

Научная статья

УДК 632.937.1.05

doi: 10.34655/bgsha.2022.67.2.005

ПОЧВЕННЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА КАК ИСТОЧНИК ШТАММОВ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ОТ *BIPOLARIS SOROKINIANA* И *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Елена Петровна Пучкова¹, Сергей Витальевич Хижняк²,
Анастасия Вячеславовна Алексеева³

Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Елена Петровна Пучкова, puchkova_el@mail.ru

Аннотация. Проведен сравнительный анализ встречаемости микроорганизмов-антагонистов к фитопатогенным грибам *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum* на фоне различных обработок почвы. Микроорганизмы, проявившие антагонизм к грибам *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum*, присутствовали в каждом изучаемом сообществе. При этом, к фитопатогенным грибам *Bipolaris sorokiniana* статистически значимо (p -value 0,03) наибольшее число антагонистов обнаружено в варианте опыта с отвальной вспашкой (больше чем в 2 раза, 16 колоний микроорганизмов-антагонистов из 20 проверенных изолятов). Наибольшее число антагонистов к *Fusarium graminearum* статистически значимо (p -value 0,02) обнаружено в образце с отвальной обработкой и азотными удобрениями (8 колоний штаммов-антагонистов из 20 проверенных). В итоге из 100 изолятов в изученных вариантах опыта 57 проявили антагонизм к *Bipolaris sorokiniana* и 28 к *Fusarium graminearum*. Наибольшая антибиотическая активность была выявлена у штаммов PSBON4, PSBU1, PSBON5, PVN5 и PSBU3, среди которых преобладали бактерии *Bacillus* spp. и *Actinobacteria* spp. У данных изолятов зона ингибирования к изучаемым тест-культурам была 5 мм и выше. Все исследуемые штаммы оказали статистически значимое ($p < 0,01$) снижение интенсивности и распространенности заболевания на проростках пшеницы. Наиболее эффективными проявили себя изоляты PSBON4 (предварительная идентификация *Bacillus* sp.) и PSBU1 (предварительная идентификация *Actinobacteria* sp.). Так, обработка семян PSBON4 снизила интенсивность болезни на 22,0 процента, распространенность на 20,0 процентов в сравнении с контролем. Обработка семян PSBU1 к снижению интенсивности заболевания на 23,5 процентных пункта и на 16,0 процентных пункта по распространенности заболевания. Кроме этого, изучаемые изоляты оказали статистически значимый ($p < 0,001$) эффект стимуляции на проростки. Наибольшее увеличение длины проростков пшеницы оказали изоляты PSBU1 и PSBON5 (на 6,5 и 5,8 см соответственно в сравнении с контролем).

Ключевые слова: фитопатогенные грибы, биологическая защита, пшеница, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, микроорганизмы-антагонисты, антагонизм.

Original article

SOIL MICROBIAL COMMUNITIES AS A SOURCE OF STRAINS FOR THE BIOLOGICAL PROTECTION OF WHEAT FROM *BIPOLARIS SOROKINIANA* AND *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Elena P. Puchkova¹, Sergei V. Khizhnyak², Anastasia V. Alekseeva³

Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia

Corresponding author: Elena P. Puchkova, puchkova_el@mail.ru

Abstract. A comparative analysis of the occurrence of microorganisms-antagonists to the phytopathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium graminearum* against the background of various soil treatments has been carried out. Microorganisms that showed antagonism to the fungi *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium graminearum* were present in every studied community. At the same time, the largest number of antagonists to the phytopathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana* (p -value 0.03) was found in a variant of an experiment with moldboard plowing (more than 2 times, 16 colonies of antagonist microorganisms from 20 tested isolates). The largest number of antagonists to *Fusarium graminearum* was statistically significant (p -value 0.02) in the sample with moldboard treatment and nitrogen fertilizers (8 colonies of antagonist strains out of 20 tested). As a result, out of 100 tested soil isolates in different variants of the experiment, 57 showed antagonism to *Bipolaris sorokiniana* and 28 to *Fusarium graminearum*. The highest antibiotic activity was found in strains PSBON4, PSBU1, PSBON5, PVN5, and PSBU3, among which the bacteria *Bacillus* spp. and *Actinobacteria* spp. In these strains, the zone of no growth to the studied test cultures was 5 mm and more. All studied strains had a statistically significant ($p < 0.01$) reduction in the intensity and prevalence of the disease on wheat seedlings. The most effective isolates were PSBON4 (preliminary identification of *Bacillus* sp.) and PSBU1 (preliminary identification of *Actinobacteria* sp.). Thus, the treatment of seeds with PSBON4 led to a decrease in the intensity of the disease by 22.0 percentage points, the prevalence by 20.0% compared with the control. Seed treatment with PSBU1 reduced disease intensity by 23.5 percentage points and 16.0 percentage points in disease prevalence. In addition, the studied isolates had a statistically significant ($p < 0.001$) stimulating effect on seedling growth. The PSBU1 and PSBON5 isolates had the greatest increase in the length of wheat seedlings (by 6.5 cm and 5.8 cm, respectively, in comparison with the control).

Keywords: phytopathogenic fungi, biological protection, wheat, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, antagonist microorganisms, antagonism.

Введение. Защита зерновых культур выдвигается на передний план, так как больший ущерб растениям причиняют фитопатогенные организмы, в том числе возбудители грибных заболеваний. Особенно велика вредоносность возбудителей корневых гнилей зерновых культур как наиболее распространенного заболевания. Фитопатогеном гельминтоспориозной корневой гнили зерновых культур является микромицет *Bipolaris sorokiniana*, который в отдельные годы, по разным оценкам, может вызывать потери урожая от 10 - 30 и более % [1, 2]. Также не менее вредоносными возбудителями для зерновых культур являются грибы р. *Fusarium*, которые помимо прочего продуцируют опасные микотоксины (трихотецены и др.) [3, 4]. Из экологически безвредных средств защиты растений от вредных организмов могут быть использованы биологические методы на основе антагонистических микроорганизмов. Микроорганизмы-антагонисты фитопатогенных

микромицетов почти не оказывают влияния на полезные сообщества почвенных микроорганизмов. Являясь агентами живой природной среды, они с легкостью входят в экосистему, не нарушая ее целостности. Растения, обработанные биопестицидами, безопасны для человека, теплокровных животных и пчел [5, 6, 7, 8, 9]. Тем не менее, внедрение биологических средств может сдерживаться в силу неконкурентоспособности микроорганизмов-антагонистов в новых микробиоценозах. Таким образом, поиск новых антагонистических микроорганизмов, приспособленных к определенным почвенно-климатическим условиям, является актуальным [10, 11, 12].

Цель исследования заключалась в выделении и отборе наиболее сильных местных штаммов микроорганизмов-антагонистов против фитопатогенных грибов *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum*.

Объекты и методы исследования.

Объектами исследования являлись бактериальные сообщества почв в ООО «Миндерлинское» в Красноярской лесостепи. Климатические условия континентальнее и умеренно сухие. Образцы почв взяты под яровой пшеницей Новосибирская 15. Почва – чернозем выщелоченный с обыкновенным. Применяемое азотное удобрение – аммиачная селитра (34,7 кг/га д.в.). Исследования проводились в 2019-2020 гг.

Почвенные образцы отобраны в следующих вариантах: 1. Без основной обработки почвы и внесением аммиачной селитры. 2. Отвальная вспашка на 20-22 см и внесением аммиачной селитры. 3. Отвальная вспашка на 20-22 см без внесения аммиачной селитры. 4. Без основной обработки почвы и без внесения аммиачной селитры. 5. Почва из-под диких многолетних трав.

