

Н. В. Алексєєнко, Т. М. Мельничук, І. О. Каменєва

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології НААНУ

Є. Є. Андронов

Державна наукова установа Всеросійський науково дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН

ФОРМУВАННЯ ЕПІФІТІВ НАСІННЯ НУТУ ЗА ДІЇ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ

*У лабораторних дослідженнях із застосуванням мікробіологічних і генетичних методів встановлено здатність штамів антифунгальної дії *Bacillus sp. 01-1* та *Bacillus sp. 12501* зберігатися на насінні нуту і домінувати у складі епіфітної мікрофлори протягом шести місяців, що позитивно впливає на його посівні властивості.*

Ключові слова: нут, штам, мікроорганізми – антагоністи фітопатогенів, епіфітна мікрофлора, посівні властивості.

Епіфітна мікрофлора насіння може спричиняти істотний як позитивний, так і негативний вплив на розвиток та врожайність рослин. Вона є основним джерелом формування ризосферної мікрофлори, яка впливає на ріст і розвиток рослин протягом вегетації. Багато епіфітів здатні продукувати вітаміни та речовини, які стимулюють ріст коренів і надземної частини рослин, а інші є фітопатогенними мікроорганізмами. Значну роль епіфіти відіграють при зберіганні насіння. Уражене фітопатогенними грибами насіння втрачає посівні властивості, а також накопичує токсичні речовини, що можуть призводити до захворювання людини та тварин [9].

Формування епіфітної мікрофлори насіння бобових рослин відбувається під час обмолоту, основним джерелом мікроорганізмів є ґрунт і пил. До моменту розкриття бобів, насіння захищене і майже повністю вільне від мікроорганізмів [4, 5].

Використання хімічного захисту рослин від фітопатогенів не завжди забезпечує бажаний результат. Хімічні протруйники негативно впливають на схожість насіння при зберіганні. Тоді, як інокульоване біопрепаратами насіння менше уражується хворобами ніж протруєне в процесі зберігання [10, 1, 7].

Мета досліджень полягала у визначенні здатності штамів – біоагентів препаратів антифунгальної дії до зберігання на поверхні насіння нуту і впливати на формування його епіфітів та посівні властивості.

Матеріали і методика досліджень. Перспективні штами *Bacillus sp.* 01-1 та *Bacillus sp.* 12501, одержані в лабораторії біологічного азоту та фосфору ПДС ІСГМ, які проявляють антагоністичну дію до широкого спектру фітопатогенних грибів, досліджували у порівнянні з штамами *Paenibacillus polymyxa* П і *Bacillus subtilis* D-26, які є біоагентами відповідних препаратів антифунгальної дії Біополіциду і Фітоспорину.

Використовували насіння нуту сорту Александрит селекції Селекційно-генетичного інституту УААН. Сорт занесений до Реєстру сортів рослин України з 2001 року і рекомендований для вирощування в зоні Степу України.

Вплив штамів на посівні властивості і епіфітну мікрофлору насіння нуту, в порівнянні з хімічним фунгіцидом Вітавакс 200 ФФ, досліджували в лабораторних умовах при зберіганні протягом шести місяців. Насіння обробляли мікробними препаратами у розведенні з водою 1:10 (1% від маси насіння). В контролі застосовували еквівалентну кількість води, інокуляційне навантаження бактерій складало 0,4 млн. клітин на 1 насінину.

Мікробіологічний аналіз обробленого насіння проводили через добу, місяць та півроку зберігання. Після змиву з 10 г насіння і 10 хвилинного струшування у 100 мл стерильній водопровідній воді (при об'ємі ємності 250 мл) на качалці при 220 об./хв. робили розведення 10^{-2} . Облік грибів проводили на суло-агарі з рН - 5,5, кількість бактерій – на гороховому агарізованому середовищі з рН – 7,2 [8].

Виділення ДНК проводили з 1,5 мл 12-годинної культури з використанням обробки протеїназою К і наступною обробкою фенолом-хлороформом, хлороформом та осаджуванням ізопропанолом. Якість ДНК перевіряли шляхом електрофорезу. Для аналізу ідентичності штамів проводили геномний фінгерпринтинг з використанням праймерів BOX, REP, ERIC. Фрагменти ампліфікації розділяли в 3% агарозі [2, 3].

