* (4 колонии) и *Pseudomonas putida* (2 колонии) и полное отсутствие гриба в варианте внесения в почву при посеве семян суспензии *Pseudomonas aureofaciens*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lupascu G. Microbial communities involved in the developing of root rot under RMoldova //IV Symposium national RM. Chisinau. — 2016. — P.92.
2. Чугаев С.И. Поражение посевов пшеницы корневыми гнилями // Сб.ИЗР. — 2011. — Минск. — С. 813–817.
3. Большой практикум по микробиологии // М. Высшая школа. -1962. — 490 с.
4. J-P Larpent. Manuel pratique de microbiologie // «Hermann». — 1991. — Paris. — 230 p.
5. Бучнева Г.Н. Распространение фузариозов как следствие изменения климата // «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем». — 2014. — Краснодар. — С.345–348.
6. Бугачук М.В. Продуктивность сахарной свеклы в свекло-сеющей зоне // «Resultatele si perspectivi cercetorilor la cultura plantelor de cimp». -2014.- Belji. — P.377–384.
7. Горбунов О.П., Доронина Н.В. Биопрепараты на основе штаммов *Pseudomonas*: применение в органическом земледелии // Сборник «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем». — 2014. — Краснодар. — С.223–226.
8. Хомяк Ф.И., Асатурова А.М. Оптимизация параметров культивирования бактерий рода *Bacillus* — продуцентов био-фунгицидов //Сб. «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем». — 2016. — Краснодар. — Т.9. — С.308–310.

REFERENCES

1. Lupascu G. Microbial communities involved in the developing of root rot under RMoldova //IV Symposium national RM. -2016. — Chisinau. — P.92.
2. Chugaev S.I. The defeat of wheat crops root rot // Sb.IZR. — 2011. — Minsk. — P. 813–817.
3. A large workshop on microbiology // M. High School. -1962. — 490 p.
4. J-P Larpent. Manuel pratique de microbiologie, Hermann. -1991. -Paris.- 230 p.
5. Buchneva G.N. Distribution of fusariums as a result of climate change // “Biological plant protection is the basis for the stabilization of agroecosystems. — 2014. — Krasnodar. — P.345–348.
6. Bugachuk M.V. The productivity of sugar beet in the beet-growing zone // “Resultatele si perspectivi cercetorilor la cultura plantelor de c mp”. -2014.- Bel i. — P.377–384.
7. Gorbunov O.P., Doronin N.V. Biological products based on *Pseudomonas* strains: application in organic farming // Collection “Biological protection of plants — the basis for the stabilization of agroecosystems.” — 2014. — Krasnodar. — P.223–226.
8. Khomyak F.I., Asaturova A.M. Optimization of cultivation parameters of bacteria of the genus *Bacillus* — producers of biofungicides // Proc. “Biological plant protection — the stabilization of agro-ecosystems.” — 2016. — Krasnodar. — T.9. — P.308–310.

ОБ АВТОРЕ:

Леманова Н.Б., кандидат биологических наук

ABOUT THE AUTHOR:

Natalia Lemanova, PhD in biology