

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.264

doi: 10.17223/19988591/42/3

О.Э. Кондакова, И.Д. Гродницкая

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск, Россия

Оценка биологической активности музейных культур микроорганизмов-антагонистов и их использование для предпосевной обработки семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) *in vitro*

Исследована антагонистическая и ферментативная активность музейных и выделенных из почв лесных питомников и больных растений антагонистов – микроскопических грибов рода *Trichoderma* и бактерий родов *Bacillus* и *Streptomyces* по отношению к фитопатогенным грибам рода *Fusarium*. Установлено, что все исследуемые антагонисты способны с разной степенью ингибировать рост и развитие изучаемых грибов рода *Fusarium*. Ферментативная активность (хитиназная, липазная, протеиназная) исследуемых антагонистов различна и зависит от таксономической принадлежности. У микромицетов рода *Trichoderma* отмечена средняя и сильная, а у бактерий (*S. lateritius*, *B. amyloliquefaciens*) – средняя и слабая ферментативная активность. Все исследуемые антагонисты в опытах *in vitro* увеличивали массовую всхожесть семян сосны обыкновенной в среднем на 32%. Наибольший ростстимулирующий эффект отмечен при применении *S. lateritius* и *T. longibrachiatum*. Внесение в почву антагониста *T. harzianum* вместе с семенами сосны элиминировало численность фитопатогенных грибов (р. *Fusarium*) под посевами в 2,7–3,3 раза по сравнению с их начальной численностью.

Ключевые слова: фитопатогены; антагонистическая и ферментативная активность; ростстимулирующий эффект; *Trichoderma*; *Bacillus*; *Streptomyces*.

Введение

В настоящее время в лесное хозяйство высокими темпами внедряется биологический метод защиты растений, основанный на использовании микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам и ростстимулирующей – по отношению к растениям [1–2]. Основными кандидатами в биологической защите хвойных являются микроорганизмы-антагонисты фитопатогенов [2–4]. Антагонистические свойства микроорганизмов проявляются за счет выделения различных по составу биологически активных веществ (ферментов, анти-

биотиков, гормонов и т.д.), обладающих высокой физиологической активностью и избирательным действием по отношению к фитопатогенам, а также способностью индуцировать системную резистентность растения-хозяина [2, 5]. Из продуктов метаболизма, выделяемых антагонистами, большое значение имеют ферменты группы гидролаз, так как именно они ответственны за гидролиз различных сложных по строению и составу веществ, например хитина – основного компонента клеточных стенок фитопатогенных грибов [6]. К микроорганизмам-антагонистам относят как бактерии, так и грибы. Часто используемыми антагонистами фитопатогенов являются бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, грибы рода *Trichoderma*. Известно, что эти микроорганизмы способны подавлять рост основных возбудителей болезней семян хвойных в лесных питомниках – грибов рода *Fusarium* [2, 7–8]. По мнению некоторых авторов, результаты испытаний биологической активности штаммов антагонистов, полученные в лабораторных условиях и в открытом грунте, могут значительно различаться, так как микробный антагонизм в почве протекает с учетом многих природных факторов, часто значительно отличаясь от антагонизма тех же микробов на искусственных питательных средах [1–3]. Неоднозначность результатов, полученных в опытах *in vitro* и *in vivo*, связана с различной выживаемостью этих микроорганизмов в почвенном микробном сообществе при различающихся питательных / пищевых ресурсах. Поиск антагонистов должен включать исследования взаимодействия микроорганизмов в контролируемых условиях и в естественной обстановке. Учитывая широкую распространенность грибных болезней семян хвойных в лесных питомниках Сибири, для защиты семян особенно важно подобрать аборигенные штаммы антагонистов, которые способны эффективно снижать численность фитопатогенов и в то же время стимулировать рост и развитие растений для получения качественного посадочного материала в условиях Сибирского региона. Цель исследования – установление биологической активности различных штаммов микроорганизмов с последующей оценкой их влияния на рост и развитие семян сосны обыкновенной.

Материалы и методики исследования

Объектами исследования являлись микроорганизмы-антагонисты и фитопатогенные грибы, выделенные из больных растений и почв лесных питомников Красноярского края и Республики Хакасия, идентифицированные и хранящиеся в музейной коллекции лаборатории микробиологии и экологической биотехнологии Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск). Два запатентованных штамма-антагониста предоставлены для исследований на лесных культурах Т.И. Громоных (*Trichoderma harzianum* Rifai штамм «Универсальный») и И.И. Гайдашевой (*Streptomyces lateritius* Pridham, штамм 19M/97) из коллекции Сибирского государственного уни-

верситета науки и технологии им. М.Ф. Решетнева (г. Красноярск). Поскольку при хранении на питательных средах продолжительное время микроорганизмы способны терять некоторые свои свойства, то для подтверждения их биологической активности, перед применением в полевых опытах, предварительно проводили лабораторные испытания. В опытах использовали микромицеты р. *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. longibrachiatum* и *T. lignorum*) и р. *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var. *annullatum*, *F. oxysporum*) и бактерии (*S. lateritius* и *B. amyloliquefaciens*). Перед исследованиями проведена таксономическая / видовая идентификация выделенных из почв и больных растений микроорганизмов-антагонистов и фитопатогенных грибов на основании морфологических методов и молекулярно-генетического метода – анализ последовательности ДНК (в ЦКП «Геномика», г. Новосибирск).

