

КУТЛУБЕРДИНА ДИАНА РЕНАТОВНА

**АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ *BACILLUS SUBTILIS* COHN
КАК АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* LINK**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САРАТОВ – 2010

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном
учреждении высшего профессионального образования
«Башкирский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Хайруллин Рамиль Магзинурович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Тихомирова Елена Ивановна

кандидат биологических наук
Ксенофонтова Оксана Юрьевна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биологии
Уфимского научного центра РАН

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Микробный антагонизм, сущность которого заключается в подавлении одних видов микроорганизмов другими, хорошо известен как природное явление и используется в различных целях в медицине, ветеринарии и растениеводстве (Малик, Панин, 2001; Недорезков, 2003; Мелентьев, 2007; Похиленко, Перелыгин, 2007). В последнее время большое внимание уделяется изучению механизмов биоконтроля возбудителей различных заболеваний растений с помощью микробов-антагонистов и разработке на их основе способов регуляции болезнеустойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур (Кожемяков, Тимофеева, 2007; Монастырский, 2008).

Среди микробов-антагонистов хорошо известны бактерии *Bacillus subtilis* Cohn, способные подавлять развитие различных микроорганизмов – патогенов растений (Недорезков, 2003). Известно, что некоторые виды грибных фитопатогенов опасны способностью не только снижать продуктивность растения, но и ухудшать качество продукции. К таким фитопатогенам относятся грибы рода *Fusarium* Link, вызывающие фузариоз колоса злаков, который может приводить к накоплению в зерне фузариотоксинов и вызывать алиментарные токсикозы человека и животных (Грушко, Линченко, Хан, 2005). Поражение зерна пшеницы фузариозом в последние годы возрастает, равно как и тенденция загрязнения продовольствия микотоксинами (Копonenko, Burkin, 2006; Безбородова, Подчерзцева, 2009; Монастырский, Першакова, Кузнецова, 2009). Проблема снижения распространенности фузариоза не теряет остроту из-за «неподатливости» вызывающих его грибов к искоренению химическими фунгицидами (Тютерев, 2006). В связи с вышесказанным актуальным является изучение природных механизмов регуляции плотности популяции фитопатогенов рода *Fusarium*, эффективными агентами биоконтроля которых могут выступать антагонистические бактерии *B. subtilis* благодаря их способности продуцировать антибиотики (Thimon et al., 1992) и/или фунгистатичные ферменты (Мелентьев, 2007). Значительный интерес среди таких бактерий представляют эндофитные штаммы, способные заселять внутренние растительные ткани и препятствовать внедрению фитопатогенов без существенного вреда для растения-хозяина (Chen, Bauske, Musson, 1995).

Целью работы являлось изучение биологических свойств эндофитных антагонистических штаммов *B. subtilis* и обоснование возможности их использования как агентов биоконтроля грибов рода *Fusarium*, заражающих зерно яровой пшеницы.

Для достижения цели были решены следующие **задачи**:

1. Оценить распространенность и выявить основные виды грибов рода *Fusarium*, встречающихся в семенах яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в Республике Башкортостан.
2. Изучить особенности взаимоотношений антагонистических эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* с грибами рода *Fusarium*.
3. Определить влияние клеток антагонистических бактерий *B. subtilis*, а также антибиотиков итурина и сурфактина на спороношение грибов рода *Fusarium*.
4. Выявить влияние бактерий-антагонистов на формирование устойчивости пшеницы к фитотоксичным метаболитам грибов рода *Fusarium*.
5. Определить перспективный штамм *B. subtilis* для разработки препарата против фузариозной инфекции зерна и оценить его безопасность.
6. Оценить эффективность применения перспективного штамма *B. subtilis* в качестве основы препарата для биоконтроля фузариозной инфекции зерна пшеницы.

Научная новизна. Исследованы особенности взаимоотношений антагонистических штаммов бактерий *B. subtilis*, выделенных из внутренних тканей пшеницы, с грибами рода *Fusarium*, заражающими зерно этой же культуры. В зерне пшеницы, репродуцированном в Республике Башкортостан, идентифицировано 11 видов грибов рода *Fusarium*, 3 из которых (*F. acuminatum* (Ellis&Everh), *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. equiseti* (Corda) Sacc.) ранее не были описаны в указанном регионе как возбудители фузариоза. Выявлено, что самыми

распространенными и доминирующими видами в структуре фитопатогенного комплекса этих грибов, формирующегося в зерне пшеницы, являются *F. sporotrichioides* (Sherb.), представленный генетически разнородными изолятами, и *F. poae* (Peck.) Wollenw., представленный однородными популяциями, характерными для определенной зоны. Выявлено, что штаммы *B. subtilis* проявляют различную степень антагонистической активности по отношению к фузариевым грибам, а последние, в свою очередь, различаются чувствительностью к бактериям – продуцентам антибиотических веществ. Показано, что высоко антагонистические штаммы *B. subtilis*, а также антибиотики итурин и сурфактин ускоряют образование макроконидий у *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. и *F. sporotrichioides*. Выявлено, что подавление роста грибов рода *Fusarium* бактериями *B. subtilis* связано с ингибированием прорастания грибных конидий. Впервые показана способность антагонистических штаммов *B. subtilis* повышать устойчивость пшеницы к действию фитотоксинов грибов рода *Fusarium*. Изучено влияние инокуляции семян пшеницы препаратом нового штамма эндофитных бактерий *B. subtilis* 11PH на распространенность и видовой состав фузариевых грибов в зерне пшеницы и показана эффективность его применения в качестве основы биопрепарата для биоконтроля фузариозной инфекции зерна. Показано, что обработка семян изученными биопрепаратами, а также системным фунгицидом на основе тебуконазола приводит к преобладанию в инфицированном зерне нового урожая видов *F. sporotrichioides* и *F. poae* в сравнении с другими.

