

УДК 616-022.7.

М.А. Туралиева*, А.А. Ешибаев

Южно-Казахстанский Государственный Университет имени М.Ауезова, Шымкент, Казахстан,

*e-mail: nazanovamoldir@mail.ru

Молекулярно-генетическая идентификация штамма бактерии-антагониста против возбудителя болезни ствола *Ulmuspumila* L.

В настоящее время поиск новых штаммов бактерии-антагонистов фитопатогенных грибов, адаптированных к конкретным почвенно-климатическим условиям, остается актуальным исследованием. Из 22 почвенных образцов Южного Казахстана выделено 112 штаммов бактерий *Bacillus thuringiensis*, которые способны ингибировать рост фитопатогенного гриба *Fusarium solani*, возбудителя болезни ствола *Ulmuspumila* L. Из них выделен и молекулярно-генетическим методом идентифицирован высокоэффективный штамм *4ant*, который, кроме *F. solani*, также ингибирует рост ряда фитопатогенов как *F. oxysporum*, *Mucorcircinelloides f. circinelloides*, *Rhizoctonia solani*. Широкий спектр антагонистических свойств штамма *Bacillus thuringiensis 4ant* обосновывает его практическую ценность как полезного агента в биологической борьбе с заболеваниями дендрофлоры юга Казахстана.

Ключевые слова: Антагонист микроорганизм, *Bacillus thuringiensis*, фитопатогенные грибы, 16SrRNA.

М.А. Туралиева, А.А. Ешибаев

Ulmuspumila L. дінінің ауру тудырғышына қарсы антагонист-бактериялардың молекулярлы-генетикалық идентификациясы

Қазіргі таңда, нақты бір елді мекеннің топырақты-климаттық жағдайларына бейімделген фитопатогенді саңырауқұлақтарға қарсы жаңа антагонист-бактерияларды анықтау өзекті мәселе болып отыр. Оңтүстік Қазақстанның 22 түрлі топырақ үлгілерінен, *Ulmuspumila* L. ағаш дінінің ауруын қоздыратын *Fusarium solani* фитопатогеніне қарсы 112 *Bacillus thuringiensis* бактерия штаммдары бөлініп алынды. Оның ішінде *F. solani* фитопатогенімен қатар, *F. oxysporum*, *Mucorcircinelloides f. circinelloides*, *Rhizoctonia solani* секілді саңырауқұлақтардың да өсуін тежейтін жоғары тиімділікке ие *4ant* штаммы бөлінді және молекулярлы-генетикалық әдіспен идентификацияланды. *Bacillus thuringiensis 4ant* штаммының антагонистік қасиетінің кең спектрі Қазақстанның оңтүстік өңіріндегі дендрофлора ауруларына қарсы пайдалы биологиялық агент ретінде қолданылуымен дәлелденеді.

Түйін сөздер: Антагонист микроорганизм, *Bacillus thuringiensis*, фитопатогенді саңырауқұлақтар, 16SrRNA.

М.А. Turaliyeva, A.A. Yeshibaev

Molecular-genetic identification of antagonist bacteria strain of *Ulmuspumila* L.

Searching of new strains of antagonist bacteria of phytopathogenic fungi, adapted to the specific soil and climatic conditions, is still remaining as one of the actual researches at the moment. 112 strains of *Bacillus thuringiensis* bacteria were extracted from 22 soil samples of southern Kazakhstan, which can inhibit the growth of phytopathogenic fungus *Fusarium solani*, the causative agent of stem disease of *Ulmuspumila* L. The highly effective strain *4ant* was isolated and identified by molecular-genetic method among them, which apart from *F. solani* also inhibits the growth of many pathogenic fungi such as *F. oxysporum*, *Mucorcircinelloides f. circinelloides*, *Rhizoctonia solani*. A wide range of antagonistic properties of *Bacillus thuringiensis 4ant* strain justifies its practical value as useful agent in biological control of diseases of South Kazakhstan's dendroflora.

Keywords: Antagonist microorganism, *Bacillus thuringiensis*, phytopathogenic fungi, 16SrRNA.

Зеленые насаждения - один из главных факторов оздоровления городских экосистем, обеспечивающий комфорт и эстетические качества среды обитания человека. Но с ростом техногенной нагрузки в современном мегаполисе состояние дендрофлоры сильно ухудшается, растет уровень заболеваемости деревьев

инфекционными болезнями [1]. Ильмовые (*Ulmaceae*) являются важным компонентом агроландшафтов, в условиях же сухой степи и полупустыни - это главная порода для защитного лесоразведения, так как на долю различных видов этого рода приходится около 70 % существующих защитных лесных насаждений [2].

