

УДК 581.198; 579.64

О. Н. Рева, канд. биол. наук., ст. науч. сотр.
Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
НАН Украины, отд. антибиотиков,
ул. Заболотного, 154, Д03680, г. Киев ГСП, Украина,
e-mail reva@serv.inv.kiev.ua

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.) СПОРАМИ *BACILLUS* НА ПОРАЖАЕМОСТЬ ЛИСТОБЛОШКОЙ *PHYLLOTRETA* SP.

Биологические препараты защиты растений находят широкое применение во всем мире для профилактики заболеваний, вызванных фитопатогенными бактериями и грибами. В основе биопрепаратов используются живые культуры штаммов-антагонистов, в частности представители рода *Bacillus*. Применение препаратов живых культур рассматривается как экологически безопасная альтернатива использованию химических пестицидов. В то же время взаимодействие бактерий-антагонистов с растениями изучено далеко не в полной мере, что не исключает возможность проявления неожиданных побочных эффектов от применения биопрепаратов, которые могут ослабить или свести на нет ожидаемый положительный эффект. В данной работе показано, что обработка семян и ростков рапса суспензией спор ряда штаммов *Bacillus* приводит к повышенной поражаемости растений листоблошкой *Phyllotreta* sp., тогда как другие штаммы повышают устойчивость растения к данному вредителю. Рассмотрены возможные причины явления, обусловленные особенностями механизмов системной устойчивости растения. Предложены пути предотвращения побочных эффектов от применения биопрепаратов на основе *Bacillus*.

Ключевые слова: рапс, биопрепарат, *Bacillus*, системная устойчивость, листоблошка.

Бактерии-антагонисты рода *Bacillus* широко используются в сельскохозяйственной практике для защиты растений от заболеваний, вызванных фитопатогенными грибами и микроорганизмами. Экологически безопасные биопрепараты на основе живых культур микроорганизмов рассматриваются во всем мире как возможная альтернатива повсеместному применению химических препаратов, хотя эффективность современных биопрепаратов все еще недостаточна для конкуренции с пестицидами. Путь к повышению эффективности биопрепаратов лежит в совершенствовании схем их применения в полевых условиях. В частности, пока еще мало изучено опосредованное влияние применения живых культур микроорганизмов на устойчивость растений к насекомым-вредителям.

Биопрепараты на основе живых культур-антагонистов не только подавляют рост фитопатогенной микрофлоры, но и стимулируют

защитные механизмы самого растения. В ответ на бактериальную обсемененность или инвазию насекомых-вредителей в растении вырабатываются несколько типов химических медиаторов. Медиаторы запускают синтез веществ, обуславливающих системную устойчивость к вредителям и патогенам. Медиаторами у растений выступают салициловая кислота, ясмоновая кислота и газ этилен эндогенного происхождения. Обработка растений безвредными эндофитными и сапрофитными бактериями запускает синтез медиаторов системной устойчивости, что приводит к повышению устойчивости растения к фитопатогенам, а также влияет на устойчивость к насекомым-вредителям. Из литературных источников известны факты как позитивного, так и негативного опосредованного влияния обработки растений сапрофитными и фитопатогенными бактериями и грибами на устойчивость к насекомым-вредителям [1–3].

Цель данной работы состояла в изучении влияния обработки растений спорами штаммов-антагонистов рода *Bacillus*, перспективных для использования в биопрепаратах, на поражаемость растений насекомыми-вредителями в полевых условиях.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 5 штаммов видов *B. subtilis* (УКМ Б-5049, 5137 и 5S) и *B. amyloliquefaciens* (УКМ Б-5017 и 5113) из Украинской коллекции микроорганизмов. Для получения спор культуры выращивались на жидкой питательной среде LB (Oxoid) в течение 3-х суток на качалке при 37°C. Из культуральной жидкости споры осаждались центрифугированием. Затем готовили суспензию спор ≈500 тыс. КОЕ/мл в стерильном физиологическом растворе. Титр КОЕ суспензии сохранялся постоянным в течение месяца хранения в холодильнике при 4°C.

