

ВПЛИВ *METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS* ІМБГ290 НА СПОРОУТВОРЕННЯ *FUSARIUM OXYSPORUM* SCHLTDL. У РОСЛИНАХ СОРТІВ ПШЕНИЦІ

А.А. Благініна¹, А.І. Парфенюк¹, В.В. Круть²

¹ Інститут агроекології і природокористування НААН

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Наведено результати досліджень з ефективності колонізації рослин-регенерантів сортів пшениці озимої бактерією *M. radiotolerans* ІМБГ290. Встановлено диференційовану особливість колонізації рослин різних сортів пшениці озимої за штучного інокулювання бактерією та їх впливи на формування КУО ендofітної бактерії. Доведено, що наявність метилобактерії в рослинах пшениці озимої, уражених грибом *F. oxysporum*, спричиняє зниження інтенсивності його спорування. Встановлено властивість бактерії зберігатися за взаємодії з *F. gibozum*. Проведені дослідження дають змогу краще зрозуміти механізми взаємодії сортів рослин з фітопатогенними грибами і характеризувати сорт як екологічний чинник, що запобігає біозабрудненню агрофітоценозів.

Ключові слова: рослини сортів пшениці *in vitro*, *Methylobacterium radiotolerans* ІМБГ290, *Fusarium oxysporum* Schltdl.

Серед ендofітних мікроорганізмів виділено групу бактерій, які утворюють стабільні асоціації з рослинами і можуть сприяти стійкості рослин до шкідливої дії важких металів і радіонуклідів, до інфекційних хвороб, а також здатні покращувати ріст і розвиток рослин. З літературних джерел відомо, що *Bacillus licheniformis* характеризується високою антигрибковою та стимулятивною активністю щодо рослин рису, капусти, кукурудзи, бобових, а її культуральна рідина значно пригнічує ріст фітопатогенних грибів, таких як *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* Pers, *Gibberella zeae*, *Dothiorella gregaria* і *Colletotrichum gossypii in vitro* (Huili Wang, 2009).

Для вивчення значення мікрофлори в житті рослин основну увагу приділяють ґрунтовим, ризосферним та епіфітним мікроорганізмам, останнім часом і ендofітам, які є симбіонтами рослин.

Найпоширенішими шкодочинними в Україні є хвороби культурних рослин, спричинені фітопатогенними грибами некротрофного типу живлення (Тарр, 1975). Серед них особливо шкодочинними є види роду *Fusarium*, які характеризуються широ-

кою спеціалізацією і здатні уражувати сорти як зернових, так і овочевих культур.

Тканини рослин, у т.ч. й культивовані в асептичних умовах, заселені ендofітними асоційованими бактеріями (Rosenblueth, 2006). Вони утворюють стабільні асоціації з рослинами (Козировська, 2001) і можуть брати участь у їх захисних реакціях проти ураження фітопатогенними мікроорганізмами, комахами та нематодами, а також допомагати пристосовуватися до несприятливих умов довкілля (Siciliano, 2001), до шкідливої дії катіонів важких металів та радіонуклідів (Сорочинський, 1998). Крім того, асоційовані бактерії здатні покращувати ріст і розвиток рослин (Verma, 2001; Caballero-Mellado, 2004), що знижує ймовірність ураження їх грибами некротрофного типу живлення. Структура асоціації ендofітних бактерій з культурними рослинами залежить від виду і сорту рослин (Park, 2005). Вони є ефективними антагоністами патогенних мікроміцетів як на пшениці, так і на інших культурних рослинах (Coombs, 2004; Parmeela and Johri, 2004). Такий антагонізм зумовлено продукуванням бактеріями антибіотиків, сидерофорів, а також конкурентністю мікроорганізмів.

Метою досліджень було вивчення впливу бактерії *M. radiotolerans* на інтенсивність пропагулоутворення грибів роду *Fusarium* в рослинах сортів пшениці озимої.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проросле насіння сортів пшениці озимої селекції Миронівського інституту пшениці: Миронівська 808, Миронівська 61, Ремеслівна, Мирхад, Крижинка інокулювали суспензією штаму бактерії *M. radiotolerans* ІМБГ290, наданого Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України. Бактерію культивували в рідкому поживному гліцерин-пептонному середовищі (King, 1954) за відомою методикою (Ковальчук, 2006).

Для інокулювання використовували бактеріальну суспензію у концентрації 10 млн спор на 1 мл води. Інокулювали проросле насіння шляхом замочування його в суспензії впродовж 5 хв в умовах асептики. Після цього зразки почергово стерилізували у розчинах 70%-го етилового спирту та комерційного препарату Білизна з подальшим триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді. З відмитого пророслого насіння відділяли проростки і висаджували їх на модифіковане агаризоване безгормональне середовище Мурашіге і Скуга (Murashige and Skoog, 1969). Експланти культивували впродовж 18 год при 24°C та освітленості 4000 люкс для регенерації рослин.

Для визначення ефективності колонізації інокульовані рослини-регенеранти розтирали у ступці. Отриману суміш розводили стерильною водою та висівали на повноцінне поживне агарове середовище за відомою методикою (Kovalchuk, 2004). Бактерії культивували на мінеральному агаровому середовищі з метанолом (Романовская, 1996) упродовж 1–5 діб при 28°C. Визначали кількість рослин, з яких виділяли бактеріальні колонії *M. radiotolerans* ІМБГ290 та їх кількість на 1 г сирової маси рослин-регенерантів.

