

УДК 579.64

К.О. Чугунова

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМУ *Pseudomonas fluorescens* 2303 ЩОДО ФІТОПАТОГЕНІВ

In this paper, we study the antagonism of *Pseudomonas fluorescens* 2303 strain on pathogenic bacteria's and fungi's. This strain inhibited the development of *P.syringae* pv. *syringae* 8511, *P.syringae* pv. *atrofaciens* 9400, *Xantomonas campestris* 8003b, *Clavibacter michiganensis* 102 – stunting zones were 20–40 mm. Strain *P.fluorescens* 2303, unlike the product haupsyn, inhibited the growth of pathogenic bacteria such as *Pectobacterium carotovorum* 8982 and 8626 *Agrobacterium tumefaciens*. *P.fluorescens* 2303 strain was highly active against phytopathogenic fungi and was on average two times more active than the strain of plant protection product – gaupsin. In particular, the inhibition index of root rots caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 10Z is 9,4 times higher than the corresponding value for gaupsin. The research into *P.fluorescens* 2303 strain is promising for its applying in agriculture for comprehensive plants protection of plants against pathogenic fungi and bacteria, as well as for developing a product based on this strain.

Вступ

Біопрепарати для захисту рослин на основі мікроорганізмів порівняно з хімічними засобами мають такі переваги: нешкідливість для людини і тварин, відсутність фітотоксичності, мутагенної та онкогенної активності, широкий спектр дії на різні фітопатогени, просту технологію виробництва та відносно невисоку вартість [1, 2].

Важливою умовою успішного біологічного контролю фітопатогенів є здатність бактерій продукувати стимулятори росту рослин (фітогормони), покращувати засвоєння фосфору рослинами, фіксувати атмосферний азот, індукувати резистентність рослин до фітопатогенів. Крім прямої стимуляції росту за рахунок синтезу корисних для рослин метаболітів, ризосферні бактерії синтезують сполуки, що сприяють захисту рослин від хвороб – антибіотики, сидерофори та гідролітичні екзоферменти. Синтез перерахованих вище речовин притаманний ризосферним мікроорганізмам родів *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, які успішно використовуються при розробленні препаратів для біологічного контролю хвороб рослин [1–3]. На основі цих мікроорганізмів створено препарати проти різних видів корневих гнилей: триходермін (*Trichoderma lignorum*), планріз (*Pseudomonas fluorescens*), фітоспорин (*Bacillus subtilis*) [4, 5]. Також широко застосовуються біопрепарати на основі псевдомонад: BlightBan, BioSave, Blue-Circle, Intercept, Victus, Агат-25 та Псевдобактерін [1–3].

У той самий час препарати на основі мікроорганізмів часто характеризуються дією тільки на певну окрему групу фітопатогенів – збуд-

ників грибних, вірусних чи бактеріальних захворювань, а також шкідників. Тому пошук штамів-антагоністів, активних проти представників не тільки різних родів фітопатогенних бактерій, але й грибів, та створення на їх основі біопрепаратів для захисту рослин залишається важливим завданням сектору сільськогосподарської біотехнології.

Постановка задачі

В Україні найбільш поширеними є чотири типи корневих гнилей: фузаріозна коренева гниль (збудники – *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Fusarium poae*), офіобульозна коренева гниль (збудник – *Gaeumannomyces graminis*), звичайна або гелмінтоспоріозна коренева гниль (збудник – *Bipolaris sorokiniana*), ризоктоніозна прикоренева гниль (збудник – *Rhizoctonia cerealis*). Щорічні втрати зерна через ураження корневими гнилями досягають 10–20 %, а при інтенсифікації виробництва і збільшенні продуктивності рослин втрати можуть становити близько 50 %.

Аналіз біологічних препаратів засвідчив широке застосування біопрепаратів на основі псевдомонад, що викликано комплексною дією проти фітопатогенних агентів різних родів. Проте більшість препаратів мають вузьконаправлену дію на окрему групу фітопатогенів – збудників фунгальних чи бактеріальних захворювань. Пошук штамів-антагоністів, активних проти представників різних таксономічних груп, та створення на їх основі біопрепаратів для захисту рослин залишається важливим завданням сектору сільськогосподарської біотехнології.