Разведение ильмовых сопряжено с рядом проблем, связанных с развитием некоторых, особо опасных для данного семейства заболеваний [3-5]. К примеру, в начале прошлого века, в европейских странах от голландской болезни погибло более 80% древостоя вязов. В это же время в европейской части России из-за голландской болезни отмечалось массовое усыхание посадок вяза гладкого и бересты. Возбудитель данного заболевания - грибы, представители рода *Ophiostoma* [6,7]. В тот период было установлено, что среди ильмовых вяз мелколистный (*Ulmuspumila*L.) наиболее устойчив к этому заболеванию [8-10]. Однако он в сильной степени поражается бактериозом сосудистых тканей и некрозно-раковыми заболеваниями [11]. Также, Г.Линдеманом была отмечена существенная вредоносность мокрой бактериозной гнили ствола вяза мелколистного в условиях полупустынной зоны За-волжья [12].

Наши исследования связаны с поиском эффективных штаммов микроорганизмов-антагонистов возбудителя болезни ствола вяза мелколистного в условиях аридного климата юга Казахстана. По данным имеющейся литературы, одним из возбудителей этого заболевания *U.pumila* в регионе является фитопатогенный гриб *Fusarium solani*, который поражает проводящую систему и свежую заболонь ствола деревьев, нарушая их функцию. Ежегодное наложение пораженных слоев флоэмы образует раковую опухоль различных размеров [13]. Массовое развитие *F.solani* в древостоях вяза мелколистного в Южном Казахстане в первую очередь связано с инвазией ряда чужеродных вредителей-ксилофагов в регион. По данным исследователей, эти вредители в большей степени повреждают именно вяз мелколистный и являются основными переносчиками спор фитопатогенного гриба. На поврежденных вредителями и пораженных патогеном частях стволов развивается вторичная микрофлора, вызывающая процесс гниения, что вкуче с выше приведенными факторами приводит к полной гибели дерева.

В условиях экологизации процесса защиты растений приоритет отдается биологическим методам борьбы, основанной на использовании явления микробного антагонизма. Применение биологических препаратов в борьбе с возбудителями болезней дендрофлоры –

перспективная альтернатива химическим средствам борьбы с ними в городской экосистеме. В настоящее время, несмотря на большое количество уже существующих биопрепаратов, поиск новых штаммов антагонистов, адаптированных к конкретным почвенно-климатическим условиям, остается актуальным исследованием [14]. Также важно, чтобы идеальный противогрибковый агент, обладающий фунгицидным действием, являлся нетоксичным для теплокровных животных. Поэтому, выделение и идентификация противогрибковых штаммов микроорганизмов-антагонистов вызывает все больше интереса. В связи с этим, целью наших исследований являлись выявление и молекулярно-генетическая идентификация штаммов бактерий-антагонистов фитопатогенного гриба *F.solani*.

Материалы и методы

Объектом исследования являлся штамм *4ant* бактерии рода *Bacillus*, выделенный из почвенных образцов, отобранных в семи районах Южно-Казахстанской области. Для оценки антагонистической активности бактерий были использованы чистые культуры грибных фитопатогенов *F.solani*, *Microdochium nivale*, *Fusarium oxysporum*, *Mucorcircinelloides f. circinelloides*, *Rhizoctonia solani*.

Бактериальные клетки были высеваны в 250-мл колбах, содержащих 40 мл среды для посева, и культивированы с ротационным шейкером за 250 об/мин в течение 12 ч., при температуре 28 °С. Чистые культуры штаммов были выращены на среде Чапека.

Высев из почвенной суспензии осуществляли на поверхность агаризованной среды соответствующего состава, предварительно засеянной конидиями штамма грибов *F.solani*. Культивирование проводили в термостате при температуре плюс 28°С в течение двух недель. В процессе культивирования отмечали бактериальные колонии, вокруг которых наблюдалась зона отсутствия роста гриба. Проверку антагонистической активности выделенных изолятов проводили методом перпендикулярных штрихов.

Условия амплификации и ПЦР-диагностика. Штамм *4ant* бактерий-антагонистов были идентифицированы при использовании генного анализа последовательности 16S рибосомной РНК (рРНК). Геномная ДНК была извлечена из

штамма *4ant Bacillus thuringiensis* как матрица для ПЦР. Чтобы определить последовательность 16S рНК, геномная ДНК была выращена методом СТАВ/NaCl Ausubel. Манипуляции ДНК для клонирования, преобразования, выращивания плазмиды, лигатура и электрофорез были выполнены согласно методу, описанному Самбруком. Последовательности 20 п.н. олигонуклеотидных праймеров, разработанных для амплификации маркеров *4ant* являются: 8f5' - AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R-5'ggACTACCaggTATCTAAT. Каждая пара праймеров использовалась в реакциях ПЦР как описано выше, со следующими модификациями: смеси ПЦР были денатурированы при температуре 95°C в течение 5 минут. Бактерии были идентифицированы на основе сходства последовательности к гомологическим генным фрагментам 16 рНК в базе данных Ribosomal Database Project database.

Результаты и обсуждение

В лабораторных исследованиях из 22 образцов почвы Южного Казахстана было выделено 112 штаммов бактерии рода *Bacillus*.

По результатам предварительных исследований, эффективным антагонистом фитопатогена *F. Solani* признан штамм *4ant*.