Определение таксономического положения грибов pp. *Trichoderma* и *Fusarium* первоначально осуществляли по морфолого-культуральным признакам, для чего колонии грибов выращивали на сусло-агаре и затем под микроскопом («Микмед 2», Россия), при увеличении 10×40 и 10×100, снабженным устройством для фазово-контрастной микроскопии КФ-4М («ЛОМО», Россия), изучали морфологию мицелия и конидиеносцев. Видовую принадлежность грибов уточняли проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием фрагментов рибосомной ДНК [9]. На первом этапе проводили ПЦР, позволяющую выявить полиморфизм в краевых областях локуса ДНК (местах посадки праймеров). Для установления видовой принадлежности изолятов провели прямой анализ нуклеотидных последовательностей секвенированием региона рДНК, включающего следующие последовательности локусов: 18S рРНК, BTC1, 5,8SpРНК, BTC2, 28SpРНК. Результаты секвенирования в формате FASTA использовали для идентификации видов с помощью программы BLAST в Генбанке NCBI и проверяли в международной базе данных Index Fungorum. Идентификацию *B. amyloliquefaciens* осуществляли секвенированием нуклеотидной последовательности генов на основе выявления 16S рРНК по Сэнгеру.

Наличие антагонистической активности у *T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *S. lateritius* и *B. amyloliquefaciens* по отношению к фитопатогенным грибам рода *Fusarium* определяли классическим методом двойных (встречных) культур [10–13]. Для этого в центр чашки Петри с картофельно-сахарозным агаром (КСА) помещали агаризованный блок (18 мм) с предварительно выращенным грибным фитопатогеном. Вокруг блока бактериологической петлей с суспензией антагониста проводили круг диаметром 6 см (предполагаемая зона для роста фитопатогена) и инкубировали в течение 72 ч при температуре 22°C. Контролем служили чашки с блоком фитопатогена в центре без антагониста [13]. Степень ингибирования (СИ) роста патогена подсчитывали по следующей формуле [12–13]:

$$\text{СИ} = (1 - (A/B)) \times 100,$$

где А – диаметр колонии фитопатогенного гриба в опыте, мм; В – диаметр колонии фитопатогенного гриба в контроле, мм. Регистрацию результатов проводили на 5-е, 10-е сутки после начала эксперимента. Визуально отмечали характер роста антагониста и изменение цвета, плотности и толщины колоний фитопатогена [13].

Литическую активность антагонистов определяли с помощью экспресс-тестов: наличие липазы – на желточном агаре, хитиназы – на синтетической среде с хитином, протеиназы – на молочном агаре. О способности антагониста продуцировать экзофермент судили по наличию маслянистого перламутрового слоя над и вокруг колонии (2-недельной) (тест на липазу); образованию зоны просветления вокруг колонии (тест на хитиназу и протеиназу) [13].

В лабораторных экспериментах проверяли ростстимулирующие свойства антагонистов на семенах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), предварительно обработав их водными суспензиями этих антагонистов. Для этого наращивали биомассу исследуемых микроорганизмов на плотных питательных средах в чашках Петри (микробицеты – на сусло-агаре, актиномицеты – на крахмало-аммиачном агаре, бактерии рода *Bacillus* – на мясо-пептонном агаре), инкубировали в течение 72 ч в термостате при температуре 27°C до стадии активного спорулирования. Затем смывом получали водную суспензию клеток (бактерий) или конидий (грибов) с титром (10^8 клеток (конидий) / мл) согласно методам [10]. Лабораторную всхожесть семян сосны обыкновенной определяли по стандартной методике [14]. Перед обработкой семян сосны водными суспензиями антагонистов их предварительно замачивали в 0,05%-ном растворе $KMnO_4$ в течение 18 ч и оставляли просохнуть при комнатной температуре. Затем семена замачивали в водных суспензиях антагонистов (10^7 спор/г) на 2 часа и в стерильной воде (контроль) на то же время. Обработка семян сосны $KMnO_4$ способствовала гибели вегетативных клеток многих бактерий и грибов, существенно уменьшив общую микробную численность и, тем самым, позволив развиваться популяциям микробов-антагонистов на их поверхности. Предварительные опыты показали, что марганцово-кислый калий не оказывал негативного влияния на микроорганизмов-антагонистов [15].

После просушки семена сосны высевали в заранее подготовленные пластиковые кюветы с темно-серой почвой, взятой на опытном лесопитомнике и характеризующейся высоким плодородием, высевали по 50 семян на кювету в трехкратной повторности. Лабораторный эксперимент для оценки ростстимулирующих свойств антагонистов на семенах сосны обыкновенной проводили в течение 40 дней при комнатной температуре и систематическом (каждые 2 дня) поливе. Учитывали всхожесть семян (общее число проросших семян за весь период исследования, выраженное в процентах от общего числа семян, взятых для проращивания) и количество проростков (число живых проростков в день подсчета) сосны в каждом варианте

опыта. Поведены следующие варианты обработки семян: контроль (H_2O); *T. harzianum*; *T. longibrachiatum*; *S. lateritius*; *B. amyloliquefaciens*.

Особенности взаимоотношений между антагонистами и фитопатогенами (развитие / подавление) в почве проверяли следующим образом: в пластиковые кюветы с посевами семян сосны, обработанных водной суспензией *T. harzianum*, методом полива вносили 50 мл водной суспензии грибов р. *Fusarium*, титр которых выше, чем у антагониста (10^9 конидий / мл). Численность фитопатогенов и триходермы на 1 г почвы определяли методом посева почвенной суспензии на среду Чапека в чашки Петри и подсчета выросших колоний каждые пять дней [14].

