УДК 579.852

Л.Ф. Миңнуллина,
Г.Ф. Һадиева

БИОПРЕПАРАТЛАР БУЛАРАК КУЛЛАНЫРГА ЯРАКЛЫ ЯҢА *BACILLUS SUBTILIS* ШТАММНАРЫ

В данной работе была исследована фунгицидная активность бактерий рода *Bacillus*, выделенных из ризосферы картофеля. Изоляты бактерий идентифицированы как новые штаммы *Bacillus subtilis* по гомологии гена 16S рРНК и обозначены как *B. subtilis* GM2 и *B. subtilis* GM5. Штаммы охарактеризовали по их способности ингибировать рост фитопатогенных грибов родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum* и *Doratchomyces*. Показано, что штамм *B. subtilis* GM5 ингибирует рост микромицетов эффективнее, чем штамм GM2. *B. subtilis* GM5 является потенциальным агентом биоконтроля и может быть использован в качестве биопрепарата против фитопатогенов сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: ризосфера, *Bacillus subtilis*, фитопатогены, антагонизм.

Соңгы дистә елда үсемлек һәм микроорганизмнар берләшмәләрен өйрәнүгә багышланган тикшеренүләр саны арта бара. Мондый берләшмәләр үсемлекләрнең үсешен һәм сәламәтлеген саклауда мөһим роль уйный, ә бу исә тотрыксыз табигый шартларда авыл хуҗалыгы культураларыннан стабиль уңыш алырга мөмкинлек бирә. Шулай да, әлеге мәсьәлә интенсив рәвештә өйрәнелүгә карамастан, үсемлекләр һәм микрофлора мөнәсәбәтләренең күпчелек яклары бүгенге көнгәчә ачыкланып бетмәгән [Farrar *et al.*, 2014].

Үсемлекнең тамыры белән бәйләнештә торган туфрак катламы ризосфера дип атала, ә бу катламда яшәүче бактерияләр ризосфера микроорганизмнары яисә ризобактерияләр дигән исем йөртә [Dobbelaere *et al.*, 2003]. Әлеге микроорганизмнарның үсемлек тамырлары белән бәйләнешкә керүе үсемлекләрнең продуктлылыгын билгеләүдә төп фактор булып тора [Choudhary, Johri, 2009; Khan *et.al.,* 2015]. Үсемлекләр өчен файдалы үзлекләргә ия бактерияләрне бүгенге көндә PGPR (*инглиз.* plant growth-promoting *Rhizobacteria* – үсемлекләргә үсәргә булышучы ризобактерияләр) дип атау гамәлгә кергән. Авыл хуҗалыгы өчен мөһим сыйфатларга ия булганлыктан, PGPR бактерияләре киң катлам тикшеренүчеләрнең игътибарын җәлеп итә. Моның төп сәбәбе булып әйләнә-тирәне саклау максатыннан химик ашламалар куллануны киметү тенденциясе һәм шул шартларда игенчелекне үстерү проблемасы тора.

PGPR бактерияләренең үсемлекләр дөньясы өчен файдалы төп үзлеге – үсемлекләрнең үсеш тизлеген һәм продуктлылыгын арттыру [Ngoma *et.al.,* 2012].

PGPR төркеменә төрле ыру вәкилләре керә ала, әмма күпчелекне *Bacillus* һәм *Pseudomonas* ыруларына караган бактерияләр тәшкил итә [Podile, Kishore, 2006]. Ризобактерияләр һавадагы азотны бәйләргә, сидерофорлар, антибиотиклар һәм глюканаза, амилаза, целлюлаза, пектиназа, протеаза, липаза, хитиназа кебек гидролитик ферментлар бүлеп чыгарырга сәләтле. Әлеге матдәләрнең берәүләре фитопатоген гөмбәләрнең күзәнәк тышчасын тарката алса, башкалары фосфор, калий, цинк кушылмаларының эрүчәнлеген арттырып, аларны үсемлекләр үзләштерә алырлык халәткә китерә һәм шуның белән аларның минераль матдәләр белән тәэмин ителешен яхшырта. Моннан тыш, фитогормоннар һәм ферментлар синтезлап, ризобактерияләр тамыр системасының үсешен яхшырта һәм ризобиум-микориза симбиозлары барлыкка килүгә арадашлык итә ала [Vacheron *et al*., 2013].

