

DOI: 10.33184/dokbsu-2021.5.5

Изучение влияния *Pseudomonas* sp. на фитопатогенные грибы при совместном культивировании

А. А. Лукаткин*, А. С. Лукаткин

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева

Россия, Республика Мордовия, 430005 г. Саранск, улица Большевистская, 68.

*Email: ussr1960@yandex.ru

Исследовано влияние *Pseudomonas* sp. на рост фитопатогенных грибов (*Fusarium* sp. и *Botrytis cinerea*) при совместном культивировании. Показано, что бактерии в процессе совместного твердофазного культивирования способны угнетать рост фитопатогенов, но степень подавления была различной. Наибольшая угнетающая способность *Pseudomonas* sp. выявлена в отношении *Fusarium* sp.

Ключевые слова: *Pseudomonas* sp., *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea*, совместное культивирование, рост, подавление.

В настоящее время для защиты растений от болезней, вызванных патогенными микроорганизмами, широко используются химические препараты. Их эффективность высока, однако, накапливаясь в природных экосистемах, многие из этих веществ или их производных могут наносить вред растениям, животным и человеку. В связи с этим одним из методов борьбы с фитопатогенной микрофлорой могло бы стать использование микроорганизмов, обладающих способностью активно заселять ризосферу и ризоплану растений, используя питательные вещества, поставляемые растениями в составе корневых экзометаболитов [1]. Такие бактерии способны контролировать развитие фитопатогенов в ризосфере растений как за счет конкуренции за экологическую нишу – источники углерода и энергии [2], так и продуцируя различные антифунгальные метаболиты [3] или гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки грибов.

Биопрепараты, создаваемые на основе ризосферных микроорганизмов, могут быть достойной альтернативой химическим пестицидам [4]. Однако степень воздействия на патогенные организмы может варьировать в зависимости от состава, концентрации, сроков хранения биопрепарата и т.п. К тому же разные патогены могут обладать неодинаковой восприимчивостью к микроорганизмам, входящим в состав биопрепарата. В связи с этим необходимо детальное изучение степени их воздействия на развитие фитопатогенов.

В работе изучали влияние *Pseudomonas* sp. на рост фитопатогенных грибов (*Fusarium* sp. и *Botrytis cinerea*) при совместном культивировании. Исходный посевной материал бактерий *Pseudomonas* sp. был выращен и хранился на скошенном питательном агаре следующего состава, г/л: глюкоза – 5; пептон – 5; дрожжевой экстракт – 3; агар – 18, pH 7.0. Фитопатогенные грибы *Fusarium* sp. и *Botrytis cinerea* выращены на среде Чапека-Докса следующего состава (г/л): сахароза – 30, NaNO₃ – 3, KH₂PO₄ – 1, MgSO₄ – 0.5, KCl – 0.5, FeSO₄*7H₂O – 0.01, агар-агар – 20, pH – 5.8.

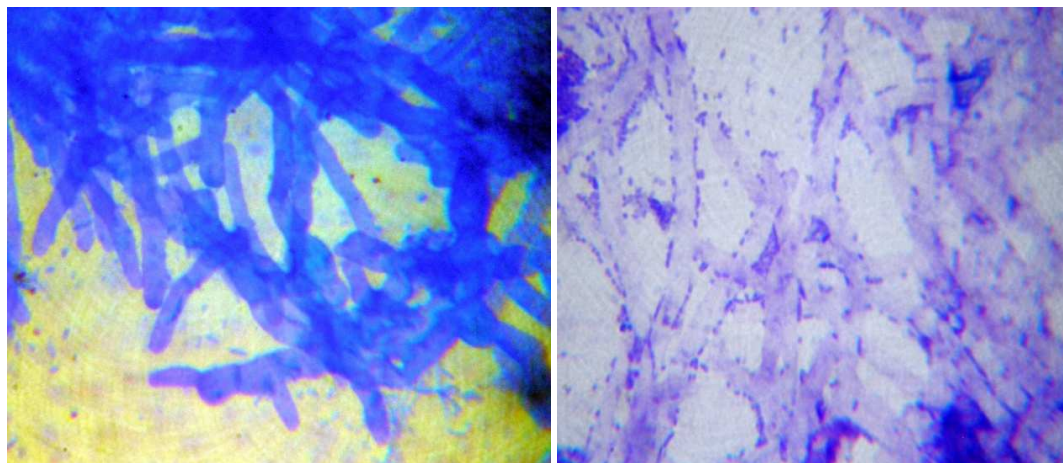
Совместное культивирование проводили в чашках Петри на твердой среде Чапека-Докса. Посевным материалом служила суточная культура бактерий *Pseudomonas* sp., выращенная на среде следующего состава, г/л: глюкоза – 20; пептон – 5; дрожжевой экстракт – 10; pH 7.0. Полученный инокулят в количестве 0.1 мл растирали шпателем Дригальского по поверхности среды и выращивали в течение 24 часов в термостате при температуре 30°C. Затем в центр чашки уколом засеивали фитопатогенные грибы *Fusarium* sp. или *Botrytis cinerea*. Совместное культивирование в течение первых 10 суток роста проводили в термостате при температуре 30°C, затем переносили в условия комнатной температуры. Воздействие бактерии *Pseudomonas* sp. на рост фитопатогенов изучали через каждые 24 часа культивирования. Совместные культуры фотографировали (увеличение 10x100) и отмечали степень воздействия на рост и состояние патогена.