Результаты исследования и обсуждение

Рядом исследователей отмечается потеря биологической активности у штаммов при длительном хранении и периодических пересевах на питательные среды. В этой связи, хранящиеся в музее ИЛ СО РАН выделенные из почв питомников микробы-антагонисты, в лабораторных условиях проверяли на наличие антагонистической и ферментативной активности. Перед экспериментами у выделенных изолятов определяли видовую принадлежность с помощью морфологических показателей (макро- и микроконидии, наличие перегородок у макроконидий, хламидоспоры) и уточняли видовую принадлежность молекулярно-генетическим анализом ДНК у грибов на основе последовательности нуклеотидов 18S рРНК, у бактерии на основе 16S рРНК.

Антагонистическая и ферментативная активность исследуемых микробов-антагонистов. Для оценки степени проявления антагонистической активности и механизмов действия на фитопатогены исследовали влияние антагонистов (*T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *S. lateritius* и *B. amyloliquefaciens*) на пять штаммов фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* В3) в лабораторных условиях (*in vitro*) методом двойных культур. Результаты исследований показали, что в контроле все патогены интенсивно разрастались и занимали практически всю площадь чашки Петри, в среднем диаметр их колоний составил 6,44 см, при этом они образовывали хорошо развитый воздушный мицелий с ярким пигментом (*F. proliferatum*, *F. oxysporum* В3). Большинство антагонистов сдерживали рост и развитие фитопатогенов, у которых в некоторых случаях терялась способность образовывать развитый воздушный мицелий и вырабатывать пигмент (табл. 1). По результатам микроскопирования и визуального скрининга антагонистической активности исследуемых штаммов по отношению к грибам рода *Fusarium* отмечали два механизма воздействия: 1) образование зоны антагонистического действия – зона сдерживания роста патогена (антагонизм); 2) гиперпаразитизм – использование антагонистом патогена

в качестве субстрата, захват большой площади питательной среды и рост на патогене. Отмечено, что все три микромицета р. *Trichoderma* способны к гиперпаразитизму, при этом *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* – к *F. oxysporum*, *F. moniliforme* и *F. proliferatum*, а *T. lignorum* – к *F. moniliforme*, *F. proliferatum*. Гриб *T. harzianum* проявлял максимальную степень подавления роста (разница диаметров колоний фитопатогенного гриба в опыте и контроле, выраженная в процентах) у *F. oxysporum* и *F. proliferatum* с эффектом гиперпаразитизма на 10-е сутки (степень ингибирования 100%). По отношению к *F. moniliforme* var *annullatum* и *F. oxysporum* уже на 5-е сутки степень ингибирования составляла 59 и 53%, на 10-е – 84% (см. табл. 1). Ингибирование роста *F. moniliforme* меньше других – 7–22% (на 5-е и 10-е сутки соответственно) (см. табл. 1). Кроме того, грибы *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum* в присутствии антагонистов (триходеры) не образовывали плотного воздушного мицелия по сравнению с контрольными.

Т а б л и ц а 1 [Table 1]

Степень ингибирования роста колоний грибов р. *Fusarium* антагонистами, %
[Degree of *Fusarium* colonies growth inhibition (ID) by antagonists, %]

Штаммы-антагонисты [Antagonistic strains]	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium moniliforme</i>		<i>Fusarium proliferatum</i>		<i>Fusarium moniliforme</i> var <i>annullatum</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> B3	
	сутки [days]		сутки [days]		сутки [days]		сутки [days]		сутки [days]	
	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
<i>Streptomyces lateritius</i>	18	0	0	0	15	0	21	0	20	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	30	100	7	22	47	100	59	84	53	84
<i>Trichoderma lignorum</i>	21	41	19	19	46	100	62	56	49	67
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	39	41	29	38	61	74	77	100	61	73
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25	31	16	47	44	54	36	41	56	64

Микромицет *T. lignorum* проявлял гиперпаразитизм к штаммам *F. moniliforme* на 5-е сутки и *F. proliferatum* – на 10-е сутки с максимальной степенью ингибирования (100%) (см. табл. 1). В вариантах с *F. oxysporum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* B3 зафиксировано проявление гиперпаразитизма, гриб *T. lignorum* образовывал плотный валик из мицелия вокруг колоний патогенов, степень ингибирования роста которых на 10-е сутки составила 41, 56 и 67% соответственно. Отмечено, что во всех вариантах опыта *T. lignorum* образовывал хорошо развитый воздушный мицелий с окраской от белого до желто-зеленого цвета и ингибировал рост воздушного мицелия у *F. oxysporum* и *F. moniliforme* var *annullatum*.

Микромицет *T. longibrachiatum* проявлял антагонизм по отношению к *F. moniliforme*, *F. moniliforme* var *annullatum* и *F. oxysporum* ВЗ уже на 5-е сутки. Максимальную степень ингибирования роста *F. moniliforme* var *annullatum* (100%) и *F. proliferatum* (74%) наблюдали на 10-е сутки (см. табл. 1). Наиболее устойчивым к воздействию *T. longibrachiatum* оказался *F. moniliforme*, у которого на 10-е сутки отмечена минимальная СИ (13%). Отмечено слабое развитие мицелия у *F. oxysporum* при выращивании двойной культуры с антагонистом, а при выращивании антагониста с *F. oxysporum* ВЗ последний терял способность образовывать яркий фиолетово-розовый пигмент. Антагонистическая активность бактерий по отношению к фитопатогенам значительно ниже, чем у триходермы (см. табл. 1). Самую низкую СИ к грибам рода *Fusarium* проявил штамм *S. lateritius*. Максимальная степень ингибирования роста патогенов 15–21% наблюдалась на 5-е сутки, затем воздействие антагониста прекращалось (см. табл. 1). При этом только у *F. oxysporum* наблюдали слабо развитый воздушный мицелий, у остальных изолятов отмечали хорошо развитый мицелий и способность образовывать яркий розово-фиолетовый пигмент.

