

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА БОРЬБЫ С МУЧНИСТО-РОСЯНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ

А.Н. НИКОЛАЕВ, С.И. НИКОЛАЕВА

Институт защиты растений и экологического земледелия Академии наук Молдовы

Au fost izolate și testate bacteriile sporifere pentru aprecierea eficienței antibiotice împotriva *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrosporium solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium*. A fost propusă metodologia pentru testarea antagoniștilor bacterieni împotriva făinării pe sistem-mostră «orz-*Blumeria graminis f.s. hordei*». S-a stabilit că migloacele microbiene pot manifesta o eficacitate biologică adecvată fungicidelor chimice.

Eficacitatea biologică depinde în mare măsură de gradul prelucrării uniforme a suprafeței frunzelor cu substanța activă microbiologică.

The spore-forming bacteria are isolated and evaluated on their antibiotic activity against *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrosporium solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium*. The methodological approach for the examination of bacterial antagonism against powdery mildew on «barley-*Blumeria graminis f. s. hordei*» modeling system is offered. It is established, that microbiological means can show biological efficiency comparable with one of the chemical fungicide. On the efficiency of the bacterial antagonists the strong influence renders a degree and leaves covering uniformity by the liquid bacterial spray.

Применение микробиологических средств для борьбы с болезнями растений всегда было привлекательной альтернативой химическому методу. Особенно актуально это в настоящее время, когда повысились требования к экологии.

Среди многих продуцентов микробиологических препаратов, споровые бактерии, по нашему мнению, являются наиболее предпочтительными, так как споры позволяют бактериям лучше сохраняться в различных неблагоприятных условиях среды, которые могут иметь место после применения обработок. Одним из этапов разработки микробиологического метода защиты растений является отбор активных продуцентов и предварительная оценка их активности. Для возбудителей болезней, которых можно культивировать на искусственных питательных средах, применимы методы общей микробиологии. Они позволяют относительно легко предварительно оценить реакцию довольно большого числа бактериальных культур к фитопатогемам-факультативным паразитам.

В случае облигатных фитопатогенов задача усложняется, так как появляется необходимость в постоянном наличии живых растений, в проведении их искусственных заражений облигатным фитопатогеном и обработке тестируемыми культурами бактерий. Следовательно, значительно увеличивается объем работы, требуются дополнительные помещения для культивирования растений, необходимы также эффективные методы искусственного заражения растений. К тому же должны быть созданы условия питания, освещения и прохождения инкубационного периода развития болезни. Всё это приводит к существенному увеличению трудоёмкости работы.

Из сказанного следует, что выбор модели «растение-патоген» приобретает большое значение. Такая модель должна быть простой, удобной для работы в любое время года в обычных условиях лаборатории. Растения должны быть легко культивируемыми, не требовательными к большим объемам почвы и условиям освещенности. Инкубационный период развития болезни должен быть максимально коротким. С учетом вышесказанного мы остановились на системе «мучнистая роса-ячмень». Данная система позволяет практически круглый год поддерживать патоген и проводить опыты прямо на лабораторном столе в легкоконтролируемых условиях. Однако в ходе работы потребовались специальные опыты для отработки ряда деталей, необходимых для тестирования бактериальных культур.

На первом этапе проводился отбор активных культур бактерий на плотных средах с применением методов общей микробиологии с использованием факультативных паразитов. Отобранные активные культуры в дальнейшем тестировали на активность против одного из облигатных паразитов – возбудителей мучнистой росы. При этом мы отдавали себе отчет в том, что не все отобранные на этом этапе антагонисты окажутся активными против мучнисто-росяных грибов, и будет отбраковано много культур, не обладающих антигрибной активностью.

Мучнистая роса выбрана из тех соображений, что это заболевание поражает широкий круг важнейших сельскохозяйственных культур, как однолетних, так и многолетних. Эта группа болезней важна и в экономическом плане и требует проведения в течение сезона многократных обработок, что повышает риск нанесения вреда здоровью людей, животных и экологии.

Следовательно, данная работа носит не только методологический, но и прикладной характер.

Для выделения споровых бактерий применялся модифицированный метод Н. Крига, 1983 [1].

