

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* НА ДОВСХОДОВУЮ
И ПОСЛЕВСХОДОВУЮ ГИБЕЛЬ ТОМАТОВ ОТ *RHIZOCTONIA SOLANI*
В УСЛОВИЯХ ВЕГЕТАЦИОННОГО ОПЫТА**

Светлана НИКОЛАЕВА, Аркадий НИКОЛАЕВ, Виктория ШУБИНА

Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы

Prelucrarea semințelor de tomate cu suspensii bacteriene ale culturilor *Pseudomonas fluorescens* și *Pseudomonas putida* denotă majorarea evidentă a germinației semințelor, mărirea energiei de creștere a plantulelor și accelerarea dezvoltării plantelor.

La fondul natural și artificial moderat de *Rhizoctonia solani* prelucrarea bacteriană a semințelor a indicat acțiunea protectivă în comparație cu variante fără prelucrări.

La fondul infecțios puternic acțiunea protectivă a bacteriilor este insuficientă.

The treatment of tomato seeds with suspensions of the bacteria *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* has increased seeds germination and accelerated plant growth.

The bacterization of seeds have an evident protective effect on the natural and moderate artificial infection with *Rhizoctonia solani* compared with the treatments without bacterization.

The protective effect of bacterization may not provide reliable protection of germinations and seedlings of tomato on a high level of infection.

Введение

В последние годы все чаще встречаются публикации о необходимости более широкого применения биологических средств для защиты растений и экологического земледелия, так как повсеместное использование химических средств отрицательно влияет на биоценозы, на здоровье людей и полезных животных, а также негативно сказывается на микроорганизмах и окружающей среде.

Среди различных биологических методов защиты растений особенно активно изучаются и внедряются микробиологические методы ввиду целого ряда их преимуществ перед другими методами. Эти преимущества состоят в том, что для культивирования микроорганизмов существует хорошо разработанное промышленное оборудование; микроорганизмы быстро и относительно легко выращиваются в ферментерах; процесс их выращивания может полностью контролироваться, механизироваться и даже автоматизироваться. Для их культивирования могут использоваться дешевые среды, компоненты которых нередко представляют собой отходы различных производств.

Бактерии рода *Pseudomonas* особенно привлекательны в борьбе с болезнями, передающимися семенами и поражающими корни растений. В англоязычной литературе [1] для обозначения таких бактерий уже стала обычной аббревиатура — PGPR (plant growth promoted rizobacteria). Многие псевдомонады хорошо приспособлены к обитанию в ризосфере растений, где питаются корневыми выделениями [2,3,4].

В процессе эволюции возник также и симбиоз между бактериями и растениями [5]. При этом бактерии обеспечивают растения стимуляторами роста гормональной природы – ауксинами, гиббереллинами, цитокининами [6,7], способствуют лучшему питанию растений, снабжая их легкоусвояемыми минеральными и органическими веществами [6]. Кроме того, ризобактерии в процессе роста образуют ряд антибиотических веществ, защищающих растения от болезней [1]. В свою очередь, растения выделяют в ризосферу вещества, способствующие размножению и питанию бактерий. Этим и объясняется столь широкое внимание к этой группе бактерий [8,9,10,11].

Цель исследований: изучить защитный эффект бактерий рода *Pseudomonas* на довсходовую и послеvсходовую гибель томатов от *Rhizoctonia solani* в условиях вегетационного опыта.

Объектом исследований служили бактерии *Pseudomonas fluorescens* (культура AP – продуцент препарата Ризоплан, и культура P_{f1}) , а также культура *Pseudomonas putida* (штамм PP).

Исследования проводили в течение 2006-2009 годов на естественном и искусственном инфекционном фоне *Rhizoctonia solani*.

Сорт томатов в разные годы меняли: в 2006 г. исследованиям подвергались сорта Дар, Ляна, Солярис, Лагуна, Оникс и Викторина, в 2007 году – сорт Амулет, в 2008 году – сорт Факел, в 2009 году – сорт Баллада.

Методика проведения исследований. Серии опытов по изучению защитного эффекта псевдомонад против довсходовой и послевсходовой гибели томатов предшествовало сравнительное изучение 2-х патогенов – *Sclerotinia sclerotiorum* и *Rhizoctonia solani* – на вирулентность к шести сортам томатов.