Объектом для тестирования выделенных микроорганизмов являлись микромицеты *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum*, извлеченные из зараженных семян пшеницы биологическим методом, с последующим высевом на питательную среду.

Выращивание штаммов из почвенных образцов осуществляли на питательном агаре для культивирования микроорганизмов (ПД-агар). Проверку антагонистической активности проводили на питательной среде № 2 ГРМ (Сабуро). На питательную среду в чашке производился посев *Bipolaris sorokiniana*, вокруг гриба высевали почвенные штаммы микроорганизмов. По результатам общего роста культур выявляли микроорганизмы-антагонисты по зоне ингибирования гриба. Этим же методом проверяли антагонистическую активность в отношении *Fusarium graminearum* (рис. 1).

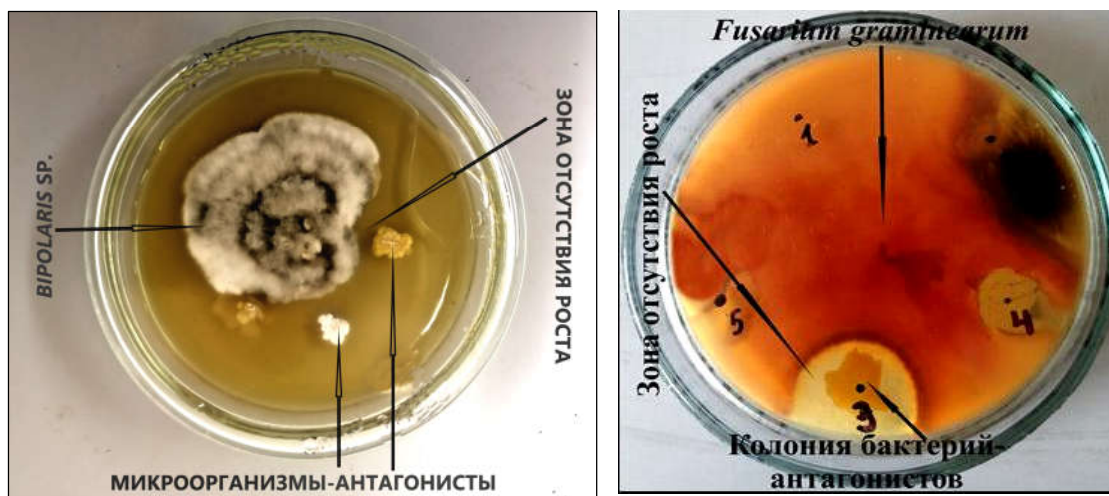


Рисунок 1. Проверка антагонистической активности выделенных штаммов-антагонистов к *Bipolaris sorokiniana* (слева) и *Fusarium graminearum* (справа)

Эффективность наиболее сильных штаммов-антагонистов в снижении интенсивности и распространенности корневой гнили проверяли методом искусственного заражения тест-культурами заранее бактеризованных семян пшеницы Новосибирская 15 с последующим выращиванием в рулонной культуре. Схема эксперимента в рулонной культуре включала следующие варианты опыта: контроль (семена без обработки с искусственным заражением возбудителями обыкновенной

корневой гнили); бактеризация семян штаммом PSBON4 с искусственным заражением возбудителями обыкновенной корневой гнили; бактеризация семян штаммом PSBU1 с искусственным заражением возбудителями обыкновенной корневой гнили; бактеризация семян штаммом PSBON5 с искусственным заражением возбудителями обыкновенной корневой гнили; бактеризация семян штаммом PVN5 с искусственным заражением возбудителями обыкновенной кор-

невой гнили; бактериализация семян штаммом PSBU3 с искусственным заражением возбудителями обыкновенной корневой гнили. Титр штаммов-антагонистов в суспензиях составлял 10^9 . Учет интенсивности и распространенности корневой гнили проводили по ГОСТ 12044-93 [13]. Кроме того, учитывали длину надземной и подземной части проростков пшеницы.