Практическая значимость работы. Исследования взаимоотношений эндофитных антагонистических штаммов *B. subtilis* с грибами рода *Fusarium* позволяют разрабатывать новые способы и средства экологически безопасного биоконтроля указанных грибов. Штамм *B. subtilis* 11PH может быть использован в качестве основы препарата для биоконтроля фузариозной инфекции зерна пшеницы, не уступающего по эффективности химическим фунгицидам на основе тебуконазола и рекомендуемого для включения в план регистрационных испытаний пестицидов на территории Российской Федерации. Изоляты грибов рода *Fusarium*, выделенные из зерна пшеницы, репродуцированной в разных зонах республики, используются сотрудниками лаборатории биотехнологии научно-образовательного центра Башкирского ГАУ для микробиологических разработок, а также студентами при выполнении курсовых и дипломных работ. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций по дисциплинам «Сельскохозяйственная микробиология», «Биотехнология в растениеводстве», «Фитопатология», а также проведении лабораторно-практических занятий.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В Республике Башкортостан в зерне яровой пшеницы наиболее распространенными и доминирующими являются виды *F. sporotrichioides* и *F. poae*. Вид *F. sporotrichioides* представлен генетически разнородными изолятами, не формирующими популяции, характерные для одной природно-сельскохозяйственной зоны или однородные внутри зоны. В отличие от этого вид *F. poae* представлен однородными популяциями, характерными для определенной зоны.

2. Устойчивость фитопатогенных грибов рода *Fusarium* к антагонистическим штаммам *B. subtilis* видоспецифична, также как и специфична антагонистическая активность эндофитных представителей *B. subtilis* к этим грибам.

3. Эндофитные штаммы *B. subtilis* способны повышать устойчивость пшеницы к фитотоксичным метаболитам грибов рода *Fusarium*.

4. Антагонистический штамм *B. subtilis* 11PH является не вирулентным, не токсичным и не токсигенным и может служить основой нового препарата для защиты яровой пшеницы от фузариозной инфекции зерна, не уступающего по биологической эффективности химическим фунгицидам раксил или террасил.

5. Обработка семян яровой пшеницы биопрепаратами на основе штамма *B. subtilis* 11PH или штаммов *Pseudomonas fluorescens* (бинорам), а также химическим фунгицидом на основе тебуконазола (раксил, террасил) повышает встречаемость в зерне нового

урожая видов *F. sporotrichioides* и *F. poae* в сравнении с другими видами грибов рода *Fusarium*.

Работа выполнена в Башкирском ГАУ в рамках заказа Минсельхоза России за счет средств Федерального бюджета по теме «Разработка полифункциональных биофунгицидов для растениеводства» (№ госрегистрации 01200853490).

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: II Всероссийской конференции «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (Санкт-Петербург, 2008); IV Межрегиональной конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2008); Междисциплинарном микологическом форуме «Иммунопатология, аллергология, инфектология» (Москва, 2009); Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» (Киров, 2009); Всероссийской научной школе для молодежи «Инновационные методы и подходы в изучении естественной и антропогенной динамики окружающей среды» (Киров, 2009); Всероссийской конференции «Проблемы и перспективы изучения естественных и антропогенных систем Урала и прилегающих регионов» (Стерлитамак, 2010).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 13 работ, из которых 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, двух глав: обзора литературы и экспериментальной части, включающей объекты и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение; а также заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Работа изложена на 147 страницах, содержит 9 рисунков, 25 таблиц. Список использованных литературных источников включает 285 наименований, в том числе 173 зарубежных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты, материалы и методы исследования

В работе использовали 20 новых антагонистических штаммов *B. subtilis*, выделенных сотрудниками лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ из внутренних тканей визуально здоровых растений пшеницы; 3 штамма *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* 11В и *B. subtilis* 26Д, предоставленные обществом с ограниченной ответственностью научно-производственным предприятием «БИОФОРТ»; штамм *B. subtilis* М1, полученный из коллекции Башкирского ГАУ; 11 видов грибов *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum*, *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *F. acuminatum*, *F. tricinctum*, *F. equiseti*, *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. sambucinum* Fuckel, *F. oxysporum* Schltdl., выделенные из зерна мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), репродуцированной в северной и южной лесостепи, а также предуральской степи Республики Башкортостан; а также штаммы *F. avenaceum* 45, *F. culmorum* 63, *F. graminearum* 68, *F. sambucinum* 480, *F. oxysporum* 80, *F. solani* 55, *F. sporotrichioides* 57, полученные из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии, г. С.-Пб.-Пушкин.

Фитозэкспертизу семян проводили по методу Н.А. Наумовой (1970) и J. de Tempe (1961), отбирая зерно в фазу полной спелости (Иващенко, Шипилова, 2004). Виды грибов устанавливали по таксономии В. Герлаха (Gerlach, Nirenberg, 1982) и К. Буса (Booth, 1979). Распространенность и частоту встречаемости видов определяли согласно работе Н.П. Шипиловой с соавт. (1998). Зараженность оценивали по методике Дж. Пилат (Pelhate, 1979). ДНК экстрагировали смесью хлороформа с октанолом (Мироненко, Булат, 2002). ПЦР проводили в термоциклере PTC-150 MiniCycler (MJ Research, Watertown, Mass.), используя ДНК-полимеразу *T. aquaticus* (McPherson et al., 1995). Электрофорез проводили в приборах Sub-Cell GT WIDI MINI (Bio-Rad, США). Гели документировали при помощи видеосистемы («АО

