

БІОЛОГІЧНИЙ ЗАХИСТ ЯЧМЕНЮ ВІД ГЕЛЬМІНТОСПОРІОЗУ

Наведено результати дослідження ефективності штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404, який розглядається як перспективний агент біоконтролю за використання його проти звичайної (гельмінтоспориозної) кореневої гнилі та темно-бурої плямистості листків ячменю. Встановлено, що даний штам проявляє як прямий антагоністичний вплив на грибні фітопатогени, так і опосередкований, через індукцію захисних реакцій рослини.

ячмінь, *Bipolaris sorokiniana*, *Bacillus amyloliquefaciens*, біологічний захист

Останніми роками все більша увага приділяється застосуванню біологічних препаратів для захисту сільськогосподарських культур від хвороб. Це продиктовано необхідністю відновлення екологічної рівноваги в агроценозах, яка протягом тривалого часу порушувалась інтенсивним застосуванням хімічних засобів, що призвело до збіднення ґрунтових екосистем, накопичення токсинотворюючих штамів мікроміцетів, і, як наслідок, до підвищення ураженості рослин раніше не актуальними хворобами. Серед таких хвороб особливе місце займають гельмінтоспориози, збудниками яких є гриби роду *Bipolaris* (син. *Helminthosporium*, *Drechslera*). Зокрема, гриб *Bipolaris sorokiniana* (сумчаста стадія *Cochliobolus sativus*) спричиняє темно-буру листову плямистість, звичайну кореневу гниль та «чорний зародок» ячменю, уражуючи, відповідно, листки, корені та насіння цієї культури.

Поширення гельмінтоспориозів ячменю в Україні досягло катастрофічних масштабів, що, за деякими даними, становить 75,2% [6].

Захист ячменю від гельмінтоспориозів здійснюється за допомогою хімічних пестицидів. В той же час ячмінь цінується як дієтичний продукт, а його зерно містить мінімальну кількість жиру та добре збалансований за амінокислотним складом білок. У ньому багато амінокислоти лізину з високою антивірусною активністю.

Л.О. КРЮЧКОВА,

доктор біологічних наук,
E-mail: k_larysa@ukr.net

С.В. ЛАПА,

кандидат біологічних наук,
E-mail: slapa@ukr.net
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України,
м. Київ

Стінки клітин ендосперму багаті на *b*-глюкани, що позитивно впливають на рівень холестерину у крові. Ячмінь містить легку форму крохмалю — мальтозу, яка легко засвоюється організмом. З огляду на вищесказане, застосування біологічних препаратів для захисту ячменю від хвороб є надзвичайно актуальним.

Нині на світовому ринку найчисленнішою є група біофунгіцидів, основою яких є антагоністичні штами бактерій роду *Bacillus*, кількість яких складає до 30 найменувань [10]. В Україні науковцями Інституту мікробіології і вірусології НАН України (ІМВ НАНУ) створено мікробіологічний препарат Фітоспорин [7], який уже протягом кількох десятиліть широко використовується для захисту рослин від грибних і бактеріальних хвороб. Проведеним нами первинним скринінгом штамів бацил із колекції відділу антибіотиків ІМВ НАНУ було виявлено ще один штам *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404, який за своєю антифунгальною дією не поступається, а в деяких випадках навіть перевищує активність штаму *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7100, що є основним інгредієнтом біопрепарату Фітоспорин. Даний штам проявив високу технічну ефективність проти церкоспорельозу та фузаріозної кореневої гнилі пшениці [14].

Метою даної роботи було дослідити ефективність застосування штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 для захисту ячменю від звичайної (гельмінтоспориозної) кореневої гнилі та темно-бурої плямистості листків.

Методики досліджень. В роботі використовували біопрепарат Фітодоктор (основним інгредієнтом якого є штам *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100), штам *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 та мікроміцети *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Fusarium poae*, *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*), *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*), *Fusarium oxysporum*, *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*), *Botrytis cinerea* (*Botryotinia cinerea*), *Oculimacula yallundae*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia cerealis* (*Ceratobasidium cereale*), *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus* sp.) з робочої колекції відділу антибіотиків ІМВ НАН України.