Фитопатоген микроорганизмнар, азык-төлек җитештерүгә генә түгел, экосистемаларның тотрыклылыгына да куркыныч янаучы төп факторларның берсе булып тора [Wu *et al*., 2015]. Әлеге авырулар ел саен дөньяда җитештерелгән уңышның 25% ын юкка чыгара [Lugtenberg *et al*., 2015], бигрәк тә җиләк-җимеш, яшелчә, эфир майлары культураларын җитештерүче хуҗалыкларга зур зыян килә [Анисимов с соавт., 2009]. Татарстан Республикасы өчен мөһим азык-төлек культураларыннан саналган бәрәңге дә (*Solanum tuberosum*) күп төрле корткычлардан һәм авырулардан зарар күрә. Бәрәңге авыруларын китереп чыгаручы агентлар рәтенә вируслар, вироидлар, бактерияләр һәм микроскопик гөмбәләрне кертәләр [Асатурова с соавт., 2009]. Иң куркыныч гөмбә авыруларыннан түбәндәгеләр санала: бәрәңге фузариозы (кузгатучысы – *Fusarium solani*), ризоктониоз (кузг. – *Rhizoctonia solani*), көмешсыман парша (кузг. – *Helminthosporium solani*), бәрәңге фомозы (кузг. – *Phoma exigua*), бәрәңге фитофторозы (кузг. – *Phytophthora infestans*) һәм альтернариоз (кузг. – *Alternaria solani, Alternaria alternata*) [Анисимов с соавт., 2009]. Бәрәңге бактериозларына (ягъни бактерияләр китереп чыгара торган авыруларга) исә караяк (кузг. *Erwinia carotovora*), божрасыман черек (кузг. – *Clavibacter michiganensis*) һәм коңгырт черек (кузг. – *Ralstonia solanacearum*) керә [Морозкина с соавт., 2009]. Шуңа күрә бәрәңгенең теләсә кайсы яңа сорты бу патогеннарга карата күпмедер дәрәҗәдә чыдамлылыкка ия булырга тиеш [Лебедева, 2014].

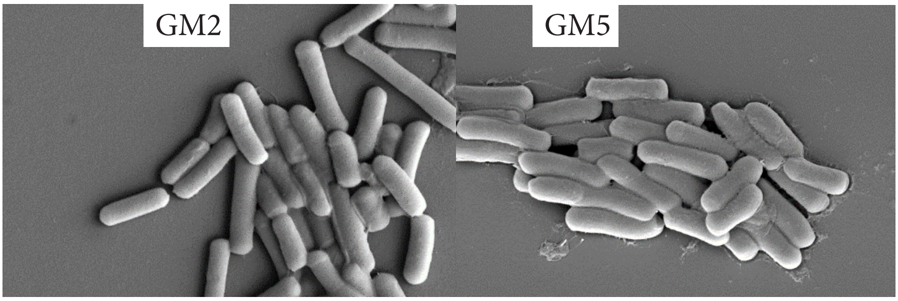
Әлеге авырулар белән көрәштә хуҗалыклар ярты гасырдан артык агрохимикатларны уңышлы файдаланган булса да [Schafer *et al*., 2015], тора-бара бу кушылмаларның тискәре тәэсире ачыклану, яңа, экологик яктан зарарсыз ысуллар эзләргә мәҗбүр итте. Шунлыктан XXI гасырда үсемлек авырулары белән көрәштә фитопатогеннарның табигый дошманнарын куллану тенденциясе көннән-көн арта һәм өлешчә пестицидларны