ДНК-технология», Россия, программа Gel Imager 2). Фитотоксичные метаболиты грибов получали, культивируя их в колбах с жидкой средой Чапека при 25°C на шейкере BIOSAN ES-20. Фитотоксичность культурального фильтрата (КФ) оценивали, проращивая в нем семена и анализируя всхожесть и размеры проростков пшеницы. Антагонизм штаммов *B. subtilis* изучали методом агаровых блоков (Нетрусов, 2005). Токсико-гигиеническую оценку штамма *B. subtilis* 11PH проводили в ФГУ «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора по заказу Башкирского ГАУ. Влияние *B. subtilis* на рост растений определяли, обрабатывая семена спорами бактерий и проращивая на влажной фильтровальной бумаге в темноте. У проростков измеряли длину главного корня и надземной части. Экспериментальный образец препарата на основе штамма *B. subtilis* 11PH (1 млрд. КОЕ в 1 мл) получали, используя газо-вихревой биореактор «БИОК» (ЗАО «Саяны», Новосибирск). Расход препарата составлял 1 л, рабочей жидкости – 10 л на 1 т семян. Эталонами служили фунгициды раксил (Bayer, Германия) и террасил. Препарат бинорам (*Pseudomonas fluorescens* 7Г, 7Г2К, 17-2) предоставлен ООО «Алсико-Агропром» (Москва). Семена обрабатывали вручную за неделю до посева по рекомендациям фирм-изготовителей. Делянки (1 кв. м., 3 повтора) засеивали вручную. Результаты обрабатывали с помощью статистических программ Microsoft Office.

Результаты исследований и их обсуждение

Распространенность и основные виды грибов рода *Fusarium*, встречающихся в зерне яровой пшеницы в Республике Башкортостан.

Для изучения взаимоотношений эндофитных антагонистических штаммов бактерий *B. subtilis* с грибами рода *Fusarium* первоначально была проведена оценка распространенности этих фитопатогенов в зерне пшеницы, а также выявлены основные виды, инфицирующие семена. Так как территория республики крайне неоднородна по климатическим условиям, анализировались образцы зерна пшеницы, репродуцированной в трех разных зонах республики. Установлено, что северная лесостепь является самой неблагоприятной зоной по распространенности фузариоза зерна (средняя зараженность 17%, табл. 1).

Таблица 1 - Распространенность фузариозной инфекции в зерне яровой пшеницы

Район	Сорт	Зараженность образца, %			
		2007	2008	2009	Средняя
Северная лесостепь					
Благовещенский	Омская 35	11	16	14	14
Иглинский	Башкирская 26	13	18	12	14
	Казахстанская 10	11	14	16	14
Татышлинский	Омская 35	14	18	22	18
	Омская 36	26	28	28	27
Среднее значение		15	19	18	17
Южная лесостепь					
Аургазинский	Омская 35	6	10	8	8
	Казахстанская 10	4	9	9	7
Дюртюлинский	Омская 35	21	14	18	18
	Башкирская 24	19	2	7	9
	Воронежская 12	11	16	5	11
	Казахстанская 10	8	2	2	4
	Ирень	6	8	6	7
Илишевский	Жница	4	10	6	7
	Омская 35	17	14	16	16
	Казахстанская 10	3	12	9	8
	Ирень	2	0	4	2
Кармаскалинский	Башкирская 26	18	8	12	13
	Омская 35	17	6	9	11

	Башкирская 24	13	17	12	14
	Башкирская 26	11	14	14	13
	Симбирка	9	9	7	8
	Казахстанская 10	8	8	10	9
Кушнаренковский	Казахстанская 10	36	17	14	22
Уфимский	Омская 35	12	10	11	11
	Башкирская 26	8	14	17	13
	Казахстанская 10	12	22	11	15
Чекмагушевский	Московская 35	11	13	8	11
Среднее значение		12	11	10	11
Предуральская степь					
Благоварский	Омская 35	10	14	7	10
Давлекановский	Омская 35	2	2	4	3
Мелеузовский	Башкирская 26	14	22	9	15
	Казахстанская 10	9	14	10	11
Стерлитамакский	Омская 35	2	8	4	5
	Симбирка	5	22	6	11
	Саратовская 55	4	10	6	7
Чишминский	Омская 35	13	26	10	16
	Казахстанская 10	9	14	14	12
	Экада 70	16	10	20	15
	Симбирка	4	20	6	10
	Башкирская 26	16	18	4	13
	Башкирская 24	12	8	10	10
Среднее значение		9	14	8	11
Средняя		12	15	12	13

По ходу продвижения на более засушливый юг республики заселенность зерна снижалась, примерно до равной

степени (11%) в южной лесостепи и предуральской степной зоне. Наибольшая распространенность фузариоза наблюдалась в Дюртюлинском (южная лесостепь) и Чишминском (предуральская степь) районах. Это, вероятно, связано с тем, что местом репродукции анализируемой партии зерна в первом районе служил государственный сортоиспытательный участок, во втором – опытное хозяйство Башкирского НИИСХ, в которых возделываются множество сортов пшеницы из разных регионов страны, что вместе с семенами может привносить и агрессивный фитопатогенный комплекс. Зараженность зерна сильно варьировала в зависимости от сорта пшеницы, например в 2007 г в южной лесостепи от 2% до 36%. Эти данные согласуются с работами О.А. Монастырского с соавт. (2003), Т.К. Шешеговой и А.В. Хариной (2008), И.Б. Абловой (2008) и подтверждают выводы о различии сортов по восприимчивости к фузариозу колоса.

Во всех районах преобладала скрытая форма заражения зерновок (внешне здоровые, всхожие, хорошо выполненные семена, имели нормальный блеск, налет гриба отсутствовал).

При анализе видового состава идентифицировано 11 видов грибов, в том числе 3 (*F. acuminatum*, *F. tricinctum*, *F. equiseti*) – ранее не были описаны, как инфекция зерна яровой пшеницы на территории республики. Поэтому можно сделать вывод о существенном разнообразии видов *Fusarium*, поражающих зерно на территории республики. Наиболее часто зерновки заселяли *F. sporotrichioides* и *F. roae*, продуценты особо опасных фузариотоксинов Т-2 и ниваленола (Гагкаева Гаврилова, Левитин, 2008). Средняя частота встречаемости их в партиях зерна составляла 82% и 70%, соответственно. Во вторую, умеренную по частоте встречаемости группу входили виды *F. avenaceum* (47%), *F. graminearum* (41%), *F. acuminatum* (29%), *F. culmorum* (12%). Другие виды (*F. tricinctum*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*) встречались еще реже. По сравнению с прошлым десятилетием, когда явная зараженность зерна не превышала 1-2% (Пирязева, 2001), наметилась тенденция ее роста, также как и смена видового разнообразия грибов рода *Fusarium*, вызывающих эту инфекцию.