Фунгистатическое воздействие на все патогены рода *Fusarium* со стороны бактерий *B. amyloliquefaciens* проявлялось как на 5-е, так и на 10-е сутки (см. табл. 1). Наибольшая активность антагониста зарегистрирована по отношению к *F. proliferatum* и *F. oxysporum* ВЗ на 10-е сутки (54 и 64%). Менее всего *B. amyloliquefaciens* подавлял рост *F. oxysporum*, ингибирование которого отмечено только на 10-е сутки (31%) (см. табл. 1). При совместном выращивании бацилл и патогенов в двойной культуре *F. proliferatum* и *F. oxysporum* ВЗ выделяли пигмент, а у *F. proliferatum* подавлялось развитие воздушного мицелия.

В результате проведенных исследований установлено, что микробы-антагонисты показали разную степень ингибирования в зависимости от времени инкубирования (5-е или 10-е сутки) и вида патогена. Отмеченные у микромицетов рода *Trichoderma* способности к антагонизму и гиперпаразитизму свидетельствуют о полифункциональном механизме воздействия на патогены – они способны не только сдерживать и подавлять рост грибов р. *Fusarium* посредством выделения антагонистических веществ, но также способны использовать их мицелий в качестве субстрата. Известно [16–19], что грибы рода *Trichoderma* являются гиперпаразитами по отношению ко многим фитопатогенным микромицетам. Ингибирование роста патогенов обусловлено способностью микопаразита гидролизовывать клеточные стенки грибов-хозяев и использовать их в качестве субстрата за счет продуцируемых ферментов и выделяемых токсинов.

У исследуемых антагонистов проверяли активность образования литических ферментов, с помощью которых осуществляется способность к гиперпаразитизму. Именно литические ферменты, как известно, ответственны за способность антагонистов не только гидролизовывать сложные органические соединения, давая им преимущества, но и гидролизовывать клеточные

стенки патогенов, используя их как субстрат. Исследовали штаммы антагонистов на наличие трех основных литических ферментов – хитиназы, липазы и протеиназы. Липаза – широко распространенный в живых организмах термостабильный фермент, относящийся к классу гидролаз, катализирует расщепление сложнэфирных связей в липидах, необходим для гидролиза молекул триацилглицеридов с образованием диглицеридов, моноглицеридов, жирных кислот и глицерина; катализирует реакцию этерификации и переэтерификации [16–17]. В результате исследований три антагониста из пяти показали наличие липазной активности: сильной – *T. harzianum* и средней – *S. lateritius*, *T. lignorum* (табл. 2).

Т а б л и ц а 2 [Table 2]

Способность к образованию литических ферментов у испытуемых антагонистов
[Ability to produce lytic enzymes in tested antagonists]

Штаммы [Strains]	Активность фермента [Enzyme activity]		
	Липаза [Lipase]	Протеиназа [Proteinase]	Хитиназа [Chitinase]
<i>Streptomyces lateritius</i>	+++	++++	–
<i>Trichoderma harzianum</i>	++++	+++	++++
<i>Trichoderma lignorum</i>	+++	–	+++
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	–	+	++++
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	–	+	+

Примечание. Степень проявления ферментативной активности определяли визуально: – отсутствие; + очень слабая; ++ слабая; +++ средняя; ++++ сильная.

[Note. Degree of enzyme expression was defined visually: - absence; + very weak; ++ weak; +++ average; ++++ strong].

Еще один важный фермент, выделяемый микроорганизмами, – хитиназа отвечает за деградацию хитина до мономеров и N-ацетилглюкозаминов. Благодаря хитиназе микроорганизмы способны деградировать хитин, распространенный в живых организмах, размягчая клеточную стенку грибов и делая возможным их использование в качестве субстрата [20]. В литературе есть данные, что представители родов *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma* обладают хитинолитической активностью, но наиболее активными деструкторами хитина являются именно актиномицеты. Результаты экспресс-тестов показали, что наиболее высокой хитиназной активностью обладают *S. lateritius*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, средней – *T. lignorum*, что согласуется с литературными данными [21]. У бактерий *B. amyloliquefaciens* отмечена довольно слабая хитиназная активность (см. табл. 2).

За гидролиз казеина отвечают протеолитические ферменты (протеиназы). Протеиназы – экзоферменты микроорганизмов и растений, катализируют гидролитическое расщепление белков растительных и животных остатков и органического удобрения до полипептидов, а затем до аминокислот, действуя на пептидную связь [8, 22]. Результаты тестирования исследуемых ми-

кроорганизмов показали, что сильной протеиназной активностью обладали *S. lateritius* и *T. harzianum*, слабой – *B. amyloliquefaciens* и *T. longibrachiatum*, а гриб *T. lignorum* вовсе утратил способность вырабатывать этот фермент (см. табл. 2). Способность к гиперпаразитизму и высокая хитиназная активность микромицетов рода *Trichoderma*, указывают на их потенциальные возможности к гидролизу клеточных стенок фитопатогенов.