Антагоністичну активність штамів бацил щодо фітопатогенних мікроміцетів визначали за методом відстроченого антагонізму, запропонованого Гарре 1887 р. [3]. Штам-антагоніст висівали у центр чашки Петрі на тверде поживне середовище — картопляний агар (КА) та інкубували протягом 24 годин при температурі 28°C. Потім по краю чашки підсвали тест-культуру, поміщали в термостат при температурі, оптимальній для росту мікроміцетів (24°C). Як показник чутливості використовували індекс пригнічення (*I*, %), який визначали за формулою:

$$I = (P_k - P_{acc}) / P_k * 100,$$

де P_k — радіус колонії гриба в контролі, P_{acc} — радіус колонії гриба в сумісній культурі з штамом бактерії-антагоніста.

Штамами з підвищеною антагоністичною активністю вважалися ті, під дією яких пригнічення становило понад третину (> 30%) порівняно з контрольним варіантом (без впливу бактерії-антагоніста) [13].

Для обробки насіння та листків ячменю біопрепаратом (спори та вегетативні клітини) штами бацил вирощували методом глибинного культивування в колбах ємністю 750 мл на качалці (200 об./хв) при температурі +37°C протягом 18—24 год на рідкому поживному

синтетичному середовищі наступного складу: 10% розчин глюкози — 150 мл; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 47,5 мл; KH_2PO_4 — 96,0 мл; MgSO_4 — 1,8 мл; Na цитрат — 12,9 мл; вода — 691,8 мл. Бактеріальні клітини відбирали шляхом центрифугування при 8000—9000 об./хв, осад промивали стерильною водогінною водою та готували суспензію з титром 10^9 КУО (колонієутворюючих одиниць) в 1 мл, безпосередньо перед обробкою.

Ефективність штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 проти звичайної кореневої гнилі ячменю досліджували шляхом передпосівної обробки насіння суспензією клітин (титр 10^9 КУО/мл). Зараження збудником хвороби та обліки розвитку звичайної кореневої гнилі проводили згідно з методикою Ownley et al. [11], модифікованою нами з врахуванням особливостей патогена [5].

Ефективність застосування досліджуваних штамів проти темно-бурої плямистості листків ячменю визначали на штучному інфекційному фоні, створеному відповідно до методу, описаного De Vleeschauwer et al., 2010 [8]. Наносили препарат на листки шляхом обприскування суспензією клітин (титр 10^9 КУО/мл) або центрифугатом культуральної рідини. Обприскування проводили з профілактичною (за 5 діб до зараження патогеном) та лікувальною (після зараження патогеном) метою. Опосередковану дію метаболітів на збудника темно-бурої плямистості листків через індукцію захисних реакцій досліджували за внесення культуральної рідини в субстрат (пісок), в якому вирощували рослини. При цьому активні субстанції потрапляли на корені, тому пригнічення розвитку листової плямистості свідчило про активацію імунітету рослини, а не про безпосередню дію на збудника.

Обліки хвороби проводили на 7-му добу після зараження за такою шкалою:

- 0 — рослина здорова;
- 1 — поодинокі плями діаметром до 1 мм займають до 2% листової поверхні;
- 2 — плями діаметром 1—3 мм займають до 10% поверхні листка;
- 3 — плями діаметром 1—3 мм займають понад 25% поверхні листка;
- 4 — близько половини поверхні листка займають веретеноподібні плями діаметром понад 3 мм з не-

кротичним центром і червоно-бурою облямівкою;

5 — понад 75% поверхні листка займають веретеноподібні плями, що зливаються.

Результати досліджень. Нами виявлено високу антагоністичну дію штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 щодо широкого спектра фітопатогенних грибів. Одним з найбільш чутливих виявився фітопатоген *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (табл. 1, фото), при цьому індекс пригнічення становив 55,7%. Крім того, саме цей гриб виявився найбільш вразливим серед проаналізованих нами мікроміцетів щодо впливу інших штамів бактерій роду *Bacillus* [1], отже, застосування проти нього біологічних препаратів, створених на основі бацил, є досить перспективним.

Дослідження штамів бацил в лабораторних умовах у чашках Петрі методом відстроченого антагонізму дало нам можливість відібрати найбільш перспективні штами для біологічного контролю. Проте, ймовірність передбачення поведінки організмів у польових умовах за таким тестом дуже низька. Мікроорганізми, які культивуються в лабораторних умовах, знаходяться при цьому у не властивих для них умовах існування, тому їх активність може змінюватися. У зв'язку з цим, наступним етапом наших досліджень стало культивування їх в умовах, наближених до природних. Такі умови, в яких біотичний чинник зазвичай працює, забезпечуються у вегетаційному досліді, де функцію тест-організму виконує рослина, заражена фітопатогеном, проти якого