Известно, что микроорганизмы интенсивнее развиваются на травмированных семенах в сравнении с семенами крупной фракции (Оробинский, 2006). Анализ фракций зерна разных размеров (проход через сито 2,2 мм и остаток на сите), выявил, что зараженность мелкого зерна, как правило, используемого как фуражное, оказалась примерно в два раза выше, чем семенного и продовольственного (табл. 2). Эта закономерность проявлялась у разных сортов пшеницы, репродуцированной в различных районах южной лесостепи республики.

Таблица 2 - Сравнительная характеристика зараженности зерна фузариозом

Район	Сорт	Зараженность фузариозом, %	
		мелкое зерно (менее 2,2 мм)	крупное зерно (более 2,2 мм)
Илишевский	Омская 35	17	8
Уфимский	Омская 35	12	7
Дюртюлинский	Омская 35	21	10
Кармаскалинский	Омская 35	17	13
Кушнарниковский	Казахстанская 10	36	17
Дюртюлинский	Башкирская 24	19	10
Кармаскалинский	Башкирская 24	13	9
Средняя		19	11

Внутривидовая изменчивость *F. sporotrichioides* и *F. roae*. Выявлено, что у ДНК всех идентифицированных нами по культурально-морфологическим признакам изолятов *F. sporotrichioides* и *F. roae* имелись четкие фрагменты амплификации, соответствующие видам. В 90-х годах появилось сообщение (Torp, Langseth, 1999) о выявлении новой разновидности *F. roae* - *F. roae* «powdery» («порошистый») в странах северной Европы. Позднее она получила видовой статус по фамилии норвежского миколога Лангсета (W. Langseth) – *F. langsethiae* Torp et Nirenberg. По составу метаболитов этот гриб сходен с *F. sporotrichioides*, а по морфологии – с *F. roae* (Torp, Langseth, 1999; Torp, Nirenberg, 2004). Это предполагало возможность инфицирования семян пшеницы указанным новым видом. Однако согласно ДНК-анализа в исследованных образцах зерна вид *F. langsethiae* не обнаружен.

Методом RAPD-анализа с использованием семи разных десятичленных праймеров со случайной последовательностью (Operon Technologies, Inc. Alameda, CA) выявлен значительный внутривидовой полиморфизм у представителей *F. sporotrichioides*. У изолятов *F. roae* внутривидовое разнообразие проявлялось слабее. Изоляты, выделенные в одной зоне, были сходны между собой (рис. 1). Популяции северной лесостепи и предуральской степи отличались друг от друга. Изоляты южной лесостепи распределились равномерно по вышеупомянутым кластерам, не образуя отдельного.

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

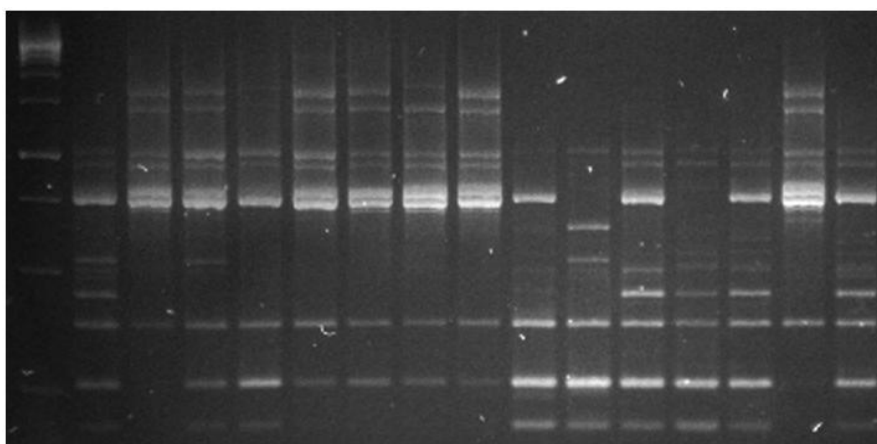


Рис.1. Внутривидовой полиморфизм штаммов *F. roae* в северной лесостепи республики. 1-15 – номера изолятов. М – маркеры размера ДНК

Е.С. Квашнина (1978) описала у *F. roae* «экологические модификации» изолятов, формирующиеся при адаптации к окружающей среде. Эти данные, а также наши результаты свидетельствуют, что географический фактор является одним из определяющих в формировании структуры популяции *F. roae*. По-видимому, повсеместное распространение и отсутствие строгой зональной приуроченности вида *F. sporotrichioides* объясняется его лучшей приспособленностью к экологическим нишам и отсутствием высокой специфичности к видам хозяев, в то время как вид *F. roae*, в основном, выделяется только из злаковых растений (Гагкаева, Гаврилова, Левитин, 2008).