Влияние предпосевной обработки семян на рост и развитие проростков сосны обыкновенной *in vitro*. Ранее нами показано, что микроорганизмы, обладающие антагонистической активностью, способны стимулировать рост и развитие растений, а также изменять почвенную микробиоту, тем самым улучшая фитосанитарное состояние почвы и сеянцев хвойных в искусственных фитоценозах [23–24]. В наших исследованиях особое значение придавалось использованию аборигенных штаммов антагонистов, так как их биологическая активность непосредственно связана с местом обитания и со всем почвенным комплексом в целом.

Основываясь на результатах антагонистической и ферментативной активности исследуемых антагонистов, в опытах *in vitro* проводили их испытания на способность стимулировать прорастание семян сосны обыкновенной. Результаты опыта по влиянию микробной обработки на всхожесть семян, рост и развитие проростков сосны показали, что обработка всеми антагонистами стимулировала прорастание семян сосны по сравнению с контролем (рис. 1). Это сказалось как на всхожести семян, так и на количестве проростков в конце эксперимента. Максимальную всхожесть семян сосны обыкновенной отмечали в варианте с *T. longibrachiatum*, а наибольшее количество проростков к концу эксперимента – в вариантах *S. lateritius*, *T. longibrachiatum* и *T. harzianum*, что превышало контроль в 1,2–1,4 раза (см. рис. 1).

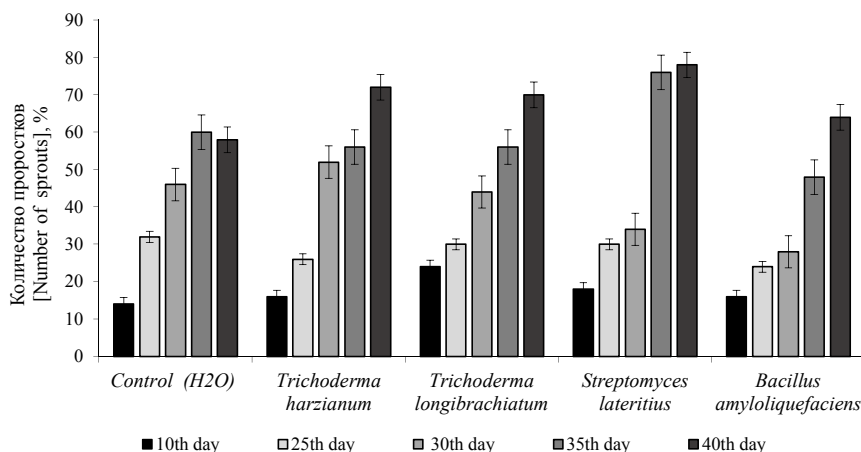


Рис. 1. Средняя арифметическая количества проростков сосны обыкновенной в течение 40 дней эксперимента при различных вариантах обработки семян, %
 [Fig. 1. Arithmetic mean of the number of Scots pine sprouts during 40 days of the experiment with different seed treatment types, %]

Исследование взаимоотношений между разными грибами в лабораторных условиях дает возможность изучать влияние отдельных факторов окружающей среды на гиперпаразитизм в почве. Поскольку изучение влияния всех природных факторов на взаимоотношения между грибами представляется маловероятным, в наших экспериментах проведены количественные учеты грибов р. *Fusarium* в ризосфере проростков с учетом воздействия на них антагониста *T. harzianum*. Путем высева почвенных суспензий на чашки Петри с питательной средой Чапека регистрировали снижение численности грибов р. *Fusarium*. К концу опыта численность популяций фитопатогенов уменьшилась в 2,7–3,3 раза по сравнению с начальной численностью за счет гиперпаразитизма триходермы, что уже не влияло на поражаемость проростков сосны обыкновенной. В то же время снизилась и численность внесенного антагониста *T. harzianum* в 1,6 раза в связи с уменьшением субстрата (фитопатогенов) и процессами восстановления структуры микробного пула в почве (рис. 2).

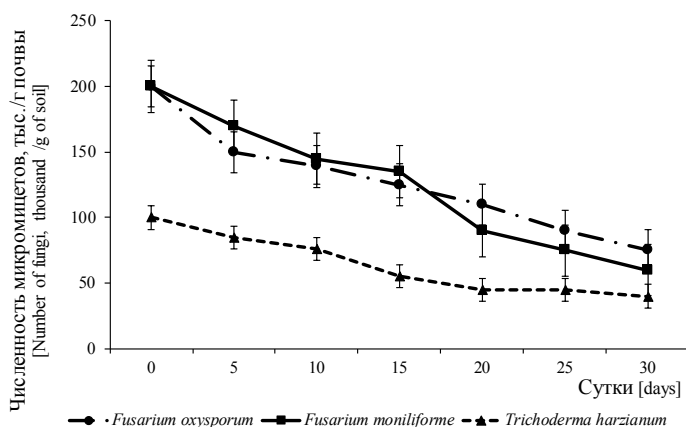


Рис. 2. Изменение численности фитопатогенных микромицетов р. *Fusarium* под воздействием антагониста *Trichoderma harzianum*
[Fig. 2. Changes in the number of *Fusarium* phytopathogenic micromycetes under the influence of *Trichoderma harzianum* antagonist]

Положительные результаты испытаний музейных культур микроорганизмов-антагонистов, полученные в опытах *in vitro*, дают основание полагать, что внесение этих антагонистов вместе с семенами хвойных в почвы лесных питомников позволит увеличить выход и улучшить качество посадочного материала.

