

УДК 634:632.937:[632.35+632.4]

ВЛИЯНИЕ ТОКСИНОВ ЭНДОФИТНОЙ БАКТЕРИИ *P. PSEUDOMONAS* НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ И РАСТЕНИЕ-ХОЗЯИН НА ПРИМЕРЕ ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

М.В. Маслова, И.В. Лукъянчук, К.В. Зайцева
ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина,
ул. ЦГЛ, г. Мичуринск-наукоград, Тамбовская область, Россия,
e-mail: cglm@rambler.ru

РЕФЕРАТ

Тестирование плодовых и ягодных культур на наличие эндофитной микробиоты показало присутствие в растительных тканях бактерии из рода *Pseudomonas* и грибов, преимущественно относящихся к некротрофным. Проведена оценка характера воздействия токсинов эндофитной бактерии на фитопатогенные грибы, выделенные из тканей различных сортов вишни, черешни, смородины красной, черной, крыжовника. Установлено антагонистическое действие метаболитов бактерии в отношении возбудителей опасных болезней плодовых и ягодных культур. Бактериальные штаммы, выделенные из внутренних тканей высокоадаптивных форм и сортов, обладают более выраженной фунгицидной и фунгистатической активностью. Выявлено стимулирующее действие слабых растворов бактериального культурального фильтрата на растения вишни и земляники и токсическое влияние метаболитов бактерии в более высоких концентрациях. Рекомендуется для дифференциации сортов вишни и земляники по признаку устойчивости к бактериальным токсинам использовать концентрацию культуральной жидкости 10 %.

Ключевые слова: эндофитная бактерия, фитопатогенные грибы, токсические метаболиты микроорганизмов, плодовые и ягодные культуры, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Вследствие неблагоприятного воздействия внешней среды у плодовых и ягодных растений отмечается ослабление иммунитета, что приводит к активизации патогенной микробиоты как внешней, так и внутренней. Согласно нашим исследованиям и литературным данным, в последнее время наблюдается освоение грибами сапротрофами новых экологических ниш, в связи с переходом к паразитизму. Многолетние исследования, проводимые Краснодарским центром защиты плодовых и ягодных растений, выявили возрастание распространенности и вредоносности заболеваний, вызываемых грибом *Alternaria alternata*, и частоты встречаемости и вредоносности грибов из рода *Fusarium*. Отмечено общее увеличение в микоценозах плодовых культур некротрофных грибов. Выявлена тенденция формирования грибных комплексов с их участием [1]. Некротрофные грибы, внедряясь в живую ткань растения, очень быстро убивают ее своими токсинами и питаются уже мертвыми клетками [2]. В отличие от них для бактерий обязательным условием в течение всего периода паразитарного питания является сохранение растительных клеток живыми. Поэтому на начальных стадиях патогенеза бактерии оказывают стимулирующее действие на растительные клетки [3]. Бактерии также способны вступать в конкурентные взаимоотношения с грибами за питательный

субстрат. В связи с этим ряд исследователей указывает на вспомогательную функцию бактерий, находящихся как с наружи, так и внутри растения, в борьбе с более опасными грибными патогенами [4, 5].

Однако необходимо учитывать, что бактерия, хотя и помогает растениям в борьбе с грибами, является также патогеном. В благоприятных для бактерий условиях они начинают быстро размножаться в межклеточных пространствах и в сосудах, выделяя токсические метаболиты, способные привести к гибели клетки растения-хозяина.

В сложившихся условиях возникла необходимость регулярного мониторинга динамики развития патогенных микроорганизмов и изучения характера воздействия их друг на друга и растение-хозяин.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использованы стандартные методы изоляции эндофитных микроорганизмов, культивирования их на искусственных питательных средах и изучения в условиях чистых культур [6, 7].

Экспланты стерилизовали, погружая в спирт и обжигая в пламени спиртовки, после чего их помещали стерильным пинцетом на картофельную питательную среду в пробирки.