алыштыра бара [Qiao *et al.*, 2014]. Бу максаттан антагонист бактерияләрдән ясалган биопрепаратлар булдыру һәм кулланышка кертү – авыл хуҗалыгы биотехнологиясендә көн кадагында торган мәсьәләләрнең берсе. Әлеге күзлектән *Bacillus* ыруы бактерияләреннән ясалган биопрепаратлар иң өметлеләрдән санала [Borriss *et al.*, 2015; Kamilova *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2015], шуңа күрә безнең максатыбыз да Татарстан туфрагыннан бүлеп алынган *Bacillus* ыруы бактерияләреннән җирле фитопатогеннарга каршы актив штаммнар сайлап алу булды.

Бәрәңге ризосферасыннан *Bacillus* ыруына караган аэроб, грам-уңай, эндоспоралар хасил итәргә сәләтле һәм черек гөмбәләренә карата югары активлык күрсәткән ике штамм бүлеп алынды. Аларга GM2 и GM5 дигән шартлы исем бирелде. Әлеге бактерияләрнең нинди төргә каравын билгеләү өчен, аларның 16S рРНК гены секвенлаштырылды. Геннарның нуклеотидлар эзлеклелеген анализлау, GM2 изолятының *B. subtilis* JCM 1465 штаммына (99%), ә GM5 изолятының *B. subtilis* 168 штаммына (98%) якын торуын күрсәтте. Шул рәвешле, секвенлаштыру нәтиҗәләренә таянып, бу бактериаль изолятлар *B. subtilis* төренең яңа штаммнарына тиңләштерелде.

Сканлаучы электрон микроскоп ярдәмендә *B. subtilis* GM2 һәм GM5 бактерияләренең морфологиясе өйрәнелде. 1 нче рәсемнән күренгәнчә, әлеге штаммнарның күзәнәкләре башлары түгәрәкләнгән таякчыклардан гыйбарәт. Һәр ике штаммның да морфологиясе тиңдәш һәм бары күзәнәк зурлыгы белән генә аерыла: *B. subtilis* GM5 штаммының күзәнәкләре эрерәк, озынлыкка – 1,80–2,50 мкм, киңлеккә 0,63–0,72 мкм тәшкил итә. *B. subtilis* GM2 штаммы өчен 1,61–2,50 мкм (озынлыгы) һәм 0,52–0,61 мкм (киңлеге) күрсәткечләре хас.

B. subtilis GM2 һәм GM5 штаммнарының фунгистатик (ягъни микроскопик гөмбәләр үсешен тоткарлау) үзлеген билгеләүдә агар блоклары ысулы кулланылды. Антагонистик активлык дәрәҗәсе бактерияләр белән бергә үскән микромицетларның,