Взаимоотношения антагонистических штаммов *B. subtilis* с грибами рода *Fusarium*. Известно, что фузариоз зерна опасен наличием в нем микотоксинов. Применение химических фунгицидов позволяет частично решить проблему борьбы с фузариозом колоса, однако, в свою очередь, возникает проблема загрязнения зерна пестицидами. Одним из выходов из такой ситуации может быть применение биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов. Ранее в лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ из внутренних тканей яровой пшеницы, произрастающей в Республике Башкортостан, были выделены эндофитные штаммы *B. subtilis*, которые прошли отбор по признаку антагонизма к фитопатогенным грибам (Хайруллин и др., 2008). Поэтому представлялись актуальными анализ взаимоотношений бактерий-антагонистов с изолятами грибов рода *Fusarium* и оценка возможности использования перспективных штаммов как агентов биоконтроля фузариоза зерна. Установлено, что штаммы *B. subtilis* проявляли различную степень антагонизма к фузариевым грибам, а последние, в свою очередь, различались чувствительностью к продуцентам антибиотиков. Из 23 штаммов бактерий 3 (11PH, 49PH и 89PH) проявляли наивысшую антагонистическую активность против всех исследованных в работе видов грибов *Fusarium*. Вторую (среднюю по степени антагонизма) группу составили штаммы 121PH, 161PH, 162PH, 832PH, 11BM, 922PH. К штаммам с низкой активностью отнесены HT, HT2, M1, 871PH, 11B. Штамм *B. subtilis* 141PH оказался самым слабым антагонистом. Изучение морфологии грибов на границе зоны подавления роста показало, что бациллы способны подавлять прорастание конидий и угнетать рост мицелия. Выявлено, что один и тот же штамм *B. subtilis* действует на рост мицелия разных видов грибов неодинаково. Под влиянием метаболитов штамма 121PH у *F. sporotrichioides* наблюдались утолщения, искривления и разрушения мицелиальных нитей. У *F. avenaceum* (рис. 2) наблюдалось неполное разделение мицелия на короткие сегменты, а также его деградация.

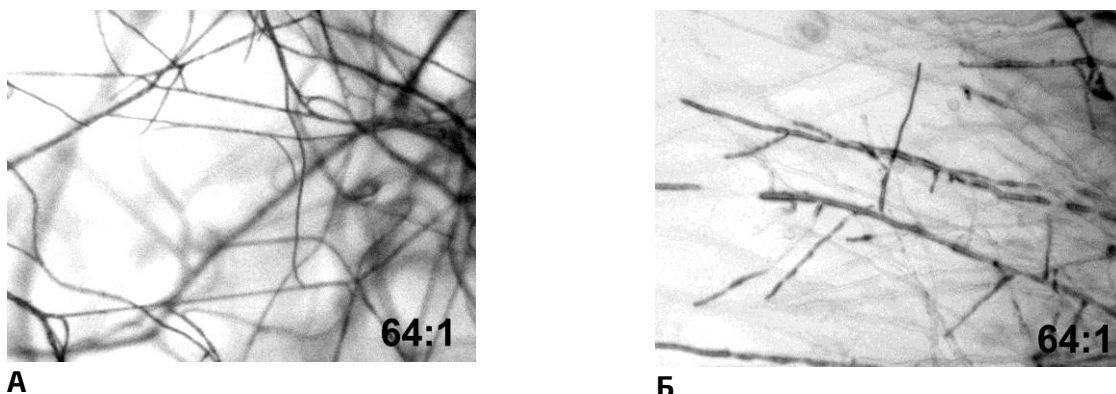


Рис. 2. Влияние антагонистических бактерий на развитие мицелия гриба *F. avenaceum*: А - контроль, Б - *F. avenaceum*+*B. subtilis* 121PH

У гриба *F. roae* было хорошо заметно истончение и сильное искривление нитей мицелия, а у *F. graminearum* на мицелии образовывались вздутия. Взаимодействие грибов со штаммом, проявляющим невысокую антагонистическую активность (*B. subtilis* 141PH) не приводили к каким-либо заметным изменениям в структуре мицелия даже вблизи бактериальных клеток.

В ходе исследований возникло предположение, что антибиотические метаболиты бацилл, как стресс-факторы, могут стимулировать образование конидий у фузарий. В связи с этим изучали действие клеток (методом агаровых блоков) штамма *B. subtilis* 89PH к основным видам фузариевых грибов, а также чистых антибиотиков итурин и сурфактин (Sigma, США, метод бумажных дисков), продуцируемых бактериями *Bacillus* на спорообразование *F. sporotrichioides* и *F. avenaceum*. В качестве «эталоны сравнения» оценивали действие «голодного агара» и непрерывного ультрафиолетового света (УФО). На 3-й день микроконидии наблюдали во всех вариантах опыта (табл. 3), единичные макроконидии – на среде с антибиотиками и под действием УФО. Действие клеток бацилл, сопоставимые с «эталоны сравнения» отчетливо проявилось на 5-й день, когда в указанных вариантах проявились типичные макроконидии. В случае с действием бактерий на развитие гриба *F. avenaceum* типичные макроконидии на 5-е сутки появились в вариантах с использованием УФО и живых клеток *B. subtilis* 89PH. Таким образом, метаболиты высокоантагонистичных штаммов *B. subtilis* способны не только подавлять рост мицелия фузариевых грибов, но и активизировать процесс образования макроконидий.

Таблица 3 – Скорость образования конидий грибом *F. sporotrichioides*

Дни	Контроль	Голодный агар	УФО	<i>B.subtilis</i> 89PH	Сурфактин	Итурин
1	Посев гриба					
2	Нет конидий					
3	МК*	МК	МК, единичные МАК	МК	МК, единичные МАК	
4	МК	МК, развитие МАК**	Типичные МК и МАК	МК, единичные МАК		
5	МК, единичные МАК	Типичные МК и МАК			МК, единичные МАК	

Примечание: * - микроконидии, ** - макроконидии.