В качестве модельного растения использовали рапс масличный (*Brassica napus* L.). Семена рапса обрабатывали в течение 20 мин 10%-м раствором NaHClO_4 , промывали 70%-м этанолом и дистиллированной водой, после чего замачивали на 2 ч в суспензии спор *Bacillus*, или в стерильной воде для контроля, как было описано ранее [4]. Семена высевали в пластиковые горшочки с компостом, который предварительно дважды стерилизовали автоклавированием при 120°C, 1,5 атм. Проростки выращивали в течение 2 недель в теплице, затем на подносах выносили в поле на четверо суток. За трое суток до выноса в поле листья группы проростков рапса вновь обрабатывали суспензиями спор с помощью ватного тампона, или стерильной водой в контроле. Таким образом, изучали следующие группы растений: выросшие из семян, обработанных суспензиями спор разных штаммов; растения, у которых суспензиями спор обрабатывали листья; растения с обработанными семенами и листьями; контрольные растения, в том числе и такие, листья которых были обработаны стерильной водой. В каждой экспериментальной группе

было по 6 растений, в контроле — 18. Эксперимент проводили во время лёта листоблошки *Phyllotreta* sp. (вторая половина мая — начало июня, в зависимости от погодных условий). Внешний вид поврежденного растения показан на рис. 1. Степень поражения оценивали по числу следов укусов на листовой пластинке, нанесенных насекомыми-вредителями на 2-й и 4-й дни эксперимента.



Рис. 1. Внешний вид проростка рапса масличного (*B. napus*), пораженного листоблошкой (*Phyllotreta* sp)

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования показали, что обработка семян и листьев проростков суспензиями бактерий рода *Bacillus* зачастую снижают устойчивость к насекомому-вредителю *Phyllotreta* sp. Напромер, в случае со штаммами *B. amyloliquefaciens* УКМ Б-5017 и 5113 поражаемость растений возрастала почти в 2 раза, что может свести на нет положительный эффект защиты растений от фитопатогенных грибов и бактерий. Напротив, для штамма *B. subtilis* УКМ Б-5137 был

отмечен положительный эффект повышения устойчивости растений к насекомым-вредителям. Кроме того, побочный эффект проявлялся в меньшей степени, если растения, выросшие из семян, обработанных суспензией спор, повторно подвергались обработке на стадии проростков (рис. 2).