1. Антагоністична активність *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 щодо фітопатогенних мікроміцетів

Гриб	Індекс пригнічення, %
<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	33,3
<i>Fusarium poae</i>	38,3
<i>Gibberella fujikuroi</i> (<i>Fusarium moniliforme</i>)	37,3
<i>Nectria haematococca</i> (<i>Fusarium solani</i>)	21,7
<i>Fusarium oxysporum</i>	31,7
<i>Cochliobolus sativus</i> (<i>Bipolaris sorokiniana</i>)	55,7
<i>Botrytis cinerea</i> (<i>Botryotinia cinerea</i>)	60,0
<i>Oculimacula yallundae</i>	56,7
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	52,0
<i>Rhizoctonia cerealis</i> (<i>Ceratobasidium cereale</i>)	47,3
<i>Rhizoctonia solani</i> (<i>Thanatephorus</i> sp.)	45,7

і проводиться пошук біологічного засобу захисту.

Відомо, що основним недоліком біологічних препаратів, створених на основі бактерій, є їх нестабільна ефективність, яка змінюється з року в рік, від поля до поля, від культури до культури. Це вимагає додаткової інформації про механізми їх антипатогенної дії у складній системі рослина — патоген — антагоніст. В природних субстратах мікроорганізми існують як складні асоціації, всередині яких складаються різноманітні взаємодії. Вони мають широкий діапазон: від «мирного співіснування» до явного антагонізму, але в усіх випадках патогени



Фото. Пригнічення розвитку *B. sorokiniana* штамом *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum plantarum* IMB B-7404 (праворуч — контроль)

потрапляють під антагоністичний вплив інших організмів, з якими вони безпосередньо або опосередковано контактують. Розрізняють такі механізми біологічного контролю, як конкуренція, індукція стійкості, синтез антибіотиків, літичних ензимів та інших токсичних метаболітів, тощо. У біологічних засобів захисту зазвичай діє лише один із механізмів, специфічний до певного фітопатогена. В природних умовах, навпаки, активно діють більшість механізмів біологічного захисту (контролю). Тому найефективнішими є біотичні чинники, які використовують не один, а кілька механізмів антагонізму. Деякі дослідники навіть вдаються до створення генетично-модифікованих штамів, які б поєднували в собі різні механізми супресивної дії [12]. Тому метою наших подальших досліджень було з'ясування механізмів антипатогенної дії штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404, який розглядається нами як перспективний агент біоконтролю.

В результаті передпосівної обробки насіння ячменю суспензією клітин бактерій *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 відмічено суттєве зниження розвитку звичайної (гельмінтоспориозної) кореневої гнилі порівняно з контролем (без обробки) та з еталоном (штам *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100) (табл. 2). В наших попередніх дослідженнях уже було показано високу ефективність даного штаму проти корневих гнилей пшениці [14]. Ці дані також підтверджують висновок про вищу біологічну ефективність штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 порівняно з еталоном — *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100.

Для захисту ячменю від ураження темно-бурою плямистістю проведено обприскування рослин суспензією клітин у фазу двох листків з профілактичною (до зараження патогеном) та лікувальною метою (після зараження патогеном). Однак, за візуальних обліків зниження розвитку хвороби не виявили (даних не наведено) або воно було несуттєвим (табл. 3), що, очевидно, пояснюється невисокою здатністю бактерій роду *Bacillus* колонізувати листову поверхню ячменю. Дані з переважної більшості літературних джерел свідчать, що природним середовищем існування бактерій цього роду є ґрунт [4], чим зумовлена їх ефективність проти корневих

2. Ефективність *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 проти звичайної кореневої гнилі ячменю

Варіант	Розвиток хвороби, бал (0—4)	Технічна ефективність, %
Штам <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B-7100 (еталон)	0,86	47,2
Штам <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum</i> IMB B-7404	0,67	58,9
Контроль	1,63	—
НІР ₀₅	0,6	—

гнилей. Проте деякі автори повідомляють про ізоляцію штамів бацил з листків та колоса рослин [2, 9]. Очевидно, питання виживання бацил на наземних органах рослин потребує подальшого вивчення.

При обприскуванні рослин ячменю під час вегетації культуральною рідиною (за 3—5 діб до зараження *B. sorokiniana*) та при внесенні її у субстрат (з розрахунку 10 мл/100 г піску) зафіксовано ефективну дію штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 проти темно-бурої плямистості, що проявлялося у зниженні розвитку хвороби (табл. 3, 4).