Посівні властивості насіння нуту перевіряли після шестимісячного зберігання при постійній температурі 20°C, без освітлення. Енергію проростання визначали на 3 добу, схожість - на 7 добу [6].

Результати досліджень. Аналіз отриманих у 2007 році результатів показав, що через добу на необробленому насінні чисельність колонієутворюючих одиниць (КУО) бактерій складала 47,5 тис./г насіння. Через місяць, вона зменшувалася на порядок, а через шість місяців – ще на один порядок значень і склала 0,4 тис. КУО/г насіння. Тоді як кількість грибів протягом шестимісячного зберігання насіння залишалася на одному рівні - близько 6,0 тис. КУО/г насіння.

Застосування хімічного протруйника насіння Вітавакс 200 ФФ забезпечило зниження кількості бактеріальної мікрофлори майже вдвічі та мікроміцетів утричі. Інокуляція насіння мікроорганізмами – антагоністами фітопатогенів сприяла зростанню кількості бактеріальної мікрофлори і зни-

женню чисельності мікроміцетів у складі епіфітної мікрофлори насіння нуту через півроку його зберігання.

У варіанті з обробкою насіння *Bacillus sp.* 01-1 відмічено найбільшу чисельність бактерій через місяць і півроку зберігання відповідно 7,8 та 3,4 тис. КУО/г насіння, що майже в 3 рази перевищувало показники варіанта з Вітаваксом 200 ФФ. У цьому ж варіанті за шість місяців зберігання насіння чисельність мікроміцетів зменшувалася на 92,5% у порівнянні з контролем. При застосуванні *Bacillus sp.* 12501 чисельність мікроміцетів була меншою на 81,2% у порівнянні з контролем. Обробка насіння Вітаваксом 200 ФФ через півроку зберігання забезпечила зниження кількості мікроміцетів і бактерій відповідно на 73,6 % та 50% порівняно з контролем.

Встановлено, що штам *Bacillus sp.* 01-1, який є антагоністом фітопатогенів, активно пригнічує розвиток мікроміцетів в епіфітної мікрофлори інокульованого насіння нуту при зберіганні протягом шести місяців, проте кількість бактерій на поверхні насіння залишається вищою у порівнянні з референтними штамми.

Аналогічні тенденції зміни чисельності епіфітної мікрофлори насіння нуту, формування якої відбувалося під дією штамів – антагоністів фітопатогенів, відмічені в умовах лабораторних досліджень, які були проведені в 2008 і 2009 роках. Встановлено, що у варіанті з обробкою насіння штамом *Bacillus sp.* 01-1 чисельність бактерій через добу, місяць і півроку зберігання інокульованого насіння перевищувала в декілька разів показники контролю та варіанта із застосуванням хімічного протруйника Вітавакс 200 ФФ (табл. 1).

Після шести місяців зберігання насіння обробленого *Bacillus sp.* 01-1 чисельність мікроміцетів зменшилась відповідно на 78,5% і 34% порівняно з контролем та Вітаваксом 200 ФФ. Аналогічні зміни в чисельності мікроміцетів на насінні відмічено при застосуванні штаму *Bacillus sp.* 12501.

Значне зростання кількості бактерій на поверхні насіння нуту під дією інокуляції у порівнянні з контролем можна пояснити здатністю штамів зберігатися на його поверхні шість місяців, витісняючи інші види епіфітних бактерій.

За допомогою геномного фінгерпринтингу було підтверджено здатність штамів зберігатись на поверхні насіння нуту на прикладі штаму *Bacillus sp.* 01-1 (рис. 1).

1. Чисельність мікроорганізмів поверхні насіння нуту сорту Александрит за дії бактерій – антагоністів фітопатогенів (тис. КУО/г насіння, 2008 рік)

Варіанти досліджу		Терміни зберігання насіння		
		1 доба	1 місяць	6 місяців
Контроль	1	61,0 ±3,00	10,9 ±0,30	1,5 ±0,05
	2	13,1 ±0,30	17,8 ±0,25	15,3 ±0,30
Вітавакс 200 ФФ	1	68,0 ±3,00	11,9 ±0,90	0,4 ±0,10
	2	6,5 ±0,10	6,9 ±0,25	5,0 ±0,20
<i>Bacillus subtilis</i> D-26	1	371,0 ±3,00	158,5 ±9,50	41,1 ±2,00
	2	2,0 ±0,45	3,5 ±0,35	4,3 ±0,30
<i>Paenibacillus polymyxa</i> П	1	89,5 ±3,50	18,8 ±0,95	1,4 ±0,20
	2	2,1 ±0,65	5,1 ±1,15	6,9 ±0,10
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	1	398,0 ±14,00	133,3 ±3,60	39,4 ±0,90
	2	1,7 ±0,60	2,8 ±0,20	3,3 ±0,30
<i>Bacillus sp.</i> 12501	1	99,5 ±3,50	20,1 ±0,50	3,9 ±0,25
	2	2,2 ±0,40	3,6 ±0,35	3,1 ±0,25

