

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА ХАРАКТЕР
ПРОРАСТАНИЯ КОНИДИЙ ГРИБА АЛЬТЕРНАРИЯ**

Аркадий НИКОЛАЕВ, Светлана НИКОЛАЕВА, Виктория ШУБИНА

Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы

**INFLUENȚA METABOLIȚILOR BACTERIENI ASUPRA CARACTERULUI DE GERMINARE
A CONIDIILOR CIUPERCII ALTERNARIA**

Culturile *B. subtilis* cu vârsta de trei zile inhibau germinarea conidiilor de *Alternaria* mai puternic decât culturile cu vârsta de două zile. În plus, față de inhibare efectul antifungal s-a manifestat în formarea umflăturilor veziculoase în locul hifelor germinative.

Cuvinte-cheie: *Bacillus subtilis, Alternaria, efect antifungal, germinarea conidiilor, umflături veziculoase.*

**EFFECT OF BACTERIAL METABOLITES ON THE CHARACTER OF GERMINATION CONIDIA OF
FUNGUS ALTERNARIA**

Three day liquid cultures of *B. subtilis* have inhibited germination of conidia stronger than 2-day ones. In addition to suppression of conidia germination the antifungal effect manifested also in formation of vesicular swellings instead of filamentous germs.

Keywords: *Bacillus subtilis, Alternaria, antifungal effect, conidia germination, vesicular swelling.*

Защита любой сельскохозяйственной культуры от вредителей и болезней предполагает комплекс мероприятий, включающих высокий уровень агротехники (севооборот, система обработки почвы, обеспеченность питательными веществами), устойчивые сорта, грамотное использование пестицидов химической или биологической природы.

В последние годы все больше внимания уделяется экологическому земледелию, получению экологически чистой продукции, хотя доля и того, и другого остается невысокой (в развитых странах не превышает 10%) [10]. Органическое земледелие активно развивается в странах ЕС, США, Японии, Китае. Продукция органического земледелия пользуется большим спросом.

В настоящее время в мире возрастает научный и практический интерес к разработке и производственному использованию защитных биопрепаратов как в качестве самостоятельных средств, так и в системах интегрированной защиты растений. В мировом производстве биологических средств защиты растений биопрепараты для контроля вредителей растений составляют 10%, для контроля возбудителей болезней – 4,6%, для контроля сорняков – 1,3%. Исследования биоагентов, биопрепаратов и разработка технологий их применения проводятся в США, странах ЕС и других развитых и развивающихся странах [8]. Выход на рынки США и Канады большого количества биопестицидов объясняется упрощенной системой их регистрации в этих странах.

Большое внимание уделяется биометоду в России, Беларуси, Украине. Этому способствуют правительственные решения Российской Федерации, возможность наработки биопрепаратов на заводах Беларуси, наличие мощных биологических лабораторий в Украине. Биологической защите растений посвящались международные научно-практические конференции в Краснодаре (2004, 2008, 2010 гг.), Киеве (Совещание ВПРС МОББ, 2009), Кишиневе (2010), Беларуси (2011), где были представлены материалы научных исследований ученых разных стран.

Основное количество биопестицидов производится на базе бактерий, в меньшей степени – на базе грибов и вирусов. Из бактерий основными продуцентами биопрепаратов являются споровые бактерии и псевдомонады, из грибов – грибы рода триходерма.

В США из биофунгицидов наиболее востребованы препараты на основе *Bacillus subtilis* и *B. pumilis*. По данным NASS, ретроспективной динамики и по другим косвенным показателям, *B. subtilis* обрабатывают почти 40% сладкого перца, более 20% томатов, около 10% баклажанов, 2% апельсиновых деревьев, 15% танжерин, 1,3% яблонь, 25% виноградников. *B. pumilis* широко используют для обработки кочанного салата и шпината, 5% яблонь и 2% персиков.

В настоящее время в России на рынке представлены около 20 активных агентов биопестицидов инсектицидного (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *B.th.* var. *tenebriosis*, *B.th.* var. *thuringiensis*) и фунгицидного (*Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* и бактерии р. *Pseudomonas*) действия.