3. Ефективність *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 проти темно-бурої плямистості листків ячменю залежно від типу інокулюму (профілактичне обприскування)

Тип інокулюму	Розвиток хвороби, бал (0—5)	Технічна ефективність, %
Суспензія клітин (титр 1×10^8 КУО/мл)	2,8	17,6
Культуральна рідина	2,1	25,0
Контроль	3,4	0
НІР ₀₅	0,7	—

4. Ефективність метаболітів штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 проти темно-бурої плямистості листків ячменю за різних способів застосування (профілактична обробка)

Спосіб застосування	Розвиток хвороби, бал (0—5)	Технічна ефективність, %
Дослід 1		
Внесення в субстрат	1,48	49,0
Контроль	2,9	—
НІР ₀₅	0,54	—
Дослід 2		
Обприскування листків	0,5	67,3
Внесення в субстрат	0,22	85,6
Контроль	1,53	—
НІР ₀₅	0,65	—

Очевидно, це відбувалося завдяки дії комплексу метаболітів штаму на рослину, що спричиняло активацію захисних реакцій і стимулювало її імунну систему.

ВИСНОВКИ

Дослідженнями встановлено, що захисна дія штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 включає як прямий антагоністичний вплив на фітопатогенні мікроміцети, так і опосередкований, через індукцію захисних реакцій рослин, що супроводжується підвищенням їх стійкості проти фітопатогенів. Індукцію захисних реакцій в рослинах можна ініціювати як через кореневу систему шляхом внесення метаболітів штаму (культуральної рідини) у субстрат (пісок), так і через листову поверхню шляхом обприскування.

Обприскування листків рослин під час вегетації суспензією клітин штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 виявилось неефективним проти темно-бурої плямистості ячменю, що, ймовірно, пов'язано з тим, що філосфера не є їх природним середовищем існування.

Після передпосівної обробки насіння ячменю суспензією клітин штаму *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7404 фіксували зниження розвитку корневих гнилей, що свідчить про успішну колонізацію штамом ризосфери рослин та збереження ним антагоністичної активності щодо ґрунтових фітопатогенів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антагоністична активність бактерій роду *Bacillus* щодо фітопатогенних мікроміцетів / Л.О. Крючкова, І.В. Драгозов, С.В. Лапа, Л.В. Авдеева // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. Т. 4. — К.: Логос, 2012. — С. 368—371.
2. Башта О.В. Мікобіота колосу озимої пшениці в Лісостепу України, її антибіотичні та токсигенні властивості: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 06.01.11 «Фітопатологія» / О.В. Башта. — К., 2010. — 24 с.
3. Ваксман З.А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества / З.А. Ваксман. — Москва: ГИИЛ, 1947. — 392 с.

4. *Жизнь растений*. — В. 6-ти томах. Т.1. Введение. Бактерии и актиномицеты / Под ред. Н.А. Красильникова, А.А. Уранова. — М.: Просвещение, 1976. — 487 с.

5. *Крючкова Л.О.* Патогенність ізолятів *Bipolaris sorokiniana* (Sacc) Shoemaker — збудника звичайної кореневої гнилі пшениці та стійкість сортів до хвороби / Л.О. Крючкова, Г.Ф. Дударева // *Захист і карантин рослин*. — 2001. — Вип. 47. — С. 31—39.

6. *Михайленко С.В.* Хвороби листя ярого ячменю в Поліссі України та заходи по обмеженню їх шкідливості : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец. 06.01.11 «Фітопатологія» / С.В. Михайленко. — К., 2005. — 19 с.

7. Пат. 2099947 Российская Федерация, 6 А01N63/00. Биопрепарат Фитоспорин для защиты растений от болезней / В.В. Смирнов, И.Б. Сорокулова, Т.Г. Бережницкая и др.; Заявитель и патентообладатель Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины (UA) и Научно-производственное объединение «Башкирское» (RU); заяв. 11.11.1996, опубл. 27.12.97, Бюл. № 36. — С. 1—20.

8. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling / D. De Vleeschauwer, Y. Yang, C.V. Cruz, M. Hцfte // *Plant Physiology*. — 2010. — 152. — P. 2036—2052.

9. Antimicrobial activity of cultural filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves / S. Yoshida, S. Hiradate, T. Tsukamoto et al. // *Phytopathology*. — 2001. — 91. — P. 181—187.