Примітки: 1 – бактерії; 2 – міксоміцети

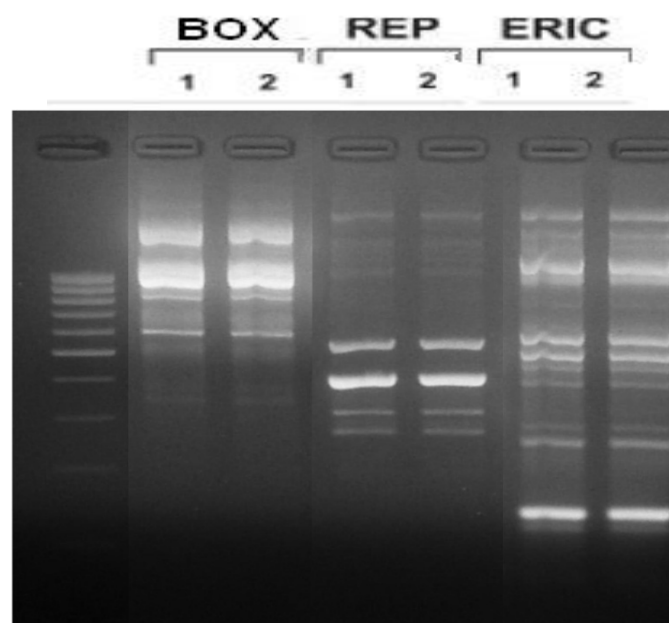


Рис. 1. Геномний фінгерпринтинг штаму *Bacillus sp.* 01-1. Маркер – 100 пн сходи. 1 - вихідний штам; 2 - штам виділений з інокульованого насіння через шість місяців зберігання

Встановлено, що інокуляція насіння нуту штамми-антагоністами фітопатогенів позитивно вплинула на підвищення значень кожного показника посівних властивостей насіння нуту після шести місяців зберігання. Так, в умовах 2008 року за дії штамів *Bacillus sp.* 01-1 та *Bacillus sp.* 12501 швидкість проростання була найбільшою (табл. 2).

2. Вплив мікроорганізмів – антагоністів фітопатогенів на посівні властивості насіння нуту сорту Александрит після шестимісячного зберігання (2008 рік)

Варіанти дослідів	Енергія проростання, %	Швидкість проростання*	Схожість, %	Дружність, %
Контроль	93,7	29,8	98,7	28,8
Вітавакс 200 ФФ	100	31,8	100	33,3
<i>Bacillus subtilis</i> D-26	97,5	30,1	98,7	30,8
<i>Paenibacillus polymyxa</i> П	98,7	30,8	98,7	32,8
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	100	32,2	100	33,3
<i>Bacillus sp.</i> 12501	98,7	32,1	100	31,2
НІР ₀₅	6,37	1,72	2,63	4,72

Примітка. * сума середніх чисел пророслих насінин щоденно

Показано, що після шести місяців зберігання насіння під дією штамів – антагоністів фітопатогенів *Bacillus sp.* 01-1 та *Bacillus sp.* 12501 відбувається збільшення довжини корінця проростків нуту (рис. 2).