При создании инфекционного фона по годам менялся способ внесения инокулюма в почву:

- полоски агаризованной среды с мицелием патогена, выложенные вдоль рядов высеянных семян;
- блоки мицелия на агаризованной среде, размещенные на некотором расстоянии друг от друга вдоль рядов высеянных семян;
- смешанная с почвой культура патогена, выращенная на агаризованной среде;
- смешанная с почвой культура патогена, выращенная на смеси кукурузной муки и песка.

В отдельные годы использовалась разная по жесткости инфекционная нагрузка.

Семена перед посевом обрабатывались соответствующими бактериальными суспензиями.

Схемы опытов:

Опыт 2006 года:

Естественный фон	Инфекционный фон
Контроль (без обработки семян)	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Обработка семян AP	<i>Rhizoctonia solani</i> + AP <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> + AP-
Обработка семян Pf ₁	<i>Rhizoctonia solani</i> + Pf ₁ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> + Pf ₁

Опыт проводили в 3-кратной повторности. Опыту предшествовал подбор инфекционной нагрузки с таким расчетом, чтобы получить в контроле не менее 30% гибели растений (довсходовой и послевсходовой).

Опыт 2007 года включал такие же варианты, как и в 2006 году, но в вариантах с естественным фоном был добавлен вариант с обработкой семян культурой PP, а из вариантов с искусственным фоном был исключен вариант со *Sclerotinia sclerotiorum*.

Семена перед посевом замачивали в бактериальных суспензиях со следующими титрами:

- AP — $1,45 \cdot 10^9$ КОЕ/мл,
- PP — $1,35 \cdot 10^9$ КОЕ/мл,
- Pf₁ — $1,1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл,

Бактерии выращивали в жидкой среде, семена томата сорта Амулет замачивали в бактериальной суспензии на 2 часа. Повторность опыта 6-кратная. В вегетационном сосуде было по 15 семян, т.е. по 90 семян в варианте. Учет вели по количеству взошедших растений и их состоянию.

Опыт 2008 года был заложен по схеме:

Естественный фон	Инфекционный фон
Контроль (без обработки семян)	10 г инфекции на 1 кг почвы
Обработка семян AP	10 г инфекции на 1 кг почвы+AP
Обработка семян PP	10 г инфекции на 1 кг почвы+PP
Обработка семян Pf ₁	10 г инфекции на 1 кг почвы+Pf ₁
	30 г инфекции на 1 кг почвы
	30 г инфекции на 1 кг почвы+AP
	30 г инфекции на 1 кг почвы+PP
	30 г инфекции на 1 кг почвы+Pf ₁
	50 г инфекции на 1 кг почвы
	50 г инфекции на 1 кг почвы+AP
	50 г инфекции на 1 кг почвы+PP
	50 г инфекции на 1 кг почвы+Pf ₁

В опыте была использована свежеизолированная культура *Rhizoctonia solani*. Опыт проводился в 5-кратной повторности, по 55 семян в варианте. Семена обрабатывали соответствующими суспензиями с добавлением КМЦ. Используются 10-кратные разведения исходных бактериальных суспензий, что приближено к производственным концентрациям рабочих растворов. Исходные титры бактерий:

AP — $1,6 * 10^9$ КОЕ/мл,

PP — $1,0 * 10^9$ КОЕ/мл,

Pf₁ — $4 * 10^8$ КОЕ/мл.

Инфекция для равномерного распределения в почве смешивалась с прожаренной кукурузной мукой, почвенная смесь насыпалась в горшки по мерке, семена раскладывались по поверхности почвы и сверху прикрывались небольшим количеством почвы, взятой по мерке. Таким образом была обеспечена равная для всех вариантов глубина заделки семян (такие же условия стандартизации при закладке опыта соблюдались во всех опытах).

Опыт 2009 года включал 6 вариантов в 5-кратной повторности, повторностью служил один горшочек с 10-15 растениями. Семена обрабатывали исходной жидкой культурой с титром $5 * 10^9$ КОЕ/мл в течение 30 минут.