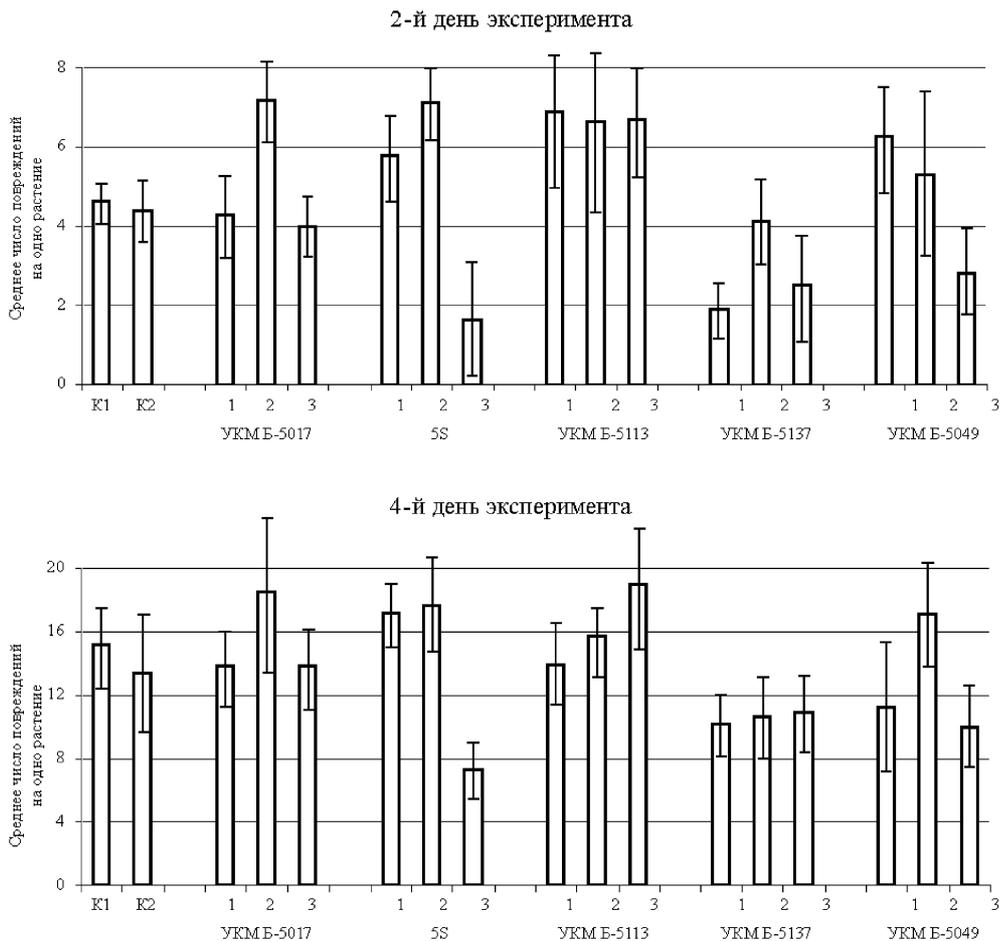


Рис. 2. Влияние обработки семян и ростков рапса суспензией спор *Bacillus* на поражаемость листоблошкой

К1 — контрольные растения из семян, замоченных в воде; К2 — контрольная обработка листьев растений стерильной водой; 1 — растения, выросшие из семян, замоченных в суспензиях спор; 2 — листья растений обработаны суспензиями спор; 3 — семена и листья растений обработаны суспензиями спор. Столбцами отмечены средние значения пораженности в группах растений и доверительный интервал изменчивости для $p = 0,95$.

Обнаруженный побочный эффект повышенной чувствительности растений к насекомым-вредителям может быть объяснен пере-

крестным влиянием медиаторов системной устойчивости растений. На рис. 3 обобщены известные данные взаимодействия медиаторов у растений [5, 6]. Системный ответ на поражение патогенными бактериями и грибами, паразитирующими в тканях, обычно опосредован синтезом салициловой кислоты, тогда как механические повреждения и некротическое разрушение клеток энзимами фитопатогенов стимулируют синтез медиаторов ясмоновой кислоты и этилена [5]. Интересно, что растение способно отличить повреждения, вызванные паразитическими микроорганизмами, от повреждений, нанесенных насекомыми. Таким образом, ясмоновая кислота запускает серию биохимических реакций синтеза антимикробных веществ в первом случае, или ингибиторов протеаз насекомых во втором (рис. 3).

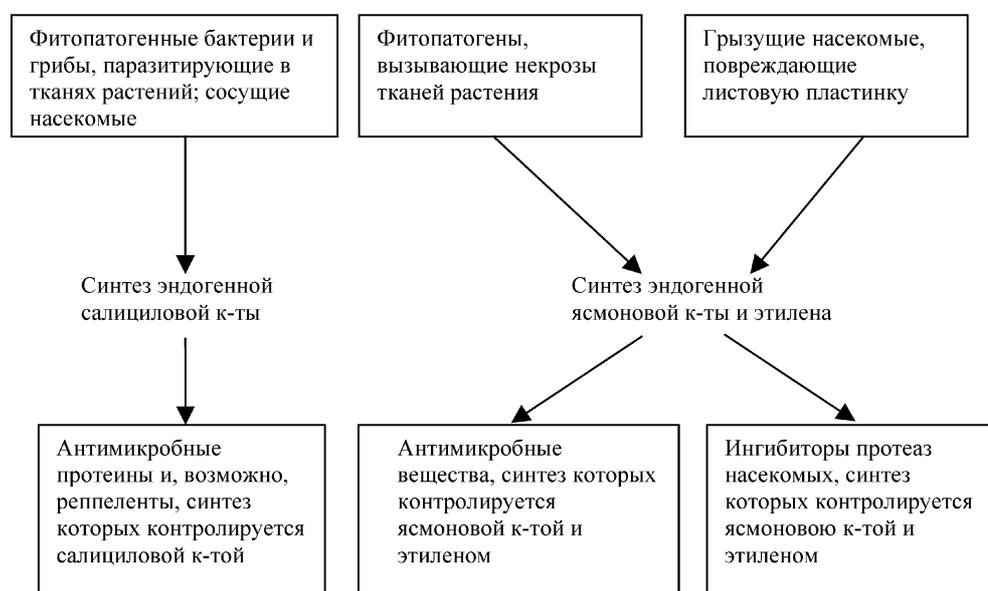


Рис. 3. Модель регуляции синтеза растением антимикробных веществ и репеллентов в ответ на инфицирование фитопатогенными микроорганизмами и инвазию насекомых-вредителей