В результате исследования обнаружено, что в начале процесса совместного культивирования *Pseudomonas* sp. и *Botrytis cinerea* наблюдался рост фитопатогена. На 1-е сутки роста диаметр колонии составил 12 мм; мицелий имел развитую пушистую структуру. В начале культивирования мицелий гриба имел сильную базофилию, о чем свидетельствует наличие интенсивной синей окраски; это подтверждает целостность строения мицелия (рис. 1, А).

Спустя 2 суток культивирования обнаружено частичное разрушение грибного мицелия, и как следствие – снижение интенсивности окрашивания основным красителем. Клетки *Pseudomonas* окрасились в виде маленьких точечных скоплений на поверхности мицелия (рис. 1, Б).

Через 5 и 10 суток совместного роста *Pseudomonas* и *B. cinerea* на среде Чапека-Докса развития мицелия фитопатогена не отмечено (рис. 2).

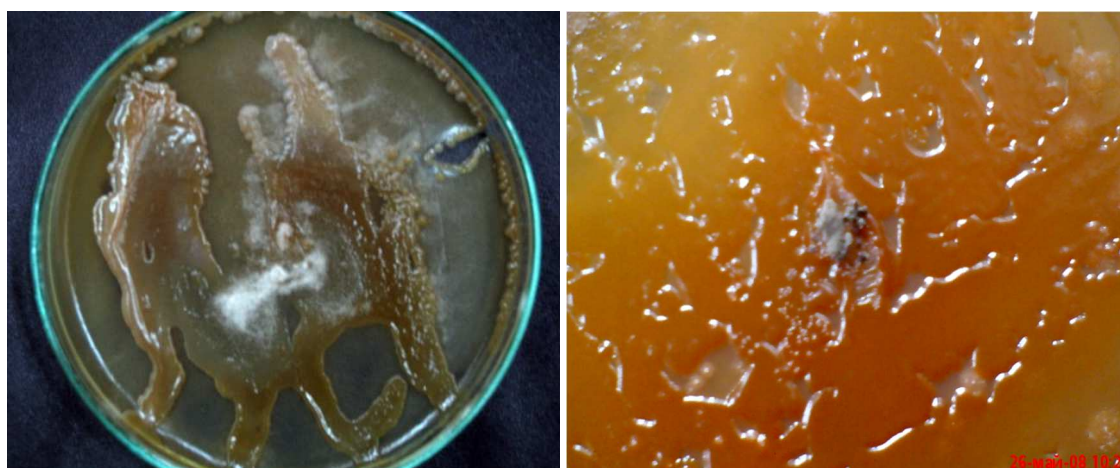
При микроскопировании объектов было отмечено отрицательное воздействие бактерий на развитие мицелия фитопатогена. Это проявлялось в снижении интенсивности окраски мицелия, что свидетельствует о его частичном лизисе (рис. 3, А). Однако спустя 15 суток, после переноса в условия комнатной температуры, отмечено частичное восстановление мицелия гриба, так как интенсивность базофилии увеличилась (рис. 3, Б). Это может быть связано со снижением степени бактериального воздействия.