Для создания инфекционного фона был взят свежесодержимый (реизолированный) из погибших растений томата патоген, и инокулом был наработан на смеси кукурузной муки и песка. Инфекцию вносили из расчета 30 г на 1 кг стерильной почвы.

Схема опыта включала такие варианты:

Естественный фон	Инфекционный фон
Контроль (без обработки семян)	Без обработки семян
Обработка семян AP	Обработка семян AP
Обработка семян Pf ₁	Обработка семян Pf ₁

Результаты исследований и их обсуждение

Сравнительное изучение 2-х патогенов *Sclerotinia sclerotiorum* и *Rhizoctonia solani*, вызывающих довсходовую и послевсходовую гибель томатов, показало, что все сорта были более восприимчивы к *Rhizoctonia solani*, нежели к *Sclerotinia sclerotiorum*. Так, здоровых растений на инфекционном фоне *Sclerotinia* и *Rhizoctonia* было, соответственно: на сорте Дар – 88,9 и 50,0; Ляна – 52,8 и 22,2; Солярис – 77,8 и 44,4; Лагуна – 44,4 и 30,6; Оникс – 72,2 и 38,9; Викторина – 44,4 и 27,8 процентов. То есть грибок *Rhizoctonia* в наших опытах был более агрессивным, чем *Sclerotinia*. Это и определило выбор патогена для создания инфекционного фона в последующих экспериментах.

К сожалению, не все опыты по заражению растений были удачными, так как на этот показатель оказывали влияние и условия опыта, которые мы не могли контролировать, например – температуру в помещении, где проводились эксперименты.

Из 3-х вегетационных опытов, заложенных для проверки защитного эффекта псевдомонад в отношении ризоктониоза томатов в 2007 году, удачным был только опыт от 28 сентября, когда температура в помещении понизилась до +18-12°C. В таблице 1 приводятся данные в целом по варианту (количество семян в варианте – 90 шт.)

В опыте было очень растянуто во времени появление всходов: они появлялись вплоть до завершения опыта. В целом по опыту можно отметить следующее.

Ризоктония стимулировала появление всходов по сравнению с неинфекционным фоном. Так, на 10-й день опыта (8.10.07) в контроле взошло 20% растений, а на инфекционном фоне – 52%. Спустя 3 недели со дня закладки опыта (19.10.07) данные составляли, соответственно, 40% и 72,2%.

На 19.10.07 в варианте AP без патогена всхожесть семян составила 23,3%, в то время как на инфекционном фоне – 53,3%. По вариантам PP и Pf₁ всхожесть примерно одинакова как по инфекционному фону, так и без него.

На 19.10.07 все три примененные нами бактерии снизили послевсходовую гибель растений с 47,7% до 9,7 – 14,6% (таблица 2).

Из таблиц видно, что бактериализация семян томатов псевдомонадами даже на высоком инфекционном фоне сдерживала гибель растений, хотя в начале опыта на неинфекционном фоне сдерживала и появление всходов. Особенно это относится к варианту AP – продуценту Ризоплана. В то же время следует

отметить, что 2-часовое замачивание семян в бактериальных суспензиях не предусматривалось регламентом применения препарата Ризоплан, а взято нами лишь по аналогии с методикой по изучению колонизирующей способности бактерий.

Резюмируя все вышесказанное, можно говорить о достаточно высоком защитном эффекте всех трех испытанных нами псевдомонад. Эффект сдерживающего действия всех трех бактерий, особенно культуры AP, на скорость появления всходов скорее всего вызван длительным замачиванием семян в суспензиях высоких концентраций.

На рис.1 хорошо проиллюстрировано состояние растений на естественном (слева) и инфекционном (справа) фоне. Если в начале опыта большее количество всходов отмечено на инфекционном фоне, то к 23.10.07 всхожесть как бы выравнивается по двум фонам, но уже четко видно (по гибели растений на варианте ризоктонии), насколько инфекционный фон был высоким.