Выделенная бактериальная микробиота культивировалась в течение месяца. По мере роста и развития микроорганизмов происходило накопление токсинов в питательных средах. После месячной экспозиции экспланты извлекали, среду с токсинами автоклавировали.

Фунгицидные и фунгистатические свойства токсинов бактериальной микробиоты изучали путём посева гриба-тестера. Через месяц проводили балльную оценку роста гриба и рассчитывали степень токсичности бактерии (At) по формуле:

$$At = 100 - \frac{P_o}{P_k} * 100 \%,$$

где At – степень токсичности (в %);

P_o – рост гриба-тестера на токсине (в баллах);

P_k – рост гриба-тестера в контроле (в баллах).

Также фунгицидную и фунгистатическую активность бактериальной микробиоты изучали методом «двойных культур», т. е. совместного культивирования грибов и бактерий по образованию зоны подавления роста грибной микробиоты под влиянием бактерии в чашках Петри.

Оценка влияния токсинов бактерии на растение-хозяин проводилась с использованием в качестве селективирующего агента культурального фильтрата эндофитной бактерии из рода *Pseudomonas*, который был получен в результате культивирования бактерии на жидкой картофельной среде в течение месяца с последующим автоклавированием. Для определения характера воздействия фильтрата культуральной жидкости бактерии на растение-хозяин, листья и побеги помещали в сосуды с раствором культурального фильтрата. В качестве опытных были взяты варианты с концентрацией фильтрата культуральной жидкости 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %. Контролем служили листья, поставленные в воду. Оценка поражения листьев и побегов проводили по пятибалльной шкале.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тестирование побегов и листьев вишни, сливы, смородины черной, смородины красной, крыжовника, земляники показало наличие во внутренних тканях растений, как с симптомами поражения, так и без них, бактерии из р. *Pseudomonas* и грибов, относящихся преимущественно к некротрофам (*Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Monilia*, *Cytospora* и др.). Методом двойных культур, совместного культивирования бактерий и грибов, и посева гриба-тестера на среды с бактериальным токсином нами установлено антагонистическое действие бактерии в отношении выделенных грибов. Наиболее выраженная фунгицидная и фунгистатическая активность бактериальных токсинов была отмечена в отношении грибов из родов *Cytospora* (At=75,0 %) и *Alternaria* (At=65,6 %). Более устойчивыми к токсическому действию бактериальных метаболитов оказались грибные патогены из родов *Fusarium* (At=59,6 %) *Penicillium* (At=58,3 %), *Monilia* (At=50,9 %).

Нами установлено, что из внутренних тканей более адаптивных сортов и форм плодовых и ягодных культур выделялись бактериальные штаммы с выраженным фунгицидным и фунгистатическим действием токсинов.

При посеве гриба-тестера из рода *Alternaria* наибольшее его угнетение отмечалось на средах с токсинами бактериальных штаммов, выделившихся при тестировании высокоадаптивных порослевых форм вишни Находка Скрипникова, № 1, сортов вишни Тургеневка, Харитоновская, Фея (рост гриба-тестера не превышал 0,6 балла, в контроле – 1,5 балла). Из внутренних тканей сорта Превосходная Веньяминова и сортов черешни Дрогана желтая, Родина, которые по полевым наблюдениям характеризовались низкой адаптационной способностью, были выделены колонии бактерий с меньшей токсической активностью по отношению к грибу-тестеру, его рост при этом был выше 0,8 балла.

Изучение свойств бактерии, входящей в состав эндофитной микробиоты форм и сортов смородины красной, черной и крыжовника, показало, что на средах с бактериальными токсинами сильно подавлялся рост *Penicillium expansum* (1,0 балла), в то время как в контроле он составил 2,4 балла.