Выводы

1. Установлено, что музейные культуры микроорганизмов обладали различной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным

грибам рода *Fusarium*. Микромицеты р. *Trichoderma* проявляли в 2–5 раз более высокую степень ингибирования (до 100%) роста патогенов, чем бактерии, демонстрировали неравномерный избирательный (видовой) гиперпаразитизм по отношению к патогенам, активно разрастаясь на поверхности колоний последних.

2. Способность к продуцированию литических ферментов у антагонистов различалась в зависимости от таксономической принадлежности: *T. harzianum* проявлял высокую активность всех трех ферментов, *T. lignorum*, *S. lateritius* – высокую липазную, *T. longibrachiatum* – эндохитиназную, *S. lateritius* – протеиназную активность. У *B. amyloliquefaciens* отмечали слабую хитиназную и протеиназную активность.

3. Исследуемые антагонисты обладали ростстимулирующей способностью (*in vitro*), что отразилось на прорастании семян сосны обыкновенной. Максимальную всхожесть семян сосны отмечали в варианте с *T. longibrachiatum*, а наибольшее количество проростков к концу эксперимента – в вариантах *S. lateritius*, *T. longibrachiatum* и *T. harzianum*, что превышало значения в контроле в 1,2–1,4 раза.

4. Внесение *T. harzianum* вместе с семенами сосны обыкновенной привело к уменьшению численности фитопатогенных грибов (р. *Fusarium*) в 2,7–3,3 раза.

Литература

1. Павлюшин В.А., Тютюрев С.Л., Попова Э.В. Новые комплексные биопрепараты для защиты овощных культур от грибных и бактериальных болезней // Биотехнология. 2010. № 4. С. 69–80.
2. Suprapta D.N. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens // J.ISSAAS. 2012. № 18 (2). PP. 1–8.
3. Yilmaz M., Soran H., Beyatli Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil // Microbiological research. 2006. № 161. PP. 127–131.
4. Krid S., Rhouma A. *Pseudomonas savastanoi* endophytic bacteria in olive tree and antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* // Journal of plant pathology. 2010. № 92. PP. 335–341.
5. Iasona G.R., Taylorb J., Helferb S. Community-based biotic effects as determinants of tree resistance to pests and pathogens // Forest Ecology and Management. 2018. № 417. PP. 301–312.
6. Яруллина Л.Г., Ахатова А.Р., Касимова Р.И. Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы в регуляции взаимоотношений растений с патогенами // Физиология растений. 2016. Т. 63, № 2. С. 205–217.
7. Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В. Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья // Известия Иркутского государственного университета. Сер. Науки о Земле / под ред. М.Ю. Дьякова. 2009. Т. 2, № 2. С. 162–166.
8. Богданова А.И., Титова Ю.А. Антагонистическая активность штаммов *Trichoderma asperellum* – продуцентов мультиконверсионных биопрепаратов // Вестник защиты растений. 2014. № 1. С. 48–52.

9. Barret M., Morrissey J.P., O’Gara F. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence // *Biol Fertil Soils*. 2011. № 47. PP. 729–743.
10. Regalado A.P., Pinheiro C., Vidal S. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds // *Planta*. 2000. № 210. PP. 543–550.
11. Cullimore J.V., Ranjeva R., Bono J.J. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes // *Trends Plant Sci*. 2001. № 6. PP. 24–30.
12. Montealegre J.R. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003. № 6 (2). PP. 115–127.
13. Асатурова А.М., Дубяга В.М. Отбор агентов биологического контроля для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза // *Научный журнал Кубанского государственного университета*. 2012. № 75. С. 824–835.
14. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. М. : Academia, 2005. 603 с.
15. Grodnitskaya I.D., Sorokin N.D. Application of microbes to the soils of Siberian tree nurseries // *Eurasian Soil Science*. 2007. Vol. 40, № 3. PP. 329–334.
16. Duffy B., Schouten A., Raijmakers J.M. Pathogen self-defense: mechanism to counteract microbial antagonism // *Annu. Rev. Phytopathol*. 2003. № 41. PP. 501–538.
17. De la Cruz-Quiroz R., Robledo-Padilla F., Aguilar C.N., Roussos S. Forced aeration influence on the production of spores by *Trichoderma* strains // *Waste Biomass Valor*. 2017. № 8. PP. 2263–2270.
18. Шеламова С.А., Тырсин Ю.А. Индукция биосинтеза липаз микромицетом // *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2012. № 1 (137). С. 172–176.
19. Литовка Ю.А., Савицкая А.Г., Рязанова Т.В. Видовой состав и фитотоксичные свойства микромицетов рода *Fusarium*, распространенных в лесных питомниках средней и южной Сибири // *Хвойные бореальной зоны*. 2011. № 3–4. С. 233–236.
20. Avramenko S.V., Galyntin V.A. Features of biosynthesis of chitinolytic enzymes by *Streptomyces griseus* var. *streptomycini* // *Applied biochemistry and microbiology*. 2010. № 4. PP. 405–408.
21. Bußwinkel F., Goni O., Cord-Landwehr S., O’Connell S., Moerschbacher B. Endochitinase 1 (Tv-ECH1) from *Trichoderma virens* has high subsite specificities for acetylated units when acting on chitosans // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. № 114. PP. 453–461.
22. Deng J.-J., Huang W.-Q., Lia Z.-W., Lua D.-L., Zhang Y., Luo X. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi // *Enzyme and Microbial Technology*. 2018. № 112. PP. 35–42.
23. Yakimenko E.E., Grodnitskaya I.D. Effect of *Trichoderma* fungi on soil micromycetes that cause infectious conifer seedling lodging in Siberian tree nurseries // *Microbiology*. 2000. Vol. 69, № 6. PP. 726–729.
24. Гродницкая И.Д., Кондакова О.Э., Терещенко Н.Н. Влияние микробов-антагонистов на биогенность почвы и сохранность сеянцев хвойных в искусственных фитоценозах // *Сибирский лесной журнал*. 2016. № 6. С. 13–25.