Метою роботи було дослідження антагоністичної активності штаму *Pseudomonas fluorescens* 2303 щодо різних видів фітопатогенних мікроорганізмів.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження був штам *Pseudomonas fluorescens* 2303 з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України, на базі якого проводилася ця робота. Антагоністичну активність щодо фітопатогенних бактерій визначали методом перпендикулярних штрихів. Вирощування штама-антагоніста проводили на агаризованому картопляному середовищі в чашках Петрі у термостаті ($t = 28 \pm 1$ °C, $\tau = 72$ год). Використовували тест-штами з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України: *P.syringae* pv. *syringae* 8511, *P.syringae* pv. *atrofaciens* 9400, *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Xanthomonas campestris* 8003₆, *Clavibacter michiganensis* 10₂, *Rhizobium vitis* 8626.

Дослідження антагоністичної активності щодо фітопатогенних грибів проводили у чашках Петрі на картопляно-глюкозному агарі, використовуючи такі тест-штами грибів з колекції відділу антибіотиків ІМВ НАН України: *Fusarium graminearum* 08G, *Bipolaris sorokiniana* 10Z, *Fusarium solani* 11Z, *Pythium sylvaticum* 11Z, *Fusarium poae* 09G, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 10Z. Обробку результатів проводили розраховуючи індекс пригнічення росту тест-штамів грибів відповідно до методики, наведеної у праці [6].

Для порівняння антагоністичної активності досліджуваного штаму *P.fluorescens* 2303 використовували штам *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111, що входить до складу препарату гаупсин [7]. Наведені середні

значення в таблицях є достовірними при $p < 0,05$.

Результати і їх обговорення

За спектром антагоністичної активності штам *P.fluorescence* 2303 виявився високоактивним відносно деяких фітопатогенних бактерій і грибів. У дослідах з фітопатогенними бактеріями (табл. 1) штам *P.fluorescence* 2303, на відміну від штамів препарату гаупсин, пригнічував розвиток *Pectobacterium carotovorum* 8982 та *Agrobacterium tumefaciens* 8626. Найбільш чутливими до штаму *P.fluorescence* 2303 були штами *Xanthomonas campestris* 8003₆ та *Clavibacter michiganensis* 10₂, зони затримки росту яких у 2,5–3 рази перевищували аналогічні показники для гаупсину. На *P.syringae* pv. *syringae* 8511 і *P.syringae* pv. *atrofaciens* 9400 штам *P.fluorescence* 2303 чинив бактеріостатичну дію.

Відомо, що активними продуцентами сполук антифунгальної природи вважаються штами зі значенням індексу пригнічення не менше 25 % [6]. За результатами досліду з фітопатогенними грибами (табл. 2), штам *P.fluorescence* 2303 виявився в середньому вдвічі активнішим за штами препарату гаупсин.

Зокрема, найбільший індекс пригнічення відзначався відносно збудника офіобольозної кореневої гнилі *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 10Z (індекс пригнічення у 9,4 рази перевищував відповідне значення для гаупсину).

У наших дослідженнях було встановлено, що антагоністична активність штаму *P.fluorescence* 2303, крім іншого, зумовлювалась біосинтезом феназин-1-карбонової кислоти, яка продукується різними представниками роду *Pseudomonas* [8]. Сполуки феназинового ряду не тільки відіграють важливу роль у функціонуванні псевдомонад, але й впливають на конку-

Таблиця 1. Антагоністична активність штамів *Pseudomonas* щодо фітопатогенних бактерій

Тест-штами	Штами-антагоністи	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2303	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> УКМ В-111 (контроль)
Зони затримки росту, мм		
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8511	22	9
<i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	20	8
<i>Pectobacterium carotovorum</i> 8982	18	0
<i>Xanthomonas campestris</i> 8003 ₆	39	14
<i>Clavibacter michiganensis</i> 10 ₂	33	16
<i>Rhizobium vitis</i> 8626	23	0

Таблиця 2. Антифунгальна активність штамів *Pseudomonas* щодо фітопатогенів

Тест-штами	Штами-антагоністи	
	<i>Pseudomonas fluorescence</i> 2303	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> УКМ В-111 (контроль)
	Індекс пригнічення, %	
<i>Fusarium graminearum</i> 08G	43,8	33,2
<i>F.solani</i> 11Z	48,7	32,1
<i>F.poaе</i> 09G	43,1	8,5
<i>Pythium sylvaticum</i> 11Z	49,5	25,5
<i>Bipolaris sorokiniana</i> 10Z	39,1	28,1
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> 10Z	51,8	5,5

рентоздатність бактерій-продуцентів у ґрунтах, пригнічуючи розвиток ряду фітопатогенів [1, 8]. Тому штам-продуценти феназинів широко використовуються для біоконтролю хвороб сільськогосподарських культур.