На российском рынке преобладают препараты с фунгицидной активностью (почти 80%). Наиболее востребованными активными агентами являются бактериальные микроорганизмы [3].

В Молдове на базе псевдомонад зарегистрированы биопрепараты Ризоплан (планриз) и Паурин, а также препараты на базе грибов *Trichoderma lignorum* и *T. harzianum*.

Обычно заражение растений начинается с прорастания конидий, попавших на них. В связи с этим предотвращение прорастания конидий с помощью фунгицидов является одним из основных элементов технологии защиты растений. Поэтому обоснованный выбор фунгицидов следует начинать с оценки их действия на прорастание конидий. Это и составляло цель наших исследований.

Задачей исследований являлись:

- оценка фунгицидного действия споровых бактерий на конидии возбудителя альтернариоза томатов;
- характер их прорастания в различных концентрациях жидких культур;
- определение минимальных эффективных концентраций биопрепарата.

Материалы и методы исследования

В ходе исследований использовали четыре культуры бактерий *B. subtilis*, ингибирующих рост гриба *Альтернария* в опытах *in vitro* и отличающихся культурально-морфологическими признаками.

Культуры нарабатывали на оригинальной жидкой питательной среде в течение 2-3-х суток. Температура инкубации в течение суток колебалась в пределах 24-32⁰С.

Титр 3-суточных бактериальных культур колебался в пределах $(1,3-3,1) \times 10^{10}$ КОЕ/мл.

Конидии гриба *Альтернария*, полученные по методике AllenS.J. и др. [1], прорастивали в 2-х и 3-суточных культурах споровых бактерий в термостате (без подсветки) при 28⁰С. Использовали исходные культуры и их разведения 1:10; 1:20; 1:100. Для лучшей смачиваемости конидий разведения готовили на 0,01% растворе Твина 80.

Параллельно конидии *Альтернари* прорастивали в растворе химического препарата OxideWP, рекомендованного для защиты культуры томата от альтернариоза. В качестве исходной брали концентрацию, рекомендованную для производственного применения.

Контролем служили вода и питательная среда, на которых культивировали микроорганизмы. Питательную среду брали в тех же разведениях, что и культуральные жидкости.

Характер прорастания конидий учитывали через 2, 3, 4, 5 и 24 часа экспозиции.

Результаты и их обсуждение

В воде (контроль 2) уже через 2 часа экспозиции конидии начали прорасти нормальным ростом, через 3 часа проросло более 50% конидий, через 4 часа нормально проросли все конидии (табл.).

По сравнению с водой, питательная среда во всех использованных концентрациях стимулировала прорастание конидий.

Раствор химического эталона Oxide WP во всех концентрациях, включая исходную (рекомендованную для практического применения), через сутки экспозиции терял фунгицидное действие на конидии. В течение первых 5 часов экспозиции ни в одной из концентраций конидии не проросли.

В суспензиях 2-суточных бактериальных культур (исходная, 10%, 5%) всех исследуемых бактерий после 4-х часов экспозиции не наблюдалось нормального прорастания конидий, а в 1% концентрации культуры Я конидии вообще не проросли нормально (рис.1).