Поступила в редакцию 15.10.2017 г.; повторно 21.12.2017 г.;
принята 17.05.2018 г.; опубликована 15.06.2018 г.

Авторский коллектив:

Кондакова Оксана Эриковна – м.н.с., лаборатория микробиологии и экологической биотехнологии Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28).
E-mail: koeandkoe@mail.ru

Гродницкая Ирина Дмитриевна – д-р биол. наук, доцент, зав. лабораторией микробиологии и экологической биотехнологии Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28).

E-mail: igrod@ksc.krasn.ru

For citation: Kondakova OE, Grodnitskaya ID. Biological activity assessment of museum cultures of antagonist microorganisms and their use for presowing treatment of Scots pine seeds (*Pinus sylvestris* L.) *in vitro*. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2018;42:54-68. doi: 10.17223/19988591/42/3. In Russian, English Summary

Oksana E. Kondakova, Irina D. Grodnitskaya

VN Sukachev Forest Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Biological activity assessment of museum cultures of antagonist microorganisms and their use for presowing treatment of Scots pine seeds (*Pinus sylvestris* L.) *in vitro*

The microbiological method is applied for the purpose of artificial forest regeneration, as the most effective method of protecting forest planting material grown in forest nurseries. At present, literature data contain many examples of using species and genera of microorganisms belonging to different taxa in order to protect plants. The aim of the research was to establish biological (antagonistic, enzymatic and growth-stimulating) activity of the museum microorganism cultures belonging to different taxonomic groups (bacteria, fungi), and to assess their influence on the growth and development of Scots pine seeds *in vitro* and a decrease in the number of phytopathogenic fungi.

We isolated previously selected microorganisms from the nursery soils; these microorganisms belong to different taxonomic groups, namely, *Trichoderma* micromycetes (*T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, and *T. lignorum*), *Streptomyces lateritius* bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*, as well as phytopathogenic *Fusarium* fungi (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annulatum*, and *F. oxysporum* B3). Antagonistic activity of microbial strains was determined by the dual culture method, and the presence of enzymatic activity (lipase, proteinase and chitinase) of the tested strains was observed by qualitative express tests. We studied the growth-promoting activity by soaking pine seeds in aqueous suspensions of antagonists (10^6 spores/ml) (Pegalado, 2000; Cullimore, 2001; Montealegre, 2003; Asaturova, 2012).

The results of the research showed that the investigated microorganisms (fungi, actinobacteria and bacteria) are biologically active. The most powerful antagonists were micromycetes of *T. harzianum*, *T. lignorum*, and *T. longibrachiatum*, which are also capable of exhibiting mycophilic properties (hyperparasitism). Thus, *T. longibrachiatum* showed mycophilia against three strains: *F. moniliforme*, *F. moniliforme* var *annulatum*, and *F. oxysporum* B3, whereas *T. harzianum* and *T. lignorum* did against two: *F. moniliforme* and *F. proliferatum*; the degree of phytopathogen inhibition (ID) varied from 30 to 100% (See Table 1). The strain of *B. amyloliquefaciens* bacterium was less active, the DI was 41.4%, on the average, and the slowest antagonistic properties were exhibited by actinobacterium *S. lateritius* - 14.8%, on the average. The investigation of the presence of the main hydrolytic enzymes (a hitinaze, a lipase, protease) showed that *Trichoderma* micromycetes had the average and strong hydrolytic activity (*T. harzianum* and *T. longibrachiatum*), and bacteria (*S. lateritius*, *B. amyloliquefaciens*) had the average and weak hydrolytic activity (See Table 2). Also, all the investigated strains

improved Scots pine seed germination, while the strains of *B. amyloliquefaciens* and *T. longibrachiatum* showed the greatest growth-promoting activity (See Figures). Thus, we found that the investigated strains (*T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *S. lateritius*, and *B. amyloliquefaciens*) had a high antagonistic activity, and *Trichoderma* micromycetes revealed the ability for mycoparasitism. The high biological (enzymatic, antagonistic, growth-stimulating) activity of the studied strains of microorganisms makes them effective agents for biological control in forest nurseries.

The paper contains 2 Figures, 2 Tables and 24 References.

Keywords: phytopathogens; antagonistic and enzymatic activity; growth-promoting effect; *Trichoderma*; *Bacillus*; *Streptomyces*.