10. *Kabaluk T.* Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries / T. Kabaluk, K. Gazdik. — Agriculture and Agri-Food Canada, 2005. — 242 p.

11. *Ownley B.H.* Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2—79 / B.H. Ownley, D.M. Weller, L.S. Thomas // *Phytopathology*. — 1992. — 82. — P. 178—184.

12. *Pal K.K.* Biological control of plant pathogens / K.K. Pal, B. McSpadden Gardener // *The Plant Health Instructor*. — Online: <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Documents/PHI-BiologicalControl.pdf>

13. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85 / J.L. Milner, L. Silo-Suh, J.C. Lee, et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1996. — 62. — P. 3061—3065.

14. Suppression of wheat diseases by new *Bacillus* strains / L. Kriuchkova, I. Dragovoz, D. Zhukova, S. Lapa, L. Avdeeva // Информационный бюллетень ВІРС МОББ: материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений — проблемы и перспективы» (Кишинев, 30—31 октября 2012 года). — Кишинев, 2012. — С. 296—298.

**Крючкова Л.А.,
Лапа С.В.**

**Биологическая защита ячменя
от гельминтоспориоза**

Приведены результаты исследований эффективности штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404, кото-

рый рассматривается как перспективный агент биоконтроля при использовании его против обычной (гельминтоспориозной) корневой гнили и темно-бурой пятнистости листьев ячменя. Установлено, что данный штамм проявляет как прямое антагонистическое действие на грибные фитопатогены, так и опосредованное, через индукцию защитных реакций растений.

ячмень, *Bipolaris sorokiniana*, *Bacillus amyloliquefaciens*, биологическая защита

**Kriuchkova L.O.,
Lapa S.V.**

**Biological protection of barley from
helminthosporiose**

Results of research on efficacy of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain IMV B-7404 as perspective biocontrol agent against common root rot and brown leaf spot of barley are presented. It was established that this strain reveals as direct antagonistic influence on fungal plant pathogens as well as indirect one, through induction resistance.

barley, *Bipolaris sorokiniana*, *Bacillus amyloliquefaciens*, biological control

Рецензент:

Литвинчук О.О.,
кандидат біологічних наук
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН

УДК 632.51

© О.М. Курдюкова, 2015

НЕРІВНОКВІТНИК ПОКРІВЕЛЬНИЙ — ЯК ЙОГО ПОЗБУТИСЯ В ПОСІВАХ?

Установлено особливості поширення та рясності нерівноквітника покрівельного в посівах пшениці озимої, біологію росту й розвитку та шкідливість у степових зонах України. Запропоновано шляхи його контролю в системі допосівного обробітку ґрунту та застосування грамініцидів Паллас 45 OD, Пума Супер, Аксіал 045 EC та Овсяген Експрес.

пшениця озима, нерівноквітник покрівельний, шкідливість, гербіциди

У степових зонах України потепління клімату, що спостерігається в останні два десятиліття, супроводжується суттєвою зміною структури й будови агрофітоценозів, перш за все пшениці озимої. У її бур'янових угрупованнях інтенсивно зростає

О.М. КУРДЮКОВА,
кандидат біологічних наук
E-mail: asfodelina@ro.ru
Інститут захисту рослин НААН,
м. Київ

присутність і рясність посухостійких теплолюбних злакових бур'янів, зокрема — нерівноквітника покрівельного (*Anisantha tectorum* (L.) Nevski), егілопсу циліндричного (*Aegilops cylindrica* Host), ячменів мишачого (*Hordeum murinum* L.) та заячого (*H. leporinum* Link), мортука пшеничного (*Eremopyrum triticeum* (P. Gaertn.), бромусів польового (*Bromus arvensis* L.) й житнього (*B. Secalinus* L.) тощо [3].

Особливо загрозливих масштабів впродовж останніх 3—5-ти років в посівах озимих зернових культур, багаторічних трав, у садах та виноградниках набуває поява зимуючого посухостійкого ефемерного бур'яна нерівноквітника покрівельного (*Anisantha tectorum* (L.) Nevski). Синоніми бромус покрівельний (*Bromus tectorum* L.), анізанта покрівельна (*Zerna tectorum* (L.) Lindm.) [2, 3, 6]. За високого рівня присутності в агрофітоценозах втрачають врожаю від цього виду можуть перевищувати 80% і більше [2].

Тому обмеження поширення та контроль присутності його в посівах — найважливіший шлях до поліпшення фітосанітарного стану агрофітоценозів та підвищення врожайності культурних рослин.