Микрокопирование выполняли микроскопом «Микмед-6» с камерой DCM-130E.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли по критерию χ^2 («хи-квадрат») и точному критерию Фишера (F-критерий). Интенсивность и распространенность корневой гнили оценивали однофакторным дисперсионным анализом [14, 15]. Программное обеспечение для математической обработки MS Office XP и StatSoft STATISTICA 8.0.

Результаты и обсуждение. Микроорганизмы, проявившие антагонизм к *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum*, были обнаружены во всех почвенных образцах. Влияние разных способов обработки почвы показало, что к грибам *Bipolaris sorokiniana* наибольшее число штаммов-антагонистов (16 колоний) было найдено в варианте с отвальной вспашкой без внесения аммиачной

селитры. Наибольшее количество микроорганизмов-антагонистов (8 колоний) к *Fusarium graminearum* было обнаружено в варианте с отвальной обработкой почвы вспашкой с внесением аммиачной селитры и с почвенных образцов из-под диких многолетних трав. При этом, между вариантами по встречаемости штаммов-антагонистов к *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum* имеются значимые различия ($p < 0,05$).

В итоге из 100 исследуемых почвенных штаммов 57 проявили антагонизм к *Bipolaris sorokiniana* и 28 к *Fusarium graminearum*. Наибольшая антибиотическая активность была выявлена у штаммов PSBON4, PSBU1, PSBON5, PVN5 и PSBU3, среди которых преобладали бактерии *Bacillus* spp. и *Actinobacteria* spp. При этом, зона подавления к изучаемым тест-культурам была 5 мм и выше.

Все исследуемые штаммы оказали статистически значимое ($p < 0,01$) снижение интенсивности и распространенности корневой гнили на проростках пшеницы. Наиболее эффективными проявили себя изоляты PSBON4 (предварительная идентификация *Bacillus* sp.) и PSBU1 (предварительная идентификация *Actinobacteria* sp.) (рис. 2).

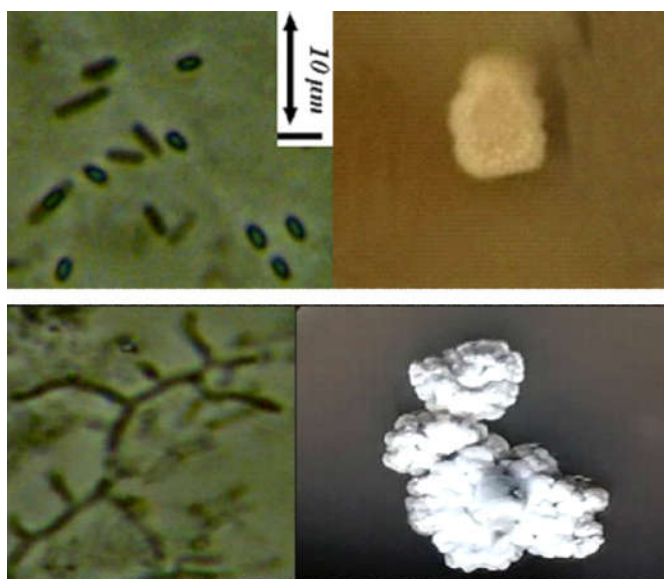


Рисунок 2. Морфология и макроколония штамма PSBON4 (сверху) и PSBU1 (снизу)

Обработка семян PSBON4 привела к понижению интенсивности болезни на

22,0%, распространенности на 20,0 %, в сравнении с контролем. Обработка семян

PSBU1 к снижению интенсивности заболевания на 23,5 процентных пункта и на

16,0 процентных пункта по распространенности заболевания (рис. 3).