А

Б

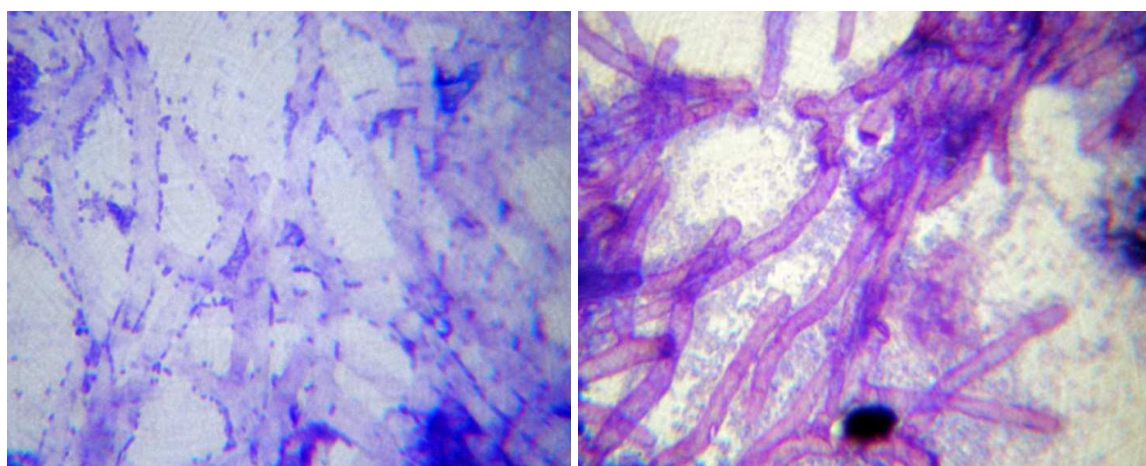
Рис. 1. Микрофотография совместного культивирования *Pseudomonas* и *B. cinerea* в первые часы роста (А) и спустя 2 суток культивирования (Б).



А

Б

Рис. 2. Рост *Botrytis cinerea* на поверхности *Pseudomonas* sp. спустя 5 (А) и 10 (Б) суток совместного культивирования.



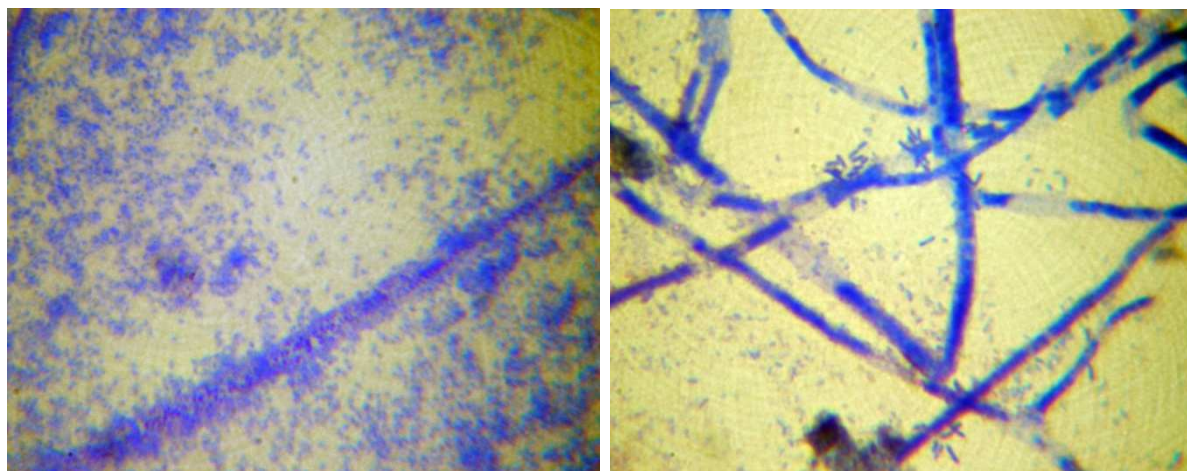
А

Б

Рис. 3. Микрофотографии препарата совместного культивирования *Pseudomonas* и *B. cinerea* через 10 (А) и 15 (Б) суток роста.

При совместном культивировании *Pseudomonas* sp. и *Fusarium* sp. также было отмечено антагонистическое воздействие бактерий. На 1-е сутки роста колонии *Fusarium* sp. достигли диаметра 2 мм. Мицелий был слабо развитым, серого цвета. При микроскопировании совместного препарата *Pseudomonas* и *Fusarium* в 1-е сутки роста грибной мицелий имел сильную базофилию и, кроме того, высокую адсорбцию клеток бактерии на стенке гиф (рис. 4, А). Однако при совместном культивировании с *Fusarium* наблюдалась меньшая степень раннего литического воздействия бактерий *Pseudomonas*, чем в опыте с *B. cinerea*.