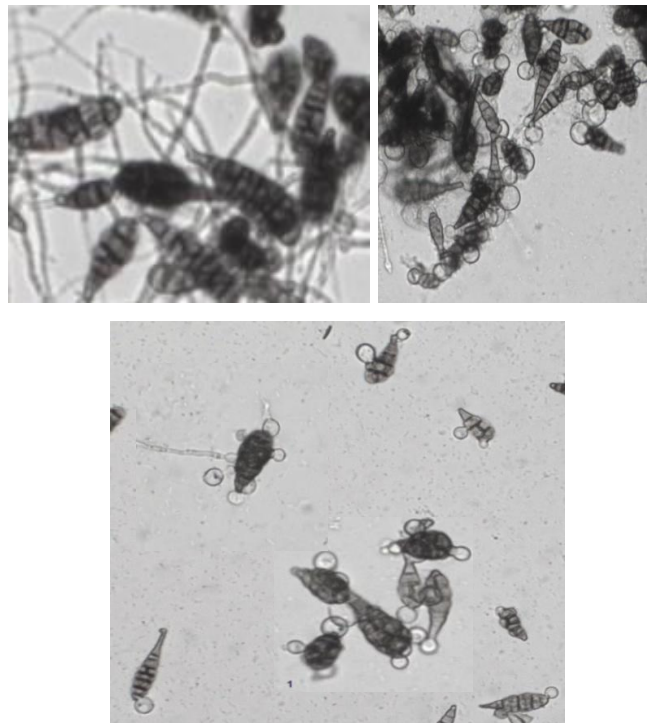


Рис.1. Действие антифунгальных метаболитов *B. Subtilis* на прорастание конидий возбудителя альтернариоза томатов. (А.Н. Николаев, В.Э. Шубина, С.И. Николаева, 2013 [9]) Слева сверху – контроль (вода), прорастание нормальным ростом; справа сверху – прорастание пузырьем в растворе метаболитов *B. subtilis*; внизу – более наглядный фрагмент прорастания пузырьями.

В культуре 10-98 наблюдалось прорастание нормальным ростком только единичных конидий, в культурах А и 2К отмечено только прорастание малыми пузырьками. Через 5 часов экспозиции в 1% концентрациях у трех культур (2К, 10-98, Я) отмечено прорастание нормальным ростком или большим пузырьком единичных конидий. Такая же картина сохранялась и через 24 часа экспозиции, когда прорастание малым или большим пузырьком отмечено и для концентраций 5%,10%.

В исходной концентрации прорастания конидий не отмечено ни у одной из исследуемых культур. Фунгицидное действие трехсуточных культур бактерий более выражено, чем у 2-суточных, что хорошо отражено в таблице.

Таблица

Характер прорастания конидий *Альтернрии* в культуральной жидкости культур *Bacillus subtilis*

Культура бактерий	Концентрация жидкой культуры	Возраст бактериальной культуры и время экспозиции в часах									
		2-суточная					3-суточная				
		2	3	4	5	24	2	3	4	5	24
А	исходная	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1%	-	-	-МП	-МП	-МП	-	-	-МП	-МП	-МП
2К	исходная	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-БП	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-БП	-БП	-	-	-	-	-
	1%	-	-	-МП	+ -БП	+ -БП	-	-	-МП	-БП	-БП
10-98	исходная	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-МП	-	-	-	-	-МП
	1%	-	-	+ -	+ -БП	+ -БП	-	-	-БП	-БП	-БП
Я	исходная	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-МП	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-МП	-МП	-	-	-	-	-БП
	1%	-	-	-	+ -БП	+ -БП	-	-	-МП	-БП	-БП
Oxide WP	исходная	-	-	-	-	++					
	10%	-	-	-	-	++					
	5%	-	-	-	-	++					
	1%	-	-	-	-	+++					
Контроль1 (пит. среда)	исходная	++	++	++	++	++++					
	10%	++	++	++	++	++++					
	5%	++	++	++	++	++++					
	1%	++	++	++	++	++++					
Контроль2 (вода)	-	+ -	+	++	++	+++					

Условные обозначения:

- — прорастания конидий нет;
- МП — прорастание конидий малым пузырьком;
- БП — прорастание конидий большим пузырьком;
- + - — прорастание нормальным ростком единичных конидий;
- + -БП — прорастание нормальным ростком или большими пузырьками единичных конидий;
- +
- ++ — более 50% конидий проросло нормальным ростком;
- ++ — все конидии проросли нормальным ростком;
- +++ — все конидии проросли нормальным ростком, проростки длинные;
- +++ — обильный воздушный мицелий.

Формирование пузыревидных вздутий вместо гифовых ростков под влиянием метаболитов *B. subtilis* имеет место при прорастании конидий не только у *Альтернариум*, но и у других грибов.