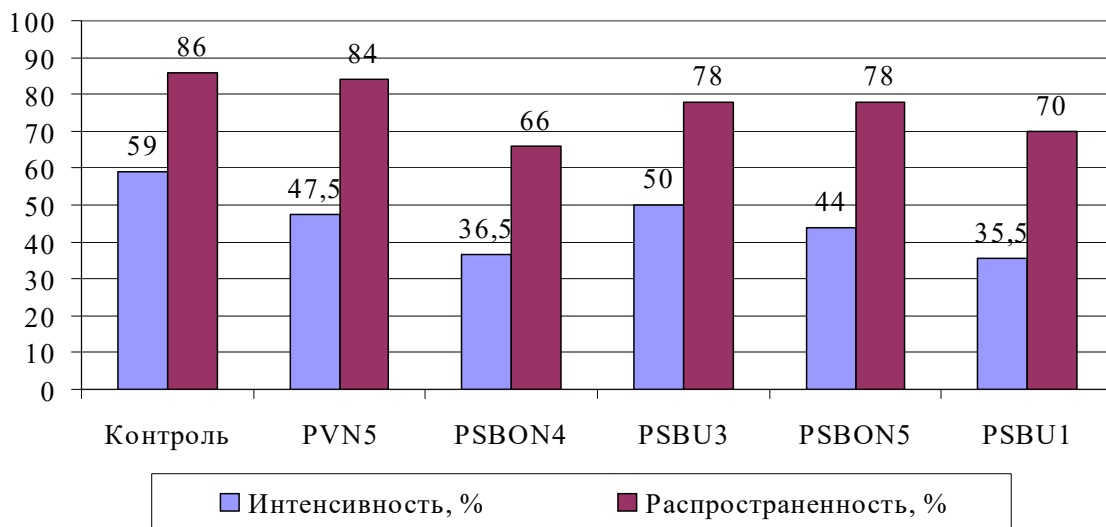


Рисунок 3. Интенсивность и распространенность заболевания у проростков пшеницы при искусственном заражении семян, предварительно бактериализованных штаммами-антагонистами

Кроме этого, бактеризация изучаемыми штаммами оказала статистически значимый ($p < 0,001$) эффект стимулирования на проросток. Наибольшее увеличение

длины проростков пшеницы оказали изоляты PSBU1 и PSBON5 (на 6,5 и 5,7 см соответственно, по сравнению с контролем) (рис. 4).

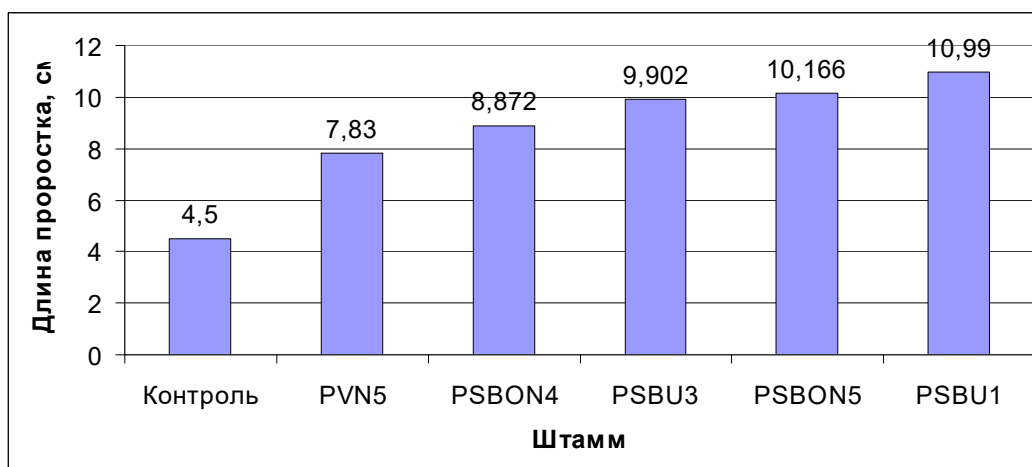


Рисунок 4. Бактеризация семян микроорганизмами-антагонистами на длину проростка пшеницы

Заключение. При изучении встречаемости штаммов-антагонистов к *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum* установлено, что между почвенными образцами существуют статистически значимые различия ($p < 0,05$). При этом отвальная вспашка повысила частоту встречаемости антагонистов на уровне значимости $p < 0,01$ как в отношении *Bipolaris sorokiniana*, так и *Fusarium graminearum*.