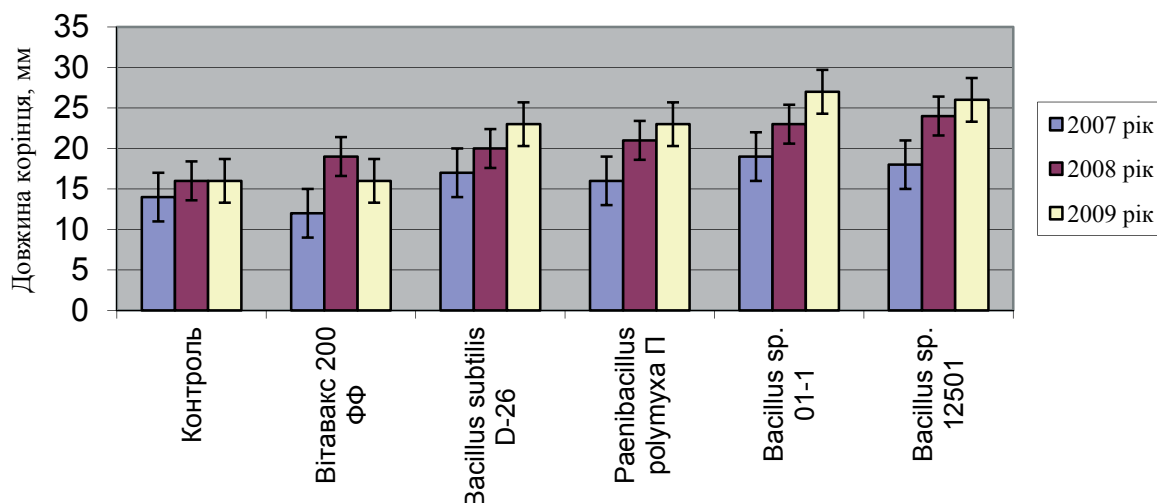


Рис. 2. Вплив мікроорганізмів – антагоністів фітопатогенів на довжину корінця проростків нуту

Таким чином, вплив мікроорганізмів – антагоністів фітопатогенів на формування епіфітної мікрофлори насіння нуту починається з моменту інокуляції і продовжується в процесі його зберігання протягом шести місяців.

Показано здатність штамів антифунгальної дії зберігатись на поверхні насіння нуту, витісняючи інші види епіфітних бактерій, яку доведено за допомогою геномного фінгерпринтингу на прикладі штаму *Bacillus sp.* 01-1. Виявлено, що чисельність грибів епіфітної мікрофлори зменшується майже в п'ять разів у порівнянні з контролем.

Встановлено позитивний вплив штамів – антагоністів фітопатогенів *Bacillus sp.* 01-1 та *Bacillus sp.* 12501 на посівну якість насіння нуту через шість місяців його зберігання, при цьому відбувається збільшення довжини корінця проростків.

Бібліографічний список

1. Дідович С. В. Вплив мікробних препаратів антифунгальної дії на епіфітну мікрофлору насіння нуту при його зберіганні / С. В. Дідович, М. З. Толкачов // X з'їзд Товариства мікробіологів України (Одеса, 15-17 вересня 2004 р.): Тези доп.-Одеса:Астропринт, 2004.-С. 273.
2. Дуган А. М. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса / А. М. Дуган, В. С. Журков, С. К. Абишев // Цитология и генетика.-1990.-24, №6.-С. 41-45.
3. Коростик Е. В. Универсальные 16S rRNA праймеры для описания генетического разнообразия сообщества почвенных прокариот / Е. В. Коростик, А. Г. Пинаев, Г. А. Ахтемова, Е. Е. Андронов // Экологическая генетика. - 2006. - Т. 4, №4. - С. 33-38.
4. Мишустин Е. Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия / Е. Н. Мишустин. – М.: Наука, 1972. – 342 с.
5. Мишустин Е. Н., Трисвятский Л. А. Микробы и зерно / Е. Н. Мишустин, Л. А. Трисвятский - М.:Изд.-во АН СССР, 1963.- С. 39-43.
6. Насіння сільськогосподарських культур. Сортові та посівні якості. Технічні умови: ДСТУ2240-93. - [Чинний від 2008-06-18]. – К.: Держстандарт України, 2008. - 73 с.
7. Попов Ф. А. Фитозащитное и ростстимулирующее действие бактерий *Bacillus subtilis* 12А в условиях лабораторных и полевых опытов / Ф. А., Попов, А. Е. Чикилева, Э. И. Коломиец // Междунар. конф. (Минск, 26-28 мая, 2004. – С. 375 – 377.
8. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева [ред. Шильниковой В. К.] – 6-е изд. перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2005. – 256 с.
9. Lebel С. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease / С. Lebel // Ann. Rev. Phytopathol. – 1965. –№ 3. – Р. 209-230.
10. O'Brien R. D. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic populations sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria / R. D. O'Brien, S. E. Lindow // Phytopathol. – 1989. – Vol. 79. – Р. 619-627.