Выделившиеся при тестировании смородины красной бактериальные штаммы обладали наибольшей фунгицидной активностью (средний рост гриба-тестера составил 0,7 балла). Намного выше рост *Penicillium expansum* наблюдался на средах с бактериальными токсинами, полученными при тестировании смородины черной (1,1 балла). Токсины бактерии, выделившейся при тестировании ветвей крыжовника, в меньшей степени угнетали гриб-тестер, при этом его рост составил 1,3 балла.

В большей степени выраженным фунгицидным действием обладали бактериальные штаммы, выделенные из ветвей смородины красной сортов Вика и Нива (средний рост гриба-тестера составил 0,4 и 0,5 балла соответственно), сорта смородины черной Севчанка (рост гриба-тестера составил по 0,6 балла), сорта крыжовника Черносливовый (рост гриба-тестера – 0,9 балла). Данные сорта, согласно нашим исследованиям и литературным данным, являются высокоадаптированными к неблагоприятным условиям среды.

В связи со сказанным, бактерия, обладающая токсинами фунгицидного и фунгистатического действия, угнетает более опасные грибные патогены. Так как паразитизм бактерий в отношении растения-хозяина в отличие от грибов не имеет такой выраженной формы и активности, то бактериальная микробиота способна выступать в роли симбионта, компенсируя иммунодефицит, возникший в результате негативного влияния факторов внешней среды. Таким образом, она осуществляет протективный иммунитет, что способствует повышению адаптационной способности растений [4].

Несмотря на то, что в настоящее время явных симптомов бактериального поражения на плодовых не выявлено, следует с высокой настороженностью относиться к тому, что из бессимптомных растений тестируется бактерия, так как существует опасность вспышки бактериозов при изменении условий среды и ослаблении защитных свойств растений. Подобный сценарий наблюдался в южных районах России и на Украине, где распространены бактериозы на зерновых, овощных культурах, а также на различных древесных породах, в том числе плодовых, в последние годы принимает угрожающие масштабы [8, 9].

В связи со сказанным, необходима оценка существующего сортимента плодовых и ягодных культур на устойчивость к токсинам эндофитной бактерии из р. *Pseudomonas*.

Нами проводилось изучение характера воздействия токсических метаболитов эндофитной бактерии, выделившейся при тестировании побегов вишни, на растение-хозяин в различных концентрациях. В качестве модельных использовали сорта вишни Романтика, Фея, Превосходная Веньяминова. Установлено стимулирующее действие фильтрата культуральной жидкости в концентрации 2,5 и 5,0 % по отношению к растению-хозяину. Средний балл поражения листьев в данных концентрациях составил 1,5 и 1,6 балла соответственно, при этом в контроле – 1,9 балла. Во всех вариантах опыта, где концентрация культурального фильтрата превышала 10,0 %, отмечалась степень некрозности листьев выше 3,0 балла.

При этом четко наблюдались различия по сортам. У наиболее устойчивых к действию бактериальных токсинов сортов Романтика и Фея отмечается высокий балл общего состояния растений (в среднем 4,0 балла) и отсутствуют явные признаки интоксикации.

Также проводилась оценка земляники по устойчивости к токсинам эндофитной бактерии из рода *Pseudomonas* на различных концентрациях раствора культурального фильтрата. В качестве модельных объектов служили контрастные по уровню адаптации к неблагоприятным факторам среды генотипы: менее приспособленный к условиям Центрально-Черноземной зоны зарубежный сорт Барлидаун и сорт отечественной селекции с широким диапазоном устойчивости Урожайная ЦГЛ [10, 11].

В результате исследований выявлено стимулирующее действие культурального фильтрата бактериальной микробиоты на листья земляники в концентрации 2,5; 5,0 %. Степень их некрозности составила не более 2,0 балла, тогда как в контроле этот показатель был равен 2,6 балла. В остальных вариантах опыта с концентрацией культурального фильтрата 10,0 % и более средняя степень поражения по сортам составила 3,7 балла.