Протекторный эффект эндофитных штаммов *B. subtilis* при действии фитотоксичных метаболитов грибов рода *Fusarium* на проростки пшеницы

Ранее исследованиями сотрудников лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ (Мубинов, 2007) было показано, что эндофитные штаммы *B. subtilis* могут проявлять на растениях антистрессовый эффект. В связи с этим мы изучали протекторный эффект эндофитов при действии на проростки пшеницы фитотоксичных метаболитов грибов рода *Fusarium* как стрессовых агентов. Метаболиты всех видов грибов обладали фитотоксичностью, которая проявлялась в торможении прорастания семян, ингибировании роста и развития проростков. Самым сильным ингибитором роста был изолят *F. sporotrichioides*, снижавший всхожесть семян на 35% по сравнению с контролем. Рост корней на неразведенном КФ снижался почти в 4 раза, а колеоптилей – в 2 раза по сравнению с контролем. Фитотоксины КФ *F. roae* в 4 раза ингибировали рост корней проростков, но не влияли на рост колеоптилей. Аналогично, КФ *F. graminearum* и *F. avenaceum* оказались более токсичными для корней и в меньшей степени для колеоптилей. При разбавлении КФ наблюдалось закономерное увеличение всхожести семян и размеров проростков, как и повышение эффективности протекторного действия бактерий, спорами которых предварительно обрабатывали семена. Так, например, при использовании штамма *B. subtilis* 11PH корни проростков, растущих на концентрированном КФ *F. avenaceum* были длиннее, чем у необработанных проростков на 16%, а колеоптилей – на 36%. Наилучшее фитопротекторное действие по отношению к метаболитам *F. roae* отмечено у штамма *B. subtilis* 26Д, под действием которого длина корней и колеоптилей при выращивании проростков на разбавленном КФ достигали значений у контрольных

семян, необработанных КФ и спорами бацилл. Несмотря на то, что *F. sporotrichioides* и *F. roae* являются представителями одной секции *Sporotrichiella*, первый вид оказался более токсичным для проростков пшеницы, чем второй. Это может быть связано с тем, что Т-2 токсин, синтезируемый *F. sporotrichioides*, является наиболее токсичным по отношению к растениям пшеницы по сравнению с токсинами, продуцируемыми *F. roae*.

Токсико-гигиеническая оценка штамма *B. subtilis* 11PH. При токсико-гигиенической оценке штамма изучались вирулентность, токсичность и токсигенность, способность к диссеминации в организме, дисбиотическое влияние, действие на иммунную систему, местное раздражающее действие. Установлено, что штамм *B. subtilis* 11PH относится к группе не вирулентных, не токсичных и не токсигенных. Оценка способности штамма к диссеминации в организме показала, что поведенческие реакции подопытных и контрольных животных существенно не различались, отмечалась лишь некоторая тенденция к снижению показателя норкового рефлекса в подопытной группе. Клеточный состав периферической крови также не имел достоверных колебаний. В сыворотке крови подопытной группы крыс выявлено возрастание ферментативной активности щелочной фосфатазы, что свидетельствует об активации детоксикационных процессов в гепатоцитах и может быть связано с усилением реакций метаболизма чужеродных белков и обеспечением гомеостаза. Диссеминация микроорганизма во внутренние органы не обнаружена. Установлено, что продолжительное введение культуры штамма не оказывает влияния на кишечную микрофлору. Количественный и качественный состав микробиоценоза, выделенного из кишечника животных, не имел существенных различий с фоновыми данными и микрофлорой контрольной группы. Выявлено, что штамм обладает слабым аллергенным действием. При этом не отмечается местный раздражающий эффект на слизистые оболочки глаз при контакте с клетками бактерий. Согласно заключения Уфимского НИИ МТиЭЧ Роспотребнадзора штамм является безопасным по основным параметрам, определяемым в такого рода исследованиях и может быть использован в качестве промышленного при соблюдении норм и правил санитарного законодательства.

Эффективность применения препарата на основе штамма *B. subtilis* 11PH для биоконтроля фузариоза зерна. В связи с высокой антагонистической активностью штамма *B. subtilis* 11PH к грибам рода *Fusarium*, на основании его токсико-гигиенической оценки, а также способности подавлять распространение вредоносного для пшеницы гриба *Tilletia caries* (DC.) Tul (Хайруллин и др., 2009) мы изучали возможность его использования в качестве действующей основы препарата для биоконтроля фузариоза зерна яровой пшеницы в условиях республики. Для этого семена с самой высокой степенью заражения фузариозом (17% в 2007 г и 28% в 2008 г) обрабатывали препаратом, содержащим споры штамма в концентрации 1 млрд. КОЕ/мл и высевали в трех разных природно-сельскохозяйственных зонах. При исходно одинаковой зараженности семян распространенность инфекции в зерне нового урожая и эффективность препарата зависели от зоны (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние препаратов на распространенность грибов рода *Fusarium* в зерне исследованных сортов пшеницы в 2008 г (%)

Зоны	Варианты			
	Контроль	Раксил	Бинорам (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	<i>B. subtilis</i> 11PH
Северная лесостепь	12	9	16	7
Южная лесостепь	14	11	8	7
Предуральская степь	10	5	12	7

В предуральской степи эффективнее было применение препарата раксил, в южной лесостепи – биопрепаратов, а в северной – нового препарата на основе штаммам *B. subtilis*

11PH.

В 2009 г опыты повторяли (табл. 5), включая обработку колоса после цветения пшеницы. Эффективность обработки семян и колоса была несущественно выше, чем только обработка семян. В предуральской степи применение биопрепарата не уступало фунгицидам по эффективности снижения фузариозной инфекции, а в северной лесостепи – на 40% превышало её.

Таблица 5 – Влияние препаратов на распространенность грибов рода *Fusarium* в зерне исследованных сортов пшеницы в 2009 г (%)

Зоны	Контроль (вода)		Препарат			
	семена	семена + колос	Террасил	Террасил + фоликур	<i>B. subtilis</i> 11PH	<i>B. subtilis</i> 11PH + <i>B. subtilis</i> 11PH
СЛ*	20	21	15	14	11	10
ПС	5	7	4	3	4	3

Примечание: * - северная лесостепь; ** - предуральская степь.

Урожайность зерна пшеницы на делянках, где семена были обработаны препаратом на основе штамма *B. subtilis* 11PH, была выше, чем на контрольных и, в среднем, практически одинакова, что и при обработке семян химическим эталоном (табл. 6). Таким образом, экспериментальный микробиологический препарат представляется перспективным для регистрационных испытаний с целью включения его в Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации.