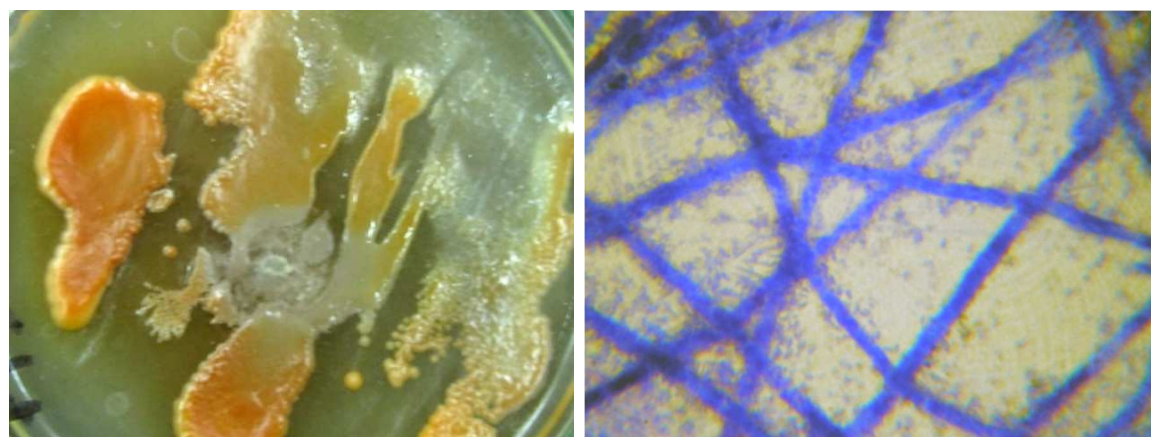
Спустя 2 суток культивирования, так же как и с *Botrytis*, наблюдалась некоторая степень лизиса мицелия, но уровень воздействия был ниже. Как видно из рис. 4, Б, разрушенный мицелий не окрашивался. Также можно наблюдать разрывы мицелия.



А

Б

Рис. 4. Микрофотография совместного культивирования *Pseudomonas* sp. и *Fusarium* sp. на 1-е сутки роста (А) и через 2 суток (Б).



А

Б

Рис. 5. Совместное культивирование *Pseudomonas* sp. и *Fusarium* sp. на среде Чапека-Докса: А – внешний вид на 5-е сутки роста; Б – микрофотография через 10 суток.

Развитие гриба *Fusarium* частично подавлялось на 5-е сутки при тесном взаимодействии с бактериями *Pseudomonas* (рис. 5, А). Однако в дальнейшем спустя 10 суток выращивания в тех же условиях мицелий гриба снова восстанавливался, так как интенсивность базофилии увеличилась (рис. 5, Б).

Спустя месяц с момента начала совместного культивирования микроорганизмов в термостате мицелий гриба *Fusarium* покрыл практически всю поверхность чашки Петри, что, возможно, указывает на полное старение бактериальной культуры и прекращение ее ферментативной активности.

Таким образом, бактерии *Pseudomonas* в процессе совместного твердофазного культивирования способны угнетать рост фитопатогенных грибов, но степень подавления в разные сроки роста была различной. Наибольшая угнетающая способность *Pseudomonas* sp. выявлена в отношении *Fusarium* sp. При этом эффективность *Pseudomonas* в отношении обоих патогенов имела ограниченный период действия.

Литература

1. Kapulnik Y. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria // Plant Roots: The Hidden Half. Eds. Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. – New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Ink.– 1996. – P. 769–780.
2. Lugtenberg B. J. J., Dekkers L. C., Bansraj M. *Pseudomonas* genes and traits involved in tomato root colonization // IC – MPM1 Congress Proceedings: Biology of Plant-Microbe Interactions. Eds. De Wit P. J. G. M., Bisseling T., Stiekema W. J. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN. – 1999. – V. 2. – P. 324–330.
3. Thomashow L. S., Weller D. M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites // Plant Microbe Interactions. Eds. Stacey G., Keen N.– New York: Chapman and Hall. – 1996. – V. 1. – P. 187–233.
4. Лукаткин А. А., Лукаткин А. С. Получение противогрибного препарата на основе бактерий *Pseudomonas aureofaciens* при разных условиях культивирования на послеспиртовой барде // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. – 2018. – №3 (4). – С. 86–93.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета (д-р. биол. наук, проф. Р. Г. Фархутдинов)

Study of the influence of *Pseudomonas* sp. for phytopathogenic fungi in co-cultivation

A. A. Lukatkin*, A. S. Lukatkin

National Research Mordovia State University

68 Bolshevistskaya street, 430005 Saransk, Republic of Mordovia, Russia.

**Email: ussr1960@yandex.ru*

The effect of *Pseudomonas* sp. on the growth of phytopathogenic fungi (*Fusarium* sp. and *Botrytis cinerea*) was studied during co-cultivation. It was shown that bacteria are able to inhibit the growth of phytopathogens in joint solid-phase cultivation, but the degree of suppression was different. The greatest inhibitory ability of *Pseudomonas* sp. found in relation to *Fusarium* sp.

Keywords: *Pseudomonas* sp., *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea*, co-cultivation, growth, suppression.