Для визначення впливу бактерії *M. radiotolerans* ІМБГ290 на інтенсивність спороношення фітопатогенного гриба *F. oxysporum* — збудника фузаріозу рослин пшениці — колонізовані бактерією рослини-регенеранти різних сортів пшениці озимої інокулювали суспензією конідій гриба *F. oxysporum* у концентрації 1×10^6 шт./мл. Ступінь ураження рослин патогеном визначали за відомою методикою (Трибель, 2010). З уражених рослин гриб ізолювали в чисту культуру і культивували на картопляно-глюкозному агарі. Інтенсивність спороутворення гриба визначали шляхом підрахунку конідій у камері Гареева – Тома (Билай, 1982).

Результати досліджень свідчать, що колонізація рослин сортів пшениці озимої бактеріальним штамом *M. radiotolerans* ІМБГ290 відбувається з різною ефективністю. За даними мікробіологічного тестування інокульованих рослин-регенерантів виявлено, що кількість рослин з *M. radiotolerans* ІМБГ290 відрізнялась за сортами. Найменша кількість рослин, колонізованих бактерією, спостерігалась у сортах Ремеслівна та Миронівська 808, що становило 43 та 28% відповідно (табл. 1). Найбільшу кількість рослин, колонізованих бактерією, вічмічено у сорті Мирхад — 74%.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами аналізу встановлено, що інтенсивність колонізації рослин-регенерантів сорту Миронівська 808 була найслабшою — $2,4 \times 10^4$ бактеріальних клітин на 1 г сирової рослинної маси. Дещо сильніше були колонізовані рослини-регенеранти сорту Крижинка, кількість бактеріальних клітин становила $2,76 \times 10^6$ на 1 г сирової маси. Поряд із тим у сортів Мирхад та Ремеслівна цей показник був істотно вищим — $4,88 \times 10^7$ та $4,1 \times 10^7$ клітин на 1 г сирової рослинної маси відповідно.

Було відмічено і колонізацію різних органів рослин-регенерантів, а саме: листків, стебел і коренів. Ендofітні метилобактерії відомі як супресори патогенних грибів (Phillips, 2000). Тому сорти рослин, сприйнятливі до колонізації метилобактерією, здатні контролювати чисельність фітопатогенних грибів. Так, інтенсивність споро-

Таблиця 1

Інтенсивність колонізації рослин-регенерантів сортів пшениці озимої бактерією *M. radiotolerans* ІМБГ290

Сорт, назва	Кількість рослин-регенерантів, колонізованих бактерією, %	Кількість бактеріальних клітин в 1 г сирової рослинної маси
Миронівська 808	28	$2,40 \times 10^4$
Миронівська 61	68	$4,80 \times 10^4$
Ремеслівна	43	$4,10 \times 10^7$
Мирхад	74	$4,88 \times 10^7$
Крижинка	53	$2,76 \times 10^6$

Таблиця 2

Вплив бактерії *M. radiotolerans* ІМБГ290 на ріст і розвиток *F. oxysporum* на рослинах пшениці озимої сорту Крижинка*

Назва варіанта	Кількість стійких рослин, %	Кількість конідій <i>F. oxysporum</i> , млн шт./мл
Рослини, інокульовані суспензією конідій <i>F. oxysporum</i> без <i>M. radiotolerans</i>	22	$1,89 \pm 0,06$
Рослини, інокульовані <i>F. oxysporum</i> + <i>M. radiotolerans</i>	82	$0,93 \pm 0,03$

Таблиця 3

Вплив бактерії *M. radiotolerans* ІМБГ290 на ріст і розвиток *F. gibozum* на рослинах пшениці озимої сорту Крижинка*

Назва варіанта	Інтенсивність розвитку міцелію, бал	Кількість конідій шт./мл
Рослини, інокульовані суспензією конідій <i>F. gibozum</i> (контроль)	2,4	$2,8 \times 10^5 \pm 0,16$
Рослини, інокульовані <i>F. gibozum</i> + <i>M. radiotolerans</i>	2,0	$0,91 \times 10^5 \pm 0,19$

Примітка (до табл. 2, 3): P = 0,05.

утворення гриба *F. oxysporum* на колонізованих метилованою бактерією рослинах пшениці озимої сорту Крижинка була вдвічі нижчою, а кількість стійких до гриба рослин – вдвічі вищою, ніж на контролі (табл. 2).

Отримані результати досліджень було підтверджено під час вивчення взаємодії гриба *F. gibozum* з бактерією *M. radiotolerans* на рослинах пшениці озимої сорту Крижинка (табл. 3).

Отже, міцелій культури гриба *F. gibozum*, виділений у чисту культуру із колонізованих бактерією *M. radiotolerans* рослин пшениці озимої сорту Крижинка, також

розвивався з меншою інтенсивністю, а кількість його конідій була більше ніж удвічі нижчою від контролю.

ВИСНОВКИ

За результатами досліджень встановлено, що рослини сортів пшениці озимої характеризуються різним ступенем сприйнятливості до колонізації ендofітною бактерією *M. radiotolerans*. Найкращими для створення асоціацій з бактерією є рослини пшениці озимої сорту Мирхад, менш сприйнятливі до колонізації – рослини сортів Миронівська 808 та Миронівська 61.