Таблица 6 – Влияние обработки семян препаратами на урожайность пшеницы (г/м²)

Зона	Контроль	Раксил	<i>B. subtilis</i> 11PH
Башкирская-26, 2008 г			
Северная лесостепь	160±9	212±11	212±7
Южная лесостепь	155±10	155±12	213±8
Предуральская степь	165±13	170±10	182±12
Среднее значение	160	179	202
Казахстанская-10, 2008 г			
Северная лесостепь	161±11	220±7	200±7
Южная лесостепь	180±11	153±8	183±13
Предуральская степь	186±13	253±8	223±8
Среднее значение	176	209	202
Омская-36, 2009 г			
Северная лесостепь	215±14	275±13	285±8
Предуральская степь	300±11	311±6	320±9
Среднее значение	258	293	303

Влияние бактериального препарата на структуру фузариозного фитопатогенного комплекса в зерне пшеницы. Применение эндофитных штаммов бактерий, способных проникать внутрь тканей растений и подавлять в них развитие фитопатогенов вплоть до созревания зерна (Недорезков, 2003) как агентов биоконтроля может менять видовой состав грибов в зерне нового урожая. В связи с этим мы исследовали встречаемость разных видов грибов *Fusarium* в репродуцированных семенах (рис. 3). При обработке семян препаратом на основе *B. subtilis* 11H встречаемость грибов *F. poae* и *F. sporotrichioides*

увеличилась до 83%, химическим препаратом террасил – до 70%, тогда как в контроле соотношение этих двух видов с другими было 1:1. Аналогичная закономерность наблюдалась также и при двукратной обработке растений, первоначально протравливанием семян, а затем опрыскиванием колоса. Согласно данным польских исследователей (Plaskowska, Chrzanowska-Drozd, 2009), обработка семян твердой пшеницы фунгицидами также приводит к элиминации в зерне одних видов и повышает распространение других видов грибов, в том числе и рода *Fusarium*. Мы полагаем, что к такому результату могут привести, как изначальные различия в токсичности фунгицидов и метаболитов бактерий для разных видов грибов, так и особенности биологии последних, связанные со способами распространения, развития на поверхности колонизируемых тканей, а также высокой генетической гетерогенностью, формирующей устойчивость популяции к меняющимся условиям среды.

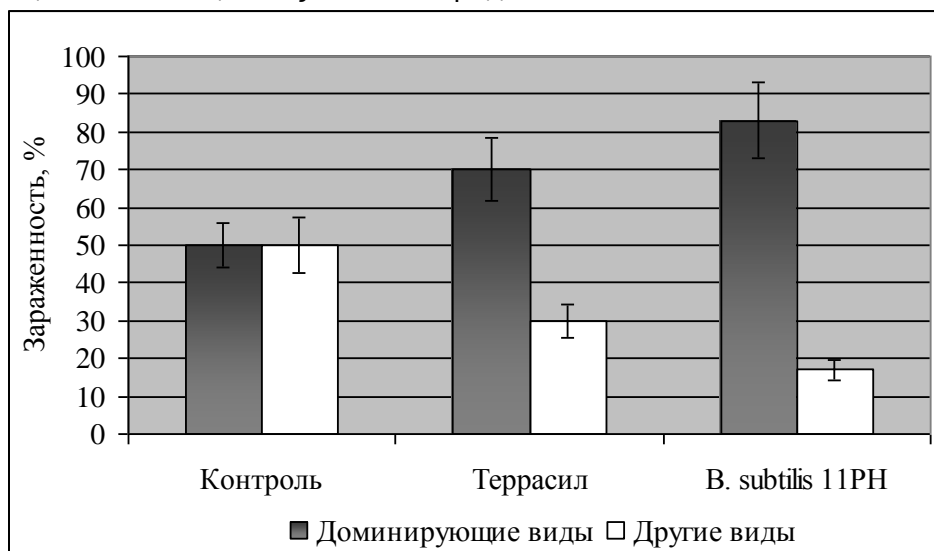


Рис. 3. Влияние обработки семян пшеницы сорта Омская 36 препаратами на встречаемость грибов рода *Fusarium* в зерне нового урожая. Серый фон – доминирующие виды; белый фон – другие виды.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено 11 видов грибов рода *Fusarium* в зерне яровой пшеницы, из которых по распространенности доминируют два: *F. sporotrichioides* и *F. roae*. 3 вида грибов - *F. acuminatum*, *F. tricinctum*, *F. equiseti* ранее не выявлялись в зерне яровой пшеницы на территории республики и описаны впервые. В исследованных зонах региона грибок *F. sporotrichioides* формирует генетически неоднородные популяции, в то время как вид *F. roae* формирует популяции, характерные для определенной зоны.

2. Установлено, что штаммы *B. subtilis* проявляют различную степень антагонистической активности по отношению к грибам рода *Fusarium*, а последние, в свою очередь, различаются чувствительностью к штаммам бактерий. Среди изученных штаммов *B. subtilis* выделено три (11PH, 49PH и 89PH), проявляющие наивысшую антагонистическую активность против всех исследованных видов грибов.

3. Показано, что бактерии *B. subtilis* высокоантагонистичны к фузариевым грибам, а также антибиотики итурин и сурфактин ускоряют *in vitro* на 1-2 дня образование макроконидий у *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides*.

4. Впервые обнаружено, что обработка зерна пшеницы эндофитными штаммами бактерий *B. subtilis* повышает всхожесть семян и снижает степень ингибирования роста проростков при действии на них фитотоксичных метаболитов грибов рода *Fusarium*.

5. Установлено, что штамм *B. subtilis* 11PH является не вирулентным, не токсичным и не токсигенным для животных, что позволяет его использовать в практических целях.

6. Обработка семян пшеницы препаратом спор штамма *B. subtilis* 11PH снижает, в среднем, на 42% распространение фузариозной инфекции зерна и на 18% повышает урожайность по сравнению с контролем (обработка семян водой), что не уступает по биологической эффективности применению фунгицидов раксил или террасил.