Ранее в экспериментах на кресс-салате (*Arabidopsis thaliana*) нами были получены свидетельства того, что обработка растений сапрофитными и ризосферными *Bacillus* вызывает в растениях каскад защитных реакций, контролируемых медиатором ясмоновой кислотой [7]. Напротив, из литературных источников известно, что обсемененность растения эндофитными *Pseudomonas* вызывает салицин-зависимый системный ответ [8], который не влияет, или даже повышает салицин-независимую устойчивость растения к насекомым-вредителям [3]. Поскольку системный ответ растения на обсемененность бактериями *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* и на

инвазию насекомых обусловлен синтезом разных веществ, но контролируется одними и теми же медиаторами (ясмоновой кислотой и этиленом), вполне вероятно, что активизация синтеза антимикробных веществ может подавлять синтез ингибиторов протеаз насекомых в результате конкуренции рецепторов растения за тот же медиатор, или конкуренции за энергетические ресурсы растения. Пока неизвестно, какие особенности микроорганизмов определяют стимуляцию салицин-зависимых или ясмонат-зависимых механизмов системной резистенции. Вполне вероятно, что активация синтеза эндогенной ясмоновой кислоты под воздействием культур *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* связана с синтезом этими бактериями высокоактивных амилалитических и протеолитических ферментов [9]. Также осталось неясным, какие особенности штамма *B. subtilis* УКМ Б-5137 стали причиной повышения устойчивости обработанных проростков рапса к листовлошке. Данный штамм обладает рядом других уникальных свойств, что делает ее перспективной для использования в составе биопрепаратов [10].

Полученные данные следует учитывать при конструировании новых комбинированных биопрепаратов и при разработке схем их применения, которые позволят предупредить проявление нежелательных побочных эффектов. Интересным в этом плане представляется перспектива совместного использования в биопрепаратах штаммов-антагонистов *B. amyloliquefaciens* УКМ Б-5017 и 5113 в сочетании со штаммами *B. subtilis* 5137 и 5S, повышающими устойчивость растений к насекомым-вредителям, или с некоторыми штаммами *Pseudomonas*, обладающими инсектицидной активностью [11].

Выводы

1. Обработка семян и ростков растений суспензиями спор *Bacillus* оказывает опосредованный эффект на устойчивость растений к насекомым-вредителям.
2. Эффект воздействия на устойчивость растения может быть как положительным, так и отрицательным, что определяется штаммоспецифическими особенностями культуры микроорганизма.
3. Возможный побочный эффект от применения бактерий-антагонистов рода *Bacillus* для защиты растений от фитопатогенных бактерий и грибов следует учитывать при конструировании биопрепаратов и разработке технологической схемы их применения.

Литература

1. Рой А. А., Рева О. Н., Курдюш И. К., Смирнов В. В. Биологические свойства фосфатмобилизирующего штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Прикл. биохимия и микробиол. — 2004. — Т. 40, № 6. — С. 551–557.
2. Moran P. J. Plant-mediated interactions between insects and a fungal plant pathogen and the role of plant chemical responses to infection // Oecologia. — 1998. — Vol. 115. — P. 523–530.