Идентификация штамма *4ant*. Фрагмент 16 рНК генной последовательности исследуемого штамма, амплифицированного с помощью ПЦР, сравнивали со стандартной последовательностью генов 16 рНК других бактерий по базе данных программы BLAST NCBI. Как показали результаты исследований, частичная последовательность генов 16S рНК исследуемого штамма и бактерий *B. thuringiensis* оказались полностью идентичными. Таким образом, объект нашего исследования был идентифицирован как новый штамм бактерий *B. thuringiensis*. Следующим шагом стало более детальное изучение его антагонистической способности к различным видам фитопатогенных грибов.

Антагонистическая способность штамма *4ant*. Было установлено, что штамм *4ant* обладает высокой ингибирующей активностью против ряда фитопатогенов – *F. solani*, *Microdochium nivale*, *Fusarium oxysporum*, *Mucorcircinelloides f. circinelloides*, *Rhizoctonia solani* (таблица 1).

Таблица 1 – Противомикробные действия супернатанта, не содержащего клеток, из *B. thuringiensis 4ant* по отношению к бактериям индикатора:

Штаммы-индикаторы	Температура инкубации	Антагонистическая активность
<i>Fusarium solani</i>	27 °C	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	25 °C	+
<i>Microdochium nivale</i>	25 °C	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	30 °C	+
<i>Mucorcircinelloides f. circinelloides</i>	27 °C	+
Зоны ингибирования: +, ≥4mm; ++, ≥8mm		

Молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов сегодня является общепризнанным и современным методом, который обеспечивает высокую точность результатов таксономических анализов. Ген 16S рНК, на основе которого был идентифицирован штамм *4ant*, является широко используемым генетическим маркером при изучении бактериальной филогении. Как было сказано выше, идентифицированный нами штамм бактерий *B. thuringiensis 4ant* в модельных опытах показал высокую

фунгицидную способность, что обосновывает его практическую ценность.

Выделенный из почвенных образцов новый штамм бактерии, идентифицированный как *B. thuringiensis 4ant*, является эффективным антагонистом возбудителя болезни ствола *Ulmuspumila* L.-*Fusarium solani*. Также выявлено, что этот штамм бактерии способен ингибировать рост ряда микромицетов-фитопатогенов как *F. oxysporum*, *M. circinelloides f. circinelloides*. Широкий спектр антагонистических свойств этого штамма обосновывает его практическую

ценность как полезного агента в биологической борьбе с заболеваниями дендрофлоры юга Казахстана. В настоящее время испытания

B.thuringiensis 4ant продолжаются в полевых экспериментах.

Литература

1. Громовых Т.И., Ю.А. Литовка, О.Н. Андреева, С.В. Прудникова и Т.А. Корянова, Возбудители фузариоза в питомниках Красноярского края // Лесоведение – 2002.- № 6. - С. 68-71.
2. Богун А.П. Пути повышения устойчивости вязовых насаждений сухой степи на светло-каштановых почвах Ергеней. - канд. биол. наук. - ВГУ., Волгоград. 1990.-160с.3. Князева Л.А. Защитное лесоразведение в сухой степи Западного Казахстана. - М.: Наука, 1975. – 160с.
4. Душков В.Ю. Опыт восстановления усыхающих насаждений вяза мелколистного на темноцветных почвах палин // Лесоведение. - 1981. №6. – С. 51-58.
5. Подковыров И.Ю. Фенотипическая изменчивость плодоношения вяза гладкого в условиях засушливого климата // Международный журнал ботанических садов: HortusBotanicus. - 2001, - Т. 1, № 5. – С. 108-111.
6. Федорова С.М. Проблемы озеленения крупных городов. – М.: С.М. Федорова, 2010. - 72-77с.
7. Дорофеева Т.Б., Тюппина Г.Н. Графизм ильмовых в Санкт-Петербурге и меры борьбы с ним // Экология большого города. – 2002, № 6. – С. 57-61.
8. Дудина В.С. Голландская болезнь ильмовых пород. – М.: Наука, 1938. – 80с.
9. Зудилин В.А., Голландская болезнь ильмовых, биология её возбудителя и обоснование мер борьбы. - канд. биол. наук. - МГУ, Москва. 1971. – 87с.
10. Щербин-Парфененко А.Л. Раковые и сосудистые болезни лиственных пород. – М.: Наука, 1953. – 90с.
11. Федунова Г.В. Бактериоз ильмовых в-агроресомелиоративных насаждениях Нижнего Поволжья и меры борьбы с ним. - канд. биол. наук. - МГУ, Москва. 1994. – 93с.
12. Линдеман Г.В. Мокрый бактериоз ствола вяза мелколистного в культурах на юго-востоке Европейской России // Лесоведение. - 2008, №1. – С. 23-33.
13. Серікбай Л.А. Шымкент қаласы дендрофлорасының фитосанитарлық жағдайын бағалау // Республиканская конференция студентов. - 2011, Т.6, - С. 23-31.
14. Нуртазаев Н.Б., Алеуова С.С. Результаты исследования биологии развития вредителей *Monochamus urussovi* и *Xanthogalerucaluteola* // Научные труды Международной научно-практической конференции: Проблемы современного образования и науки. - 2010. Т.5, - С. 439-443.