Так, On-Uma Ruangwong и др. [5] отмечали такое явление у *Colletotrichum gloeosporioides* (рис.2)., Коломиец Э.И. и др. [7] – у *Penicillium expansum* и *Botrytis cinerea*, Ivan Petatan-Sagahon и др. [2] – для *Stenocarpella maydis* (рис.3).

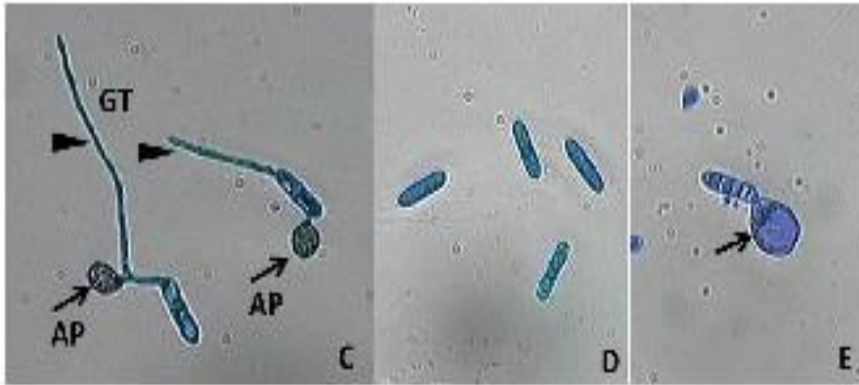


Рис.2. Действие антибиотических веществ *B. Subtilis* на конидии *C. gloeosporioides*.
(по On-Uma Ruangwong и др. [5])

с – нормальное прорастание, d – непроросшие конидии, е – шаровидное видоизменение ростковой трубочки под влиянием антифунгальных метаболитов.

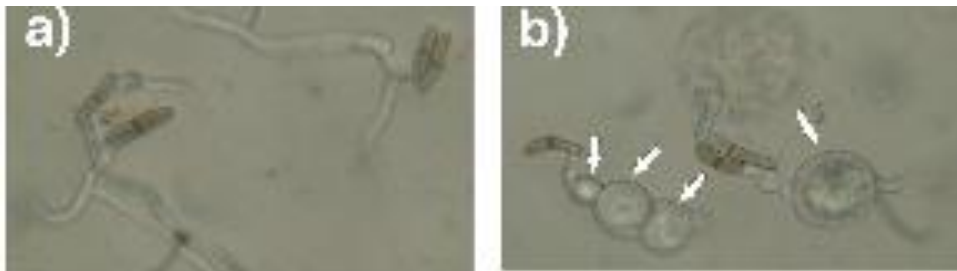


Рис.3. Влияние термостабильного фильтрата *Bacillus subtilis* 160 на прорастание конидий *Stenocarpella maydis*.
(по Ivan Petatan-Sagahon и др. [2])

а) нормальное прорастание конидий, в) прорастание под влиянием метаболитов *Bacillus*.
Стрелками показано образование пузыревидных вздутий, напоминающих хламидоспоры

Mara Favilla и др. [4] сообщают об аналогичных нарушениях у *Aspergillus* под воздействием биофунгицида фузапирона. Jošić Dragana и др. [3] наблюдали этот феномен у *Alternaria tenuissima* под воздействием антибиотических веществ *Pseudomonas* (рис.4).

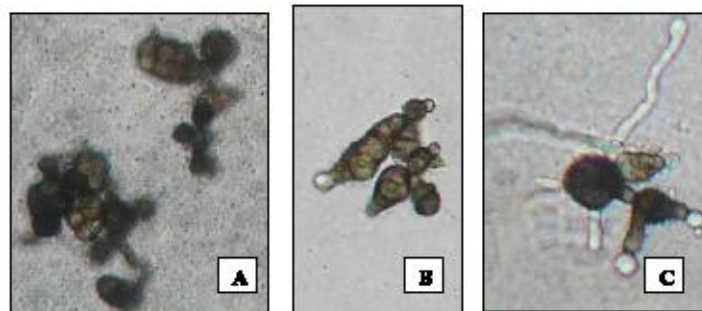


Рис.4. Влияние фунгицида DACOFLO 0,2% (A) и изолятов *Pseudomonas* Q16 (B) и B25 (C) в концентрации 10^5 на прорастание конидий *A. tenuissima*
(по Dragana Jošić и др. [3])

Это указывает на наличие специфического механизма действия антибиотических веществ *B. subtilis* и некоторых других бактерий на характер роста ростковых гиф. Это, по-видимому, должно отразиться на способности ростковых гиф проникать в клетки растений хозяев и вызывать их заражение.