Также выделенные микроорганизмы-антагонисты показали свою эффективность в снижении интенсивности и распространенности заболевания. Кроме этого, обнаружен эффект стимулирования в отношении проростков пшеницы. Таким образом, проведенные исследования показали перспективность использования почвенных микробных сообществ Восточной Сибири для защиты пшеницы от

Bipolaris sorokiniana и *Fusarium graminearum*.

Список источников

1. Желтова К.В., Долженко В.И. Корневые гнили озимой пшеницы и их вредоносность // Вестник ОрелГАУ. 2017. № 1 (64). С. 45-51.
2. Acharya K. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas // Australian Journal of Crop Science. 2011. № 5 (9). Pp. 1064-1071.
3. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур // Защита и карантин растений. 2011. № 5. С. 70-111.
4. Горобей И.М., Ашмарина Л.Ф., Коняева Н.М. Фузариозы зернобобовых культур в лесостепной зоне Западной Сибири // Защита и карантин растений. 2011. № 2. С. 14-16.
5. Семькин В.А., Пигорев И.Я., Тарасов А.А., Глинушкин А.П., Плыгун С.А., Сычева И.И. Микробные препараты и регулятор роста как средства биологизации земледелия // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. № 11 (59). С. 3-9.
6. O'Brien P.A. Biological control of plant diseases // Australasian Plant Pathology. 2017. № 46 (4). Pp. 293–304.
7. M.J. Soleimani, M. Shamsbakhsh, M. Taghavi and Sh. Kazemi. Biological Control of Stem and Root-rot of Wheat Caused by *Bipolaris* spp. by using Antagonistic Bacteria, Fluorescent Pseudomonads and Bacillus spp. // Journal of Biological Sciences. 2005. № 5. Pp. 347-353
8. Puchkova E.P., Ivchenko V.K. Incidence of microorganisms antagonistic to plant pathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium* sp. in different soil communities // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. Volume 548. P. 52069. doi: 10.1088/1755-1315/548/5/052069
9. Puchkova E.P., Gaas M.V., Khizhnyak S.V., Ivchenko V.K., Polosina V.A. The occurrence of antagonists microorganisms to phytopathogenic fungi in consideration of various tillages // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. Volume 421. P. 62037. doi: 10.1088/1755-1315/421/6/062037
10. Yoann Besset-Manzoni, Pierre Joly, Aline Brutel, Florence Gerin, Olivier Soudiere, Thierry Langin, Claire Prigent-Combaret. Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee

success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria // PLoS ONE. 2019. №14 (12). P. 0225655

11. Amaria W., Soesanthy F., Ferry Y. The Effectiveness of Biofungicide *Trichoderma* sp. with Three Kinds of Carrier on White Root Disease *Rigidoporus microporus* // Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar. 2016. № 3(1). Pp. 37–44.

12. Butu M., Stef R., Grozea I., Corneanu M., Butnariu M. Biopesticides: Clean and Viable Technology for Healthy Environment // Bioremediation and Biotechnology. 2020. Pp. 107–151.

13. ГОСТ 12044-93. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. URL: <https://standartgost.ru>

14. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. Москва : Фининсы и статистика, 1982. 344 с.

15. Хижняк С.В., Пучкова Е.П. Математические методы в агроэкологии и биологии. Красноярск : Изд-во Краснояр. гос. аграр. ун-та, 2019. 240 с.