Таблица 1

Влияние бактеризации семян и инфекционного фона на всхожесть томатов и их состояние

Вариант	Без инфекции		Инфекционный фон	
	Взошло растений		Взошло растений	
	Шт.	% от числа высеянных семян	Шт.	% от числа высеянных семян
08.10.07				
Контроль	18	20,0	47	52,2
AP	0	0,0	14	15,6
PP	8	8,9	11	12,2
Pf 1	8	8,9	6	6,7
19.10.07				
Контроль	36	40,0	65	72,2
AP	21	23,3	48	53,3
PP	47	52,2	41	45,6
Pf 1	42	46,7	48	53,3
22.10.07				
Контроль	56	62,2	67	74,4
AP	34	37,8	55	61,1
PP	60	66,7	52	57,8
Pf 1	54	60,0	60	66,7
29.10.07				
Контроль	69	76,7	70	77,8
AP	52	57,8	70	77,8
PP	64	71,1	65	72,2
Pf 1	67	74,4	71	78,9
% здоровых растений на 29.10.07				
	От числа высеянных семян	От числа взошедших растений	От числа высеянных семян	От числа взошедших растений
Контроль	76,7	98,0	15,6	20,0
AP	57,8	100,0	30,0	41,5
PP	71,1	100,0	30,0	38,3
Pf 1	74,4	100,0	26,7	31,1
% здоровых растений от числа высеянных семян на 5.11.07				
Контроль	72,2		4,4	
AP	71,1		15,6	
PP	75,6		17,8	
Pf 1	77,8		21,1	

Таблица 2

Послевсходовая гибель томатов на 19.10.07 (%).

Вариант	Без инфекции	Инфекционный фон <i>Rhizoctonia</i>
Контроль	5,6	47,7
AP	0	10,4
PP	0	9,7
Pf 1	0	14,6

Результаты опыта 2008 года приводятся в таблице 3.

Бактеризация семян на естественном фоне ускорила их всхожесть. Так, на 7-е сутки в контроле всходов не было, а в вариантах с бактериризацией семян – от 2 до 15; развитие растений происходило быстрее. На 8-е сутки роста из 40 взошедших растений в контроле в фазе семядолей было только 2 растения, тогда как в вариантах с бактериризацией семян – от 11 до 37 штук.

Обращает на себя внимание тот факт, как с увеличением инфекционной нагрузки уменьшается всхожесть растений. В данном опыте даже минимальная нагрузка в 10 г инфекции на 1 кг почвы заметно снижала всхожесть семян. Это вызвано тем, что для создания инфекционного фона была взята свежеизолированная культура патогена. В таких условиях инфекционной нагрузки бактеризация семян недостаточно защищала растения от гибели.

По данным 2009 года на жестком инфекционном фоне (послевсходовая гибель растений в контроле 44,6%) проявился защитный эффект в вариантах с бактериризацией семян, но он был невысоким.

Таблица 3

Динамика появления всходов томатов в опыте с изучением влияния бактеризации семян в условиях разной инфекционной нагрузки *Rhizoctonia solani*
Сорт Факел. Опыт от 20.05.08

Варианты	Взошло на сутки роста (штук)								
	8-е			10-е			12-е		
	Всего	В т.ч. в фазе		Всего	В т.ч. в фазе		Всего	В т.ч. в фазе	
петельки		семядолей	петельки		семядолей	петельки		семядолей	
Контроль	40	38	2	50	0	50	50	0	50
10 г/кг почвы	34	33	1	44	3	41	44	3	41
30 г/кг почвы	28	25	3	38	9	29	40	9	31
50 г/кг почвы	23	20	3	31	13	18	31	12	19
AP	41	30	11	53	1	52	53	0	53
PP	49	12	37	54	1	53	55	0	55
Pf1	47	14	33	53	1	52	54	0	54
10g+AP	24	20	4	41	5	36	43	3	40
30g+AP	21	17	4	34	11	23	37	8	29
50g+AP	13	12	1	22	12	10	22	11	11
10g+PP	30	25	5	47	7	40	49	7	42
30g+PP	13	12	1	22	14	8	22	11	11
50g+PP	5	4	1	12	8	4	13	7	6
10g+Pf1	21	18	3	45	6	39	50	9	41
30g+Pf1	9	8	1	22	11	11	22	9	13
50g+Pf1	3	3	0	13	8	5	14	7	7