Зазначимо, що біопрепарати на основі псевдомонад, такі як псевдобактерин, бінорам, планріз, Єлена, перш за все, характеризуються антагоністичною активністю відносно фітопатогенних грибів [4, 5, 9, 10]. Проте відомо, що фітопатогенні бактерії спричиняють не меншу шкоду, ніж гриби. В наших дослідках штам *P.fluorescence* 2303 виявився активним як відносно фітопатогенних грибів, так і відносно фітопатогенних бактерій. Це дає можливість розглядати цей продуцент як основу для створення біопрепарату для захисту рослин від захворювань різної етіології.

Висновки

Штам *Pseudomonas fluorescens* 2303 характеризувався високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних бактерій. На штам *P.syringae* pv. *syringae* 8511 і *P.syringae* pv. *atrofaciens* 9400 досліджуваний штам чинив бактеріостатичну дію, на інші тест-штами бактерій – бактерицидну.

Найбільший індекс пригнічення відзначався відносно збудника офіобольозної кореневої гнилі *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 10Z і

становив 51,8%. Штам *P.fluorescence* 2303 виявився в середньому вдвічі активнішим за штам *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111, що входить до складу препарату гаупсин.

Штам *P.fluorescens* 2303 є перспективним для застосування у сільському господарстві для комплексного захисту рослин від фітопатогенних грибів та бактерій, а також для розроблення препарату на основі цього штаму.

Подальші дослідження метаболічних профілів штаму *P.fluorescens* 2303 дадуть змогу виявити синтез інших біологічно активних речовин, притаманних роду *Pseudomonas* – ростових регуляторів рослин, пігментів, сидерофорів. Виявлення синтезу цих речовин, у свою чергу, дасть можливість відповісти на питання, чи належить штам *P.fluorescens* 2303 до PGPR бактерій – корисної групи ґрунтових мікроорганізмів, що стимулюють ріст та розвиток рослин.

Висловлюємо ширю подяку старшому науковому співробітнику відділу антибіотиків, доктору біологічних наук Л.О. Крючкової та старшому науковому співробітнику відділу фітопатогенних бактерій, доктору біологічних наук Л.А. Пасічник Інституту мікробіології і вірусології НАН України за надані для досліджень штам *Pseudomonas fluorescens* 2303 та консультації під час оформлення статті.

1. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // Агро XXI. – 2000. – № 3. – С. 3–5.
2. Выделение и фенотипическая характеристика рост-стимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов / Л.В. Кравченко, Н.М. Макарова, Т.С. Азарова, Т.А. Проворов, И.А. Тихонович // Микробиол. журн. – 2002. – 71, № 4. – С. 521–525.
3. Сидоренко О.Д. Действие ризосферных псевдомонад на урожайность сельскохозяйственных культур // Агрохимия. – 2001. – № 8. – С. 56–62.

4. Патент 2203945 РФ, МПК C12N1/20, A01N63/00C12N1/20, C12R1:38. Штамм бактерій *Pseudomonas aureofaciens* для отримання препарату проти захворювань пшениці, викликаних грибовими фітопатогенами / Логинов О.Н., Свешникова Е.В., Силищев Н.Н., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. Заяв. і влад. патента Ін-т біології Уфим. научн. центра РАН, № 2001123209/13; заявл. 17.08.2001; опубл. 10.05.2003.
5. Патент 2213774 РФ, МПК C12N1/20C12N1/20, C12R1:40. Штамм бактерій *Pseudomonas putida* для отримання препарату проти захворювань пшениці, викликаних грибовими фітопатогенами / Логинов О.Н., Свешникова Е.В., Силищев Н.Н., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Исаев Р.Ф. Заяв. і влад. патента Ін-т біології Уфим. научн. центра РАН, № 2002107619/13; заявл. 25.03.2002; опубл. 25.03.2002.
6. B.H. Ownley, D.M. Weller, "Influence in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* by *P.fluorescens* 2-79", *Phytopathology*, vol. 82, no. 2, pp. 178–184. 1992.
7. Патент 73682 Україна. Інсектофунгіцидний препарат гаупсин для боротьби із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / Кіпріанова О.А., Гораль С.В. – Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
8. Смирнов В.В., Кіпріанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – К.: Наук. думка, 1990. – С. 84–111.
9. Русакова М.Ю., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. та ін. Антифузаріозна активність екзометаболітів деяких штамів роду *Pseudomonas* // *Мікробіол. і біотехн.* – 2012. – № 2. – С. 89–95.
10. Патент 1805849 РФ. Биологический фунгицид для борьбы против возбудителей грибковых и бактериальных болезней псевдобактерин 2 / РАН. – Опубл. 17.03.1999.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
29 квітня 2013 року