References

1. Pavlushin VA, Tyuterev SL, Popova EV, Novikova II. Novel complex biopreparations for plant protection from fungi- and bacteria-caused diseases. *Biotechnology in Russia*. 2010;4:47-63.
2. Suprapta DN. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. *J.ISSAAS*. 2012;18(2):1-8.
3. Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological research*. 2006;161(2):127-131. doi: [10.1016/j.micres.2005.07.001](https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.07.001)
4. Krid S, Rhouma A. *Pseudomonas savastanoi* endophytic bacteria in olive tree and antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Plant Pathology*. 2010;92:335-341. doi: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v92i2.174>
5. Iasona GR, Taylorb J, Helferb S. Community-based biotic effects as determinants of tree resistance to pests and pathogens. *Forest Ecology and Management*. 2018;417:301-312. doi: [10.1016/j.foreco.2018.01.037](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.01.037)
6. Yarullina LG, Achatova AR, Kasimona RI. Hydrolytic enzymes and their protein inhibitors in regulation of relationship of plants with pathogens. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2016;63(2):193-203. doi: [10.7868/S0015330316020159](https://doi.org/10.7868/S0015330316020159)
7. Radnagurueva AA, Lavrentieva EV. Extracellular protease activity in natural samples of hot springs of Pribaikalye. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya «Nauki o Zemle» – The Bulletin of Irkutsk State University. Series «Earth sciences»*. 2009;2:162-166. In Russian
8. Bogdanov AI, Titova YuA. Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* strains – multirecycling bioformulation producers. *Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News*. 2014;1:48-52. In Russian
9. Barret M, Morrissey JP, O’Gara F. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biol Fertil Soils*. 2011;47:729-743. doi: [10.1007/s00374-011-0605-x](https://doi.org/10.1007/s00374-011-0605-x)
10. Regalado AP, Pinheiro C, Vidal S. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta*. 2000;210:543-550. doi: [10.1007/s004250050043](https://doi.org/10.1007/s004250050043)
11. Cullimore JV, Ranjeva R, Bono JJ. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci*. 2001;6:24-30.
12. Montealegre JR. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003;6(2):115-127. doi: [10.2225 / vol6-issue2-fulltext-8](https://doi.org/10.2225/vol6-issue2-fulltext-8)
13. Asaturova AM, Dubyaga VM, Tomashevich NS, Zharnikova MD. Selection of perspective biological control agents for fall wheat protection from *Fusarium* diseases. *Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University*. 2012;75:824-835. In Russian

14. Netrusov AI, Egorova AI, Zacharchyk LM, Kolotilova NN. et al. Praktikum po mikrobiologii [Workshop on a mycology]. Netrusov AI, editor. Moscow: Academia Publ.; 2005. 603 p. In Russian
15. Grodnitskaya ID, Sorokin ND. Application of microbes to the soils of Siberian tree nurseries. *Eurasian Soil Science*. 2007;40(3):329-334. doi: [10.1134/S106422930703012X](https://doi.org/10.1134/S106422930703012X)
16. Duffy B, Schouten A, Raijmakers JM. Pathogen self-defense: mechanism to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003;41:501-538. doi: [10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606)
17. De la Cruz-Quiroz R, Robledo-Padilla F, Aguilar CN., Roussos S. Forced aeration influence on the production of spores by *Trichoderma* strains. *Waste Biomass Valor.* 2017;8:2263-2270. doi: [10.1007/s12649-017-0045-4](https://doi.org/10.1007/s12649-017-0045-4)
18. Shelamova SA, Tyrsin YuA. Induktsiya biosinteza lipaz mikromitsetom [Induction of biosynthesis of lipases by micromycetes]. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik Orenburg State University*. 2012;1(137):172-176. In Russian
19. Litovka YuA, Savitskaya AG, Ryazanova TV. Vidovoy sostav i fitotoksicheskiye svoystva mikromitsetov roda *Fusarium*, rasprostranennykh v lesnykh pitomnikakh sredney i yuzhnoy Sibiri [Specific structure and phytotoxic properties *Fusarium* species from forest nurseries in the Central and Southern Siberia]. *Conifers of the Boreal Zone*. 2011;29(3-4):233-237. In Russian
20. Avramenko SV, Galynkin VA. Features of biosynthesis of chitinolytic enzymes by *Streptomyces griseus* var. *streptomycini*. *Applied biochemistry and microbiology*. 2010;4:405-408. doi: [10.1134/S0003683810040071](https://doi.org/10.1134/S0003683810040071)
21. Bußwinkel F, Goni O, Cord-Landwehr S, O'Connell S, Moerschbacher B. Endochitinase I (Tv-ECH1) from *Trichoderma virens* has high subsite specificities for acetylated units when acting on chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;114:453-461. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.070>
22. Deng J-J, Huang W-Q, Lia Z-W, Lua D-L, Zhang Y, Luo X. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 2018;112:35-42. doi: [10.1016/j.enzmictec.2018.02.002](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.02.002)
23. Yakimenko EE, Grodnitskaya ID. Effect of *Trichoderma* fungi on the soil micromycetes that cause infectious conifer seedling lodging in siberian tree nurseries. *Microbiology*. 2000;69(6):850-854.
24. Grodnitskaya ID, Kondakova OE, Tereschenko NN. The influence of microbial antagonists on the soil biogenic and the coniferous seedlings safety in artificial phytocenoses. *Siberian Journal of Forest Science*. 2016;6:13-25. In Russian, English summary. doi: [10.15372/SJFS20160602](https://doi.org/10.15372/SJFS20160602)

Received 15 October 2017; Revised 21 December 2017;

Accepted 17 May 2018; Published 15 June 2018

Author info:

Kondakova Oksana E, Junior Researcher, Laboratory of Microbiology and Ecological Biotechnology, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: koeandkoe@mail.ru

Grodnitskaya Irina D, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Head of the Laboratory of Microbiology and Ecological Biotechnology, VN Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation.

E-mail: igrod@ksc.krasn.ru