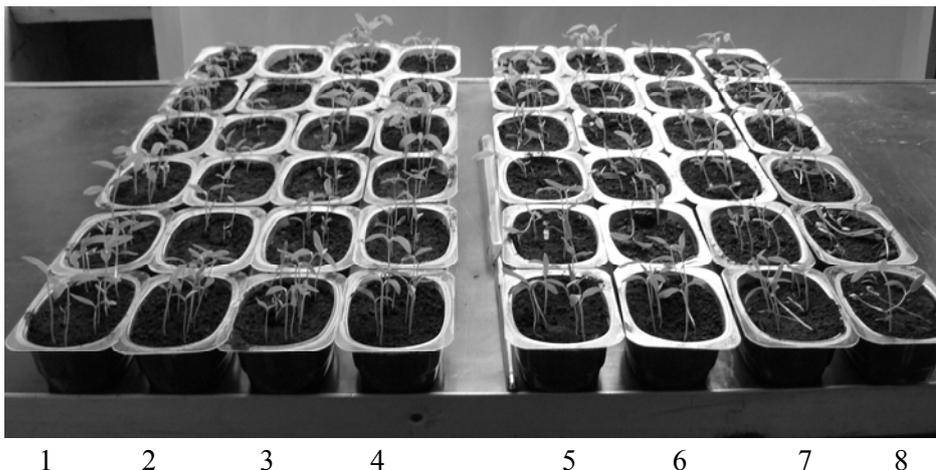


Рис.1. Состояние растений в опыте 23.10.07.

Условные обозначения вариантов: 1 - контроль; 2 - обработка семян AP; 3-обработка семян PP; 4- обработка семян Pf₁; 5 - обработка семян AP+*Rhizoctonia*; 6 - обработка семян PP+ *Rhizoctonia*; 7 - обработка семян Pf₁ + *Rhizoctonia*; 8 - *Rhizoctonia* (без обработки семян бактериями).

Некоторые различия в результатах защитного эффекта бактериализации семян псевдомонадами в условиях 2006-2007 и 2008-2009 годов объясняются тем, что в 2008-2009 годах мы использовали свежереизолированный высокоагрессивный изолят *Rhizoctonia solani*. Это говорит о том, что применение бактериализации целесообразно только на высоком агротехническом фоне и с учетом фитосанитарной обстановки, сложившейся в предшествующих условиях.

Выводы

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

Бактериализация семян томатов псевдомонадами стимулирует всхожесть и развитие растений томатов.

На умеренном инфекционном фоне бактериализация семян оказывает заметный защитный эффект.

На жестком инфекционном фоне защитное действие псевдомонад может оказаться недостаточным.

Бактериализация семян целесообразна лишь на высоком агротехническом фоне.

Литература:

1. Kloepper J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. // Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. F. B. Metting, Jr., ed. Marcel Dekker Inc. - New York, USA, 1993, p.255-274.
2. Vlassak K., Van Holm L., Duchateau L., Vanderleyden J. and De Mot R. Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri Lanka // Plant and Soil, 1992, 145, p.51-63.
3. Sorensen J., Jensen L. E. and Nybroe O. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: New knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies // Plant Soil, 2001, 232, p.97-108.
4. Rainey P.B. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. // Environ. Microbiol, 1999, 1, p.243-257.
5. Adhikari Tika B., Joseph C.M., Yang Guoping, Phillips Donald A., Nelson Louise M. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice// Can. J. Microbiol, 2001, v.47, No10, p.916-924.
6. Garcia de Salamone I. E., Hynes R. K., and Nelson L. M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. // Can. J. Microbiol, 2001, v.47, No10, p.404-411.
7. Glick B.R., The enhancement of plant growth by free-living bacteria. // Can. J. Microbiol, 1995, v.41, p.109-117.
8. Cattelan A.J., Hartel P. G., and Fuhrmann J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth.// Soil Sci. Soc. Am. J., 1999, No63, p.1670-1680.
9. Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. // Biotechnol. Adv. 1998, No16, p.729-770.
10. Benizri E., Baudoin E., and Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. // Biocontrol Sci. Technol, 2001, No.11, p.557-574.
11. Ramos Solano B., Iglesia M., Probanza A., Garcia J., Megias M., Mañero F. Screening for PGPR to improve growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded mediterranean ecosystems // Plant and Soil, 2006, v.28, No1-2, p.59-68(10).

Prezentat la 19.11.2009