В качестве субстратов использовали цветки многолетних растений, почву подстилок древесных растений и другое.

Всего было протестировано 22 культуры споровых бактерий, в том числе из образца почвы из-под сосны была выделена одна культура; из образца почвы из-под елей – 4; из сухой травы (дернина) – 2; из цветков миндаля – 2; из цветков абрикоса – 1; из цветочных розеток яблони, пораженных мучнистой росой, – 5. В качестве тест-грибов использованы *Sclerotinia sclerotiorum* и *Rhizoctonia solani* (рис.1), а также 3 штамма *Fusarium* (из озимой пшеницы, томатов и гороха), *Macrosporium solani*, *Botrytis cinerea*.

Антибиотическая активность антагонистов проверялась как при выращивании их на плотной среде, так и в жидкой культуре. В последнем случае источником антибиотика была культуральная жидкость (КЖ) культур разного срока культивирования, которую вносили в металлические цилиндрики (рис.2).

В сводной таблице (таблица 1) показаны наиболее активные культуры против каждого тест-патогена (по трем наибольшим зонам в порядке убывания величины зоны).



Рис.1. Пример фунгицидного действия бактериальной культуры, активной против *Sclerotinia sclerotiorum* и *Rhizoctonia solani*.



Рис. 2. Пример, иллюстрирующий действие культуральных жидкостей споровых бактерий на рост *Sclerotinia sclerotiorum* (чашки № 44 и 48) и *Rhizoctonia solani* (чашка № 46).

Анализ таблицы № 1 показывает, что:

- нет культур, одинаково хорошо подавляющих все тест-патогены;
- нет патогенов, одинаково чувствительных ко всем протестированным культурам бактерий;
- на ранних стадиях роста более активными могли быть одни культуры, а на более поздних стадиях – другие. Например, против фузариума гороха на ранних стадиях была активной культура 1-1, а на более поздней стадии она не вошла в число дающих наибольшие зоны угнетения роста;
- некоторые культуры, оставаясь активными на ранних и поздних стадиях, меняют свою относительную активность в зависимости от стадии роста (продолжительности взаимодействия). Например, против фузариума гороха на 4-е сутки роста культура 1-1 была самой активной, а на 7-е сутки более активной стала культура 2-1.

Апробирование пригодности модели «ячмень-мучнистая роса» для проверки активности отобранных культур споровых бактерий против возбудителя мучнистой росы *Erysiphe (Blumeria) graminis f.sp. graminis* в условиях лаборатории.

В процессе работы установили, что наиболее приемлемыми условиями заражения растений является заражение в фазе 2-х листьев, инокулюм – 1-2-хдневные конидии, заражение – путем опыливания ко-

нидиями (встряхивание листьев со спороношением путем легкого постукивания по ним над заражаемым растением). Инфицированные растения выдерживали при обычных условиях в лаборатории. При 20-25° С инкубационный период составляет 3-5 дней (рисунок 3). Капельная влажность для заражения не требуется, более того – она может даже препятствовать прорастанию конидий.

Таблица 1

Наиболее активные культуры против каждого из тестируемых патогенов

Тест-патоген	Наиболее активные культуры (по действию на 4-е сутки роста)	Наиболее активные культуры (по действию на 7-е сутки роста)	Культуры, сохранявшие активность в течение всего периода учетов
Fusarium гороха	1-1 2-1 3-1	2-1 Г-4 6-1	2-1
Fusarium томата	1-1 2-1 8-05	4-2 Г-1 8-05 6-1	8-05
Fusarium пшеницы	10-98 Г-1 1-5 2-1	10-98 Г-2* Г-4 8-05 2-2	10-98
Macrosporium solani	2-2 3-2 3-1 1-1	2-2 Г-4 Г-1	2-2
Botrytis cinerea	1-1 10-98 6-1 1-5 2-1	10-98 Г-2* Г-3 Г-1 1-1	10-98 1-1

Проверка биологической активности бактериальных культур против мучнистой росы ячменя.

Первоначально эксперимент был поставлен следующим образом.

Тест-растения выращивали в небольших контейнерах по 5 растений в каждом до стадии 2 листьев. Контрольные растения обрабатывали водой, опытные – культуральной жидкостью (КЖ). В качестве споровых культур были взяты культуры Г-1 и 9-4. Растения обрабатывали путем опрыскивания.