7. Установлено, что обработка семян яровой пшеницы микробиологическими препаратами на основе штамма *B. subtilis* 11PH или штаммов *P. fluorescens* (бинорам), также как и фунгицидами раксил и террасил меняет структуру популяции грибов рода *Fusarium* в зерне нового урожая, повышая степень распространенности и доминирование видов *F. sporotrichioides* и *F. poae*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кутлубердина Д.Р. Видовое разнообразие грибов рода *Fusarium* в южной лесостепи Республики Башкортостан в связи с вопросом производства экологически безопасной сельскохозяйственной продукции / Д.Р. Кутлубердина // Актуальные проблемы биологии и экологии: Материалы докладов XV Всероссийской молодежной научной конференции, 14 – 18 апреля, 2008. – Сыктывкар, 2008. – С. 152–153.

2. Кутлубердина Д.Р. Зараженность разных фракций зерна пшеницы грибами рода *Fusarium* и их видовой состав в южной лесостепи Республики Башкортостан / Д.Р. Кутлубердина, Р.М. Хайруллин // Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам: Материалы второй Всероссийской конференции, 29 сентября–2 октября, 2008. – С.-Пб. – 2008. – С. 61–62.

3. Кутлубердина Д.Р. Антагонистические взаимоотношения эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* с грибами рода *Fusarium* / Д.Р. Кутлубердина, А.А. Егоршина, Р.М. Хайруллин // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Материалы IV межрегиональной конференции молодых ученых, 14–16 октября, 2008. – Саратов. – 2008. – С.16.

4. Хайруллин Р.М. Распространенность грибов рода *Fusarium* в зерне яровой пшеницы в южной лесостепи Республики Башкортостан / Р.М. Хайруллин, Д.Р. Кутлубердина // **Вестник Оренбургского государственного университета**. – 2008. – №12. – С. 32–36.

5. Кутлубердина Д.Р. Видовой состав и зараженность разных фракций зерна пшеницы грибами рода *Fusarium* в южной лесостепи Республики Башкортостан / Д.Р. Кутлубердина, Р.М. Хайруллин // **Вестник Казанского государственного аграрного университета**. – 2009. – №1. – С. 24–29.

6. Кутлубердина Д.Р. Эндофитные штаммы *Bacillus subtilis* повышают устойчивость растений к токсинам *Fusarium avenaceum* / Д.Р. Кутлубердина, А.А. Егоршина, Р.М. Хайруллин // Симбиоз Россия 2009: Материалы II Всероссийского конгресса студентов и аспирантов-биологов с международным участием, 25–29 мая 2009 г. – Пермь, 2009. – С. 39–41.

7. Лукьянцев М.А. Оптимизация состава питательной среды для продукции фунгицидных и фунгистатических веществ эндофитным антагонистом *Bacillus subtilis* 49PH / М.А. Лукьянцев, А.А. Егоршина, Д.Р. Кутлубердина, Р.М. Хайруллин // Симбиоз Россия 2009: Материалы II Всероссийского конгресса студентов и аспирантов-биологов с международным участием, 25–29 мая 2009 г. – Пермь, 2009. – С. 39–41.

8. Кутлубердина Д.Р. Влияние предпосевной обработки семян яровой пшеницы эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* на численность и видовой состав фитопатогенных грибов рода *Fusarium* / Д.Р. Кутлубердина, Р.М. Хайруллин // Иммунопатология, аллергология, инфектология: Материалы Междисциплинарного микологического форума. М. – 2009. – №1. – С. 89–90.

9. Кутлубердина Д.Р. Изучение генетической структуры популяций фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, распространенных в регионе Южного Урала / Д.Р. Кутлубердина, Р.М. Хайруллин, Н.В. Мироненко // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, 1–2 декабря, 2009. – Киров, 2009. – С. 29–32.

10. Кутлубердина Д.Р. Сравнительная эффективность обработки семян и колоса биофунгицидом на основе эндофитного штамма *Bacillus subtilis* 11PH против фузариоза / Д.Р. Кутлубердина // Инновационные методы и подходы в изучении естественной и антропогенной динамики окружающей среды: Материалы Всероссийской научной школы для молодежи. Часть 3, 30 ноября – 5 декабря, 2009. – Киров, 2010. – С. 62–64.

11. Кутлубердина Д.Р. Токсическое влияние фильтрата культуральной жидкости грибов рода *Fusarium* на семена пшеницы / Д.Р. Кутлубердина, Р.М. Хайруллин // Иммунопатология, аллергология, инфектология: Материалы Междисциплинарного микологического форума. М. – 2010. – №1. – С. 56–57.

12. Кутлубердина Д.Р. Устойчивость растений к токсинам грибов рода *Fusarium*, распространенных на колосе яровой пшеницы в регионе Южного Урала, за счет эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // Проблемы и перспективы изучения естественных и антропогенных экосистем Урала и прилегающих регионов: Материалы Всероссийской конференции, 21–22 мая 2010г. – Стерлитамак, 2010. – С. 105–110.

13. Кутлубердина Д.Р. Испытание эндофитного штамма *Bacillus subtilis* 11PH против фузариоза колоса яровой пшеницы / Д.Р. Кутлубердина, Р.М. Хайруллин // **Теоретическая и прикладная экология**. – 2010. – №2. – С. 58–64.

Автор выражает искреннюю благодарность к.б.н., в.н.с. Н.П. Шпиловой (Всероссийский институт защиты растений, С.-Пб.-Пушкин) за неоценимую помощь в консультации по идентификации грибов рода *Fusarium*; д.б.н., проф. Н.В. Мироненко (Всероссийский институт защиты растений, С.-Пб.-Пушкин) – в проведении молекулярно-генетических исследований; к.б.н., зав. лаб. В.И. Сафроновой (Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, С.-Пб.-Пушкин) – за предоставленные штаммы грибов рода *Fusarium*.