3. Stout M. J., Fidantsef A. L., Duffey S. S., Bostock R. M. Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum* // *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* — 1999. — Vol. 54. — P. 115–130.
4. Reva O. N., Dixelius C., Meijer J., Priest F. G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* // *FEMS Ecol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 48, N 2. — P. 249–259.
5. Felton G., Korth K. L. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2000. — Vol. 3. — P. 309–314.
6. Thaler J. S., Owen B., Higgins V. J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles // *Plant Physiology.* — 2004. — Vol. 135. — P. 530–538.
7. Danielsson J., Dixelius C., Reva O., Meijer J. *Bacillus* as beneficial bacteria for plant protection // *Int. Conf. on Arabidopsis Research 2004. Berlin July 11th–14th 2004.*
8. Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 453–483.
9. Gould A. R., May B. K., Elliott W. H. Release of extracellular enzymes from *Bacillus amyloliquefaciens* // *J. Bacteriol.* — 1975. — Vol. 122, N 1. — P. 34–40.
10. Лана С. В., Рева О. Н. Деякі властивості штамів *Bacillus subtilis*, активних щодо збудників гнилей плодів та ягід // *Мікробіол. журн.* — 2005. — Т. 67, № 1. — С. 22–31.
11. Гораль В. М., Ланна Н. В., Гораль С. В., Гарагуля А. Д., Киприанова Е. А., Омелянець Т. Г., Смирнов В. В. Инсектофунгицидный препарат гаупсин на основе штаммов *Pseudomonas aureofaciens* // *Прикл. биохимия и микробиол.* — 1999. — Т. 35, № 5. — С. 596–598.

О. М. Рева

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
від. антибіотиків,
вул. Заболотного, 154, Д03680 Київ ДСП, Україна

ВПЛИВ ОБРОБКИ РАПСУ (*BRASSICA NAPUS* L.) СПОРАМИ *BACILLUS* НА ВРАЖЕННЯ ЛИСТОБЛІШКОЮ *PHYLLOTRETA* SP.

Резюме

Біологічні препарати захисту рослин знаходять широке використання в усьому світі для профілактики захворювань, які викликають фітопатогенні бактерії і гриби. В цих біопрепаратах використовуються живі культури штамів-антагоністів, зокрема представники роду *Bacillus*. Використання препаратів живих культур розглядають як екологічно безпечну альтернативу використанню хімічних пестицидів. У той же час взаємодія бактерій-антагоністів з рослинами вивчена не в повній мірі, що не виключає можливості виникнення побіжних неочікуваних ефектів від використання біопрепаратів, які можуть послабити або звести нанівець очікуваний позитивний вплив. У цій роботі встановлено, що обробка проростків рапсу суспензією спор ряду штамів *Bacillus* призводить до підвищеного ураження рослин листоблішкою *Phyllotreta* sp., проте інші штами сприяють стійкості рослин до цієї шкідливої комахи. Були розглянуті можливі причини цього явища, які пов'язані з особливостями механізмів системної резистентності рослини. Запропоновано шляхи запобігання побічних ефектів від використання біопрепаратів що містять культури *Bacillus*.

Ключові слова: рапс, біопрепарат, *Bacillus*, системна резистентність, листоблішка.

O. N. Reva

Department of Antibiotics of the Institute of Microbiology and Virology named for D. K. Zabolotny, National Academy of Science of Ukraine, 154 Zabolotnogo Str., D03680, Kyiv GSP, Ukraine.

IMPACT OF TREATMENT OF OILSEED RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.) BY SPORES OF *BACILLUS* ON THE PEST DAMAGE BY *PSYLLA PHYLLOTRETA* SP.

Summary

Using of plant biocontrol preparations for protection plants from phytopathogenic bacteria and fungi is wide spread all over the world. These biopreparations are based on live cultures of the strains-antagonists, particularly — the bacteria of the *Bacillus* genus. Using of the live biocontrol agents are considered to be an ecologically safe alternative for the chemical pesticides. In the same time, the intrinsic interplay between bacteria-antagonists and plants is far from being resolved in details. Hence, unexpected negative side effects may derive from releasing of the bacteria on the plants that may weaken or just completely nullify the expected plant protective effect. In this work we showed that the treatment of rape seeds and shoots by the suspensions of spores of some *Bacillus* caused increased deterioration of plants by psylla pest (*Phyllotreta* sp.), while the other strains made the plants more resistant to this pest insect. Some possible reasons of the phenomenon rooted from the interplay of the plant systemic resistance mechanisms were considered and the ways to avoid the side effects of release of the biocontrol *Bacillus* have been considered.

Keywords: oilseed rape, biocontrol, *Bacillus*, plant systemic resistance, *Phyllotreta*.