Выводы

Исследованные нами жидкие культуры *B. subtilis* 2-х и 3-суточного возраста обнаруживают высокое фунгицидное действие на конидии возбудителя альтернариоза томатов, которое сохранялось в той или иной мере и в 1% разведении.

Трехсуточные культуры более активны, чем 2-суточные. Большая фунгицидная активность обнаружена у 3-суточных культур А и 2К, которая сохранялась при 5% концентрациях в течение всего периода наблюдений (24 часа).

В зависимости от концентрации жидкой культуры и от штамма бактерий наблюдалась задержка прорастания конидий от 3 до 24 часов.

Под влиянием антифунгальных метаболитов исследованные культуры *B. subtilis* кроме задержки прорастания конидий вызывали и изменения характера их прорастания: вместо нормального роста гиф образуются пузыри.

Библиография:

1. ALLEN, S.J., BROWN, J.F., KOCHMAN, J.K. Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. In: *Plant disease*, 1983, v.67, p.665-668.
2. IVAN PETATAN-SAGAHON и др. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. In: *Molecular Sciences*, 2011, v.12, p.5522-5537.
3. JOŠIĆ DRAGANA, KATARINA PROTOLIPAC, MIRA STAROVIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, SNEŽANA PAVLOVIĆ, MILADINOVIĆ, M. AND SVETLANA RADOVIĆ. Phenazines producing *Pseudomonas* isolates decrease *Alternaria tenuissima* growth, pathogenicity and disease incidence on cardoon. In: *Arch. Biol. Sci, Belgrade*, 2012, 64(4), p.1495-1503.
4. MARA FAVILLA, MICHELANGELO PASCALE, ALESSANDRA RICELLI, ANTONIO EVIDENTE, CARMINE AMALFITANO AND CLAUDIO ALTOMARE. Inhibition of Species of the *Aspergillus* Section *Nigri* and Ochratoxin A Production in Grapes by Fusapyrone. In: *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 2008, v.74, no.7, p.2248-2253.
5. ON-UMA RUANGWONG, CHI-L CHANG, SENGHOR AMADOU LAMINE AND WEN-JINN LIANG. Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. In: *African Journal of Microbiology Research*, 30 April, 2012, vol. 6(16), p.3732-3736.
6. БИЗИЮКОВА, О.В. Обзор мирового рынка микробиопрепаратов. В: *Защита и карантин растений*, 2012, №3, с.9-12.
7. КОЛОМИЕЦ, Э.И., КИЛЬЧЕВСКАЯ, О.В., КУПЦОВ, В.Н., РОМАНОВСКАЯ, Т.В., СВИРИДОВ А.В. Научные и практические основы создания биопрепарата для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили. В: *Информационный бюллетень ВПРС МОББ*. С.-Петербург, 2007, №38, с.145-147.
8. МОНАСТЫРСКИЙ, О.А. Современные направления в создании и практическом применении защитных биопрепаратов и биотехнологий в растениеводстве. В: *Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем*. Вып.6. Краснодар, 2010, с.335-342.
9. НИКОЛАЕВ, А.Н., ШУБИНА, В.Э., НИКОЛАЕВА, С.И. Действие *Bacillus subtilis* на прорастание конидий возбудителя альтернариоза томатов. В: *Защита растений в современных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур*: Материалы международной научно-практической конференции (п. Краснообск, 24-6 июля 2013 г.). Новосибирск, 2013, с.256-259.
10. ФОКИН, А.В. Биологическая защита растений – процесс циклический. В: *Защита и карантин растений*, 2010, №3, с.25.

Prezentat la 19.09.2013