References

1. Zheltova K.V., Dolzhenko V.I. Root rot of winter wheat and its harmfulness. *Vestnik Ore/GAU*. 2017;1(64):45-51 (In Russ.)
2. Acharya K. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Australian Journal of Crop Science*. 2011;5(9):1064-1071.
3. Gagkaeva T.Yu., Gavrilova OP, Levitin M.M., Novozhilov K.V. *Fusarium* wilt disease of grain crops. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2011;5:70-111 (In Russ.)
4. Gorobei I.M., Ashmarina L.F. & Konyaeva N.M. *Fusarium* wilt diseases in the forest-steppe zone of West Siberia. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2011;2:14-16 (In Russ.)
5. Semykin V.A., Pigorev I.Y., Tarasov A.A., Glinushkin A.P., Plygun S.A., Sycheva I.I. Microbial preparations and growth regulators as a means of biologization in agriculture. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016;11(59):3-9 (In Russ.)
6. O'Brien P. A. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*. 2017;46(4):293–304.
7. M.J. Soleimani, M. Shamsbakhsh, M. Taghavi and Sh. Kazemi. Biological Control of Stem and Root-rot of Wheat Caused by

Bipolaris spp. by using Antagonistic Bacteria, Fluorescent Pseudomonads and Bacillus spp. *Journal of Biological Sciences*. 2005;5:347-353.

8. Puchkova E.P., Ivchenko V.K. Incidence of microorganisms antagonistic to plant pathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium* sp. in different soil communities. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2020. Vol. 548. P. 52069. doi: 10.1088/1755-1315/548/5/052069

9. Puchkova E.P., Gaas M.V., Khizhnyak S.V., Ivchenko V.K., Polosina V.A. The occurrence of antagonists microorganisms to phytopathogenic fungi in consideration of various tillages. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2020. Vol. 421. P. 62037. doi: 10.1088/1755-1315/421/6/062037

10. Yoann Besset-Manzoni, Pierre Joly, Aline Brutel, Florence Gerin, Olivier Soudière, Thierry Langin, Claire Prigent-Combaret. Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat

protection against Fusarium seedling blight by soil bacteria. *PLoS ONE*. 2019;14(12):0225655.

11. Amaria W., Soesanthy F., Ferry Y. The Effectiveness of Biofungicide *Trichoderma* sp. with Three Kinds of Carrier on White Root Disease *Rigidoporus microporus*. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*. 2016;3(1):37–44.

12. Butu M., Stef R., Grozea I., Corneanu M., Butnariu M. Biopesticides: Clean and Viable Technology for Healthy Environment. *Bioremediation and Biotechnology*. 2020:107–151.

13. GOST 12044-93. Interstate standard. Agricultural seeds. Methods for determination of disease infestation. URL: <https://standartgost.ru>

14. Pollard J.H. A handbook of numerical and statistical techniques. Moscow, 1982. 344 p.

15. Khizhnyak S.V., Puchkova E.P. Mathematical methods in agroecology and biology. Krasnoyarsk. Publ. house of Krasnoyarsk State Agrarian University. 2019. 240 p. (In Russ.)

Информация об авторах

Елена Петровна Пучкова – кандидат биологических наук, доцент кафедры общего земледелия и защиты растений, Институт агроэкологических технологий;

Сергей Витальевич Хижняк – доктор биологических наук, профессор кафедры экологии и природопользования, Институт агроэкологических технологий;

Анастасия Вячеславовна Алексеева – магистрант Института агроэкологических технологий.

Information about the authors

Elena P. Puchkova – Candidate of Science (Biology), Associate professor, General farming and plant protection Chair, Agro-ecological Technologies Institute;

Sergey V. Khizhnyak – Doctor of Science (Biology), Professor, Ecology and nature management Chair, Agro-ecological Technologies Institute;

Anastasia V. Alekseeva – Masters Student, Agro-ecological Technologies Institute.

Статья поступила в редакцию 17.01. 2022; одобрена после рецензирования 12.05.2022; принята к публикации 16.05.2022.

The article was submitted on 17.01.2022; approved after reviewing on 12.05.2022; accepted for publication on 16.05.2022.