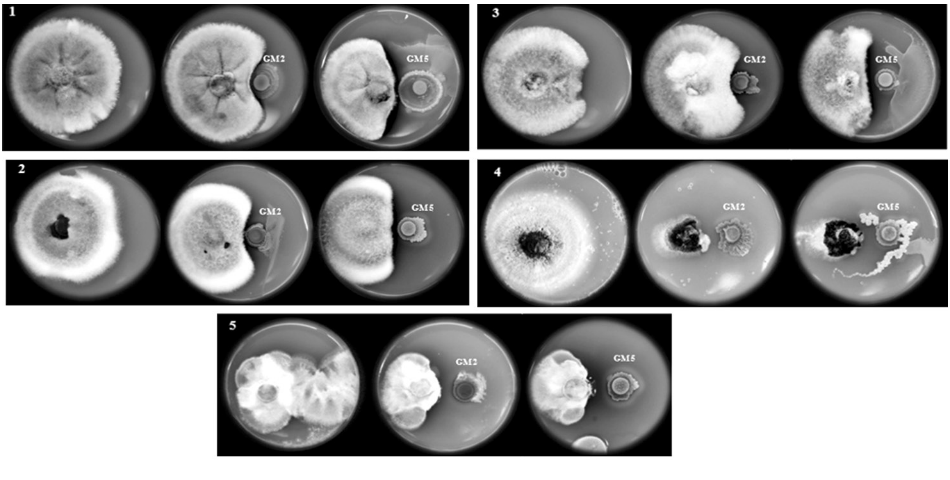


1 нче рәсем. *B. subtilis* GM2 һәм GM5 бактерияләренең морфологиясе (Merlin Zeiss сканлаучы электрон микроскобы)

контроль вариант (микромицет үзе генә) белән чагыштырганда, үсеше тоткарлану буенча билгеләнде. *B. subtilis* GM2 һәм *B. subtilis* GM5 штаммнары барлык кулланылган фитопатоген микромицетларга карата да антагонистик активлык күрсәтте. Бу гөмбәләргә түбәндәгеләр керде: *Fusarium avenaceum, Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens, Fusarium solani, Alternaria alternate* ТП 712, *Alternaria solani* 12РКЛ15, *Alternaria tenuissima*, шулай ук *Doratchomyces sp.* 14 raKKLD һәм *Colletotrichum coccodes* 14raKK6 (2 нче рәс.).

1 нче таблицада *B. subtilis* штаммнарының тәҗрибәнең 7нче тәүлегенә микромицетлар үсешен никадәр тоткарлавы күрсәтелгән. Ике штамм да иң күбе *Doratchomyces sp.* 14 raKKLD (GM2 – 72% һәм GM5 – 79%) һәм *C. coccodes* 14raKK6 (GM2 – 53% һәм GM5 – 63%) микромицетларына тәэсир иткән. Шулай да антагонистик эффектын ныграк күрсәткән штамм *B. subtilis* GM5 икәнлеге аңлашыла. Әйтик, GM5 штаммы *A. alternate* ТП 712, *F. avenaceum, F. redolens* гөмбәләренең үсешен 72%, 66% һәм 65% ка тоткарласа, GM2 штаммы шул ук микромицетларның үсешен 48%, 54% һәм 55% ка киметә.

Шулай итеп, бәрәңге ризосферасыннан фитопатоген гөмбәләрнең үсешен тоткарларга сәләтле яңа *B. subtilis* штаммнары бүлеп алынды. Әлеге изолятларның үзлекләрен өйрәнү, *B. subtilis* GM5 штаммының фитопатогеннарга каршы биопрепарат буларак кулланылырга яраклы икәнлеген күрсәтте.



2 нче рәсем. *B. subtilis* GM2 һәм GM5 бактерияләренең фитопатоген микромицетларга тәэсире: 1 – *A. alternate* ТП 712, 2 – *A. solani* 12РКЛ15, 3 – *A. tenuissima*, 4 – *C. coccodes* 14raKK6, 5 – *Doratomyces sp.* Сулдан беренче – контроль (бактерияләрдән башка үскән) гөмбәләр

1 нче таблица.

B. subtilis GM2 һәм GM5 штаммнарының микромицетлар үсешен тоткарлавы

№	Микромицетлар	7 тәүлектә үсешне тоткарлау, %	
		B. subtilis GM 2	*B. subtilis* GM 5
1.	*A. alternate* ТП 712	48,5±2,5	72,7±3,1
2.	*A. solani* 12РКЛ15	45,5±2,2	51,5±2,4
3.	*A. tenuissima*	45,7±2,2	60,0±2,7
4.	*C. coccodes* 14raKK6	53,3±2,8	63,3±2,9
5.	*Doratomyces sp.* 14 raKKLD	72,4±3,1	79,3±3,4
7.	*F. avenaceum*	54,8±2,6	66,7±3,0
8.	*F. oxysporum*	43,2±1,9	54,1±2,3
9.	*F. redolens*	55,3±2,3	65,8±2,9
10.	*F. solani*	44,2±2,0	58,1±2,7

Әдәбият

Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М.: Издательский дом Ивана Корытова, 2009. 272 с.