Рис. 3. Искусственное заражение ячменя мучнистой росой

Этот опыт носил рекогносцировочный характер и преследовал цель выяснить:

- не обладает ли культуральная жидкость фитотоксическим действием;
- имеется ли у культуральной жидкости фунгицидный эффект;
- хорошо ли удаются искусственные заражения растений.

В результате оказалось, что культуральная жидкость бактерий не обладала фитотоксичностью. Искусственные заражения происходили нормально, однако добиться их равномерного распределения по поверхности растений не удавалось из-за плохой смачиваемости листьев.

Если конидии не подвергались действию культуральной жидкости (КЖ), они прорастали в отсутствие капельной влаги, даже на листьях, которые ранее были подвергнуты опрыскиванию КЖ. Это говорит о неэффективности профилактической обработки растений для предотвращения последующих заражений.

Для проверки предположения, что КЖ инактивирует конидии, был проведен такой тест. Взяли большие листья ячменя с конидиальными подушечками и непосредственно на подушечки капилляром нанесли капли культуральной жидкости бактерии 9-4 так, чтобы была смочена вся конидиальная подушечка. В результате установлено:

- вода плохо смачивает конидии в подушечках. Капли скатываются с подушечек, конидии всплывают и вместе с водой скатываются с подушечек;
- культуральная жидкость бактерии 9-4 хорошо смачивает подушечки. Она полностью впитывается в подушечку.

Тест с заражением показал, что после воздействия культуральной жидкости на подушечку конидии инактивируются и не могут вызвать заражение листа. Это свидетельствует об эффективном ускоряющем действии обработки.

Полученные результаты показали, что для повышения эффективности обработок необходимо повысить смачиваемость листьев. С этой целью мы проверили, можно ли достигнуть лучшей смачиваемости при применении 0,1% раствора Твина 20. Опыт показал, что после предварительной обработки листьев 0,1% раствором Твина 20 при последующей обработке культуральная жидкость образовывала равномерно растекающуюся пленку. Вариант *Pseudomonas putida* (табл. 2) был поставлен с применением смачивателя.

Из таблицы 2 видно, что повторная обработка листьев культуральной жидкостью бактерии 9-4 повысила биологическую эффективность в 1,5 раза (с 50 до 75%). Этот эффект мы объясняем более полным покрытием поверхности листа (его можно было видеть и визуально, так как после высыхания капли оставляли на листьях блестящие следы).

Данные таблицы также показывают, что **с помощью бактериального микробиопрепарата можно получить подавление заражения листьев мучнистой росой на уровне, обеспечивающем высокую биологическую эффективность, сопоставимую с эффективностью химического фунгицида.**

Таблица 2

Биологическая эффективность культуральных жидкостей против мучнистой росы ячменя

№ п/п	Вариант	Биологическая эффективность по отношению к контролю (%)
1	Контроль	—
2	Бактерия 9-4	50*
3	Бактерия 9-4	75**
4	<i>Pseudomonas putida</i> PP	87,8
5	Риза (химический эталон)	99,1

Примечание: *) однократная обработка; **) после высыхания капель растения обработали культуральной жидкостью повторно

Это свидетельствует о том, что разработка микробиологического метода борьбы с мучнисторосяными грибами несомненно реальна. Не последнее значение в успешности микробиологического метода принадлежит разработке препаративной формы.

Выводы

Выделенные нами спорообразующие бактерии обладают выраженным антибиотическим действием против фитопатогенных грибов.

Система «мучнистая роса-ячмень» является удобной моделью для первичной оценки споровых бактерий против возбудителя мучнистой росы.

Первичный отбор споровых бактерий, активных против факультативных паразитов, на плотной питательной среде с последующей оценкой на модели «мучнистая роса-ячмень» позволяет получать культуры бактерий, которые могут служить продуцентами микробиологических средств для борьбы с мучнистыми росами.

Литература:

1. Криг Н. Получение накопительных и чистых культур // Методы общей бактериологии: В трех томах. Том 1 / Под ред. Ф. Герхарда и др. - Москва: Мир, 1983.

Prezentat la 11.01.2007