Асатурова А.М. Перспективные штаммы бактерий – продуценты микробиопрепаратов для снижения вредоносности фузариоза на подсолнечнике: автореф. дис. … канд. биол. наук // Всерос. НИИ защиты растений. СПб., 2009. 22 с.

Лебедева В.А., Гаджиев Н.М. Экспериментальная полиплоидия и инцухт в селекции картофеля на высокую продуктивность и качество клубней // Защита картофеля. 2014. Т. 1. С. 15–16.

Borriss R. «*Bacillus*, a plant beneficial bacterium» in Principles of plant-microbe interactions. Microbes for sustainable agriculture. Berlin: Springer, 2015. V. 24. P. 379–391.

Choudhary D.K., Johri B.N. Interactions of *Bacillus spp.* and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR) // Microbiol. Research. 2009. V. 164. P. 493–513.

Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere // CRC Crit. Rev. Plant Sci. 2003. V. 22. P. 107–149.

Farrar K., Bryant D., Cope-Selby N. Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops // Plant Biotechnol. J. 2014. V. 12, No. 9. P. 1193–1206.

Kamilova F., Okon Y., Weert S., etc. "Commercialization of microbes: manufacturing, inoculation, best practice for objective field testing, and registration", in Principles of plant-microbe interactions. Microbes for sustainable agriculture. Berlin: Springer. 2015. V. 40. P. 319–327.

Khan M., Sessitsch A., Harris M., etc. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils // Front. Plant. Sci. 2015. V. 5, No. 755. P. 1–9.

Lugtenberg B.J. «Introduction to plant-microbe-interactions», in Principles of plant-microbe interactions. Microbes for sustainable agriculture. Berlin: Springer. 2015. V. 40. P. 1–2.

Mora I., Cabrefiga J., Montesinos E. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria // PLoS One. 2015. V. 10., No. 5. P. 1–21.

Ngoma L., Babalola O., Ahmad F. Ecophysiology of plant growth promoting bacteria // Scientific Research and Essays. 2015. V. 7, No. 47. P. 4003–4013.

Podile A.R., Kishore G.K. Plant growth-promoting rhizobacteria. Springer, Netherlands. 2006. V. 8. P. 195–230.

Qiao J., Wu H., Huo R., etc. Stimulation and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action // Chem. Biol. Technol. Agric. 2014. V. 9. P. 1–14.

Schäfer T., Adams T. «The importance of microbiology in sustainable agriculture», in Principles of plant-microbe interactions. Microbes for sustainable agriculture. Berlin: Springer. 2015. V.9. P. 5–7.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M., etc. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning // Front. Plant Sci. 2013. V. 57. P. 1–19.

Wu L., Wu H.J., Qiao J., etc. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1–13.

Тикшеренү эше Казан (Идел буе) федераль университетенның дөньякүләм әйдәп баручы фәнни-белем бирү үзәкләре арасында көндәшлек сәләтен арттыруга юнәлтелгән Дәүләт программасы кысаларында тормышка ашырылды.

Мәкалә «2014–2020 елларга Татарстан Республикасы дәүләт телләрен һәм Татарстан Республикасында башка телләрне саклау, өйрәнү һәм үстерү» Дәүләт программасының 3.5.4. номерлы чарасын тормышка ашыру кысаларында нәшер итедә

Миңнуллина Ләйлә Фәрваз кызы*,*
Казан федераль университеты аспиранты, Фундаменталь медицина һәм биология институтының кече гыйльми хезмәткәре

Һадиева Гүзәл Фәнис кызы*,*
Казан федераль университеты магистранты, Фундаменталь медицина һәм биология институтының лаборант-тикшеренүчесе