Отмечены существенные различия изученных форм земляники по степени устойчивости к действию бактериальных токсинов в зависимости от генотипа. Наибольшей толерантностью к токсическим бактериальным метаболитам обладал сорт Урожайная ЦГЛ, характеризующийся высокой адаптацией к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды. В связи с этим общее состояние насаждений данного сорта в среднем по годам составляет 4,7 балла и на них отсутствуют явные признаки интоксикации.

ВЫВОДЫ

Проведенные нами комплексные исследования взаимодействий компонентов в системе среда – хозяин – паразит позволили сделать следующие выводы:

1. Путем тестирования плодовых и ягодных растений выявлено наличие эндофитной микробиоты, представленной бактериями из р. *Pseudomonas* и некротрофными грибами у всех исследуемых форм и сортов как с симптомами поражения, так и без них.

2. Эндофитная бактерия является антагонистом возбудителей опасных грибных болезней плодовых и ягодных культур, при этом бактериальные штаммы, выделенные из внутренних тканей высокоадаптивных форм и сортов, обладают более выраженной фунгицидной и фунгистатической активностью.

3. Метаболиты бактерии в слабых концентрациях (2,5 и 5,0 %) оказывают стимулирующее влияние на растение-хозяин.

4. Бактериальный культуральный фильтрат в концентрации 10,0 % и более токсично воздействует на растения, повышая степень некрозности его тканей.

5. Для дифференциации сортов вишни и земляники по степени устойчивости к токсинам эндофитной бактерии целесообразно использовать раствор культурального фильтрата с концентрацией 10 %, так как она является показательной для определения степени устойчивости растений к токсинам и позволяет использовать в опыте небольшой объем культуральной жидкости при оценке широкого спектра генотипов.

Литература

1. Смольякова, В.М. Оптимизация структуры патосистем и регулирования численности вредных организмов в плодовом агроценозе / В.М. Смольякова [и др.] // Садоводство и виноградарство. – 2008. – № 5. – С. 20-21.

2. Черемисинов, Н.А. Общая патология растений / Н.А. Черемисинов. – М.: Высшая школа, 1965. – 330 с.

3. Вердеревский, Д.Д. Иммуитет растений к паразитарным болезням / Д.Д. Вердеревский. – М.: Сельхозгиз, 1959. – 372 с.

4. Ищенко, Л.А. Проблемы иммунитета и защита плодовых культур при стрессе у хозяина и паразита / Л.А. Ищенко [и др.] // Садоводство и виноградарство. – 2007. – № 4. – С. 2-4.

5. Сахнбгареев, А.А. Эндофитные бактерии / А.А. Сахнбгареев, М.Я. Менликиев // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2008. – № 3. – С. 60-62.

6. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. – М.: Агропромиздат, 1987. – 312 с.

7. Методы экспериментальной микологии. – Киев, 1982. – 550 с.

8. Игнатов, А.Н. Бактериозы в России: угроза реальна / А.Н. Игнатов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.agroxxi.ru/gazeta-zaschita-rastanii>. – Дата доступа: 08.10.2012.

9. Харченко, А.Г. Бактериозы маскируются под голодание / А.Г. Харченко // Защита растений. – 2012. – № 2. – С. 10-11.

10. Лукьянчук, И.В. Комплексная устойчивость земляники к абиотическим стрессорам / И.В. Лукьянчук // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП; редкол.: И.М. Куликов [и др.]. – М., 2011. – Т. XXVIII. – Ч. 2. – С. 30-36.

11. Лукьянчук, И.В. Комплексная устойчивость земляники к белой и бурой пятнистостям / И.В. Лукьянчук // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ГНУ ВСТИСП; редкол.: И.М. Куликов [и др.]. – М., 2013. – Т. XXXVI. – Ч. 1. – С. 366-369.

**THE EFFECT MODE OF ENDOPHYTIC BACTERIUM *PSEUDOMONAS*
GEN TOXINTS ON PHYTOPATHOGENIC FUNGI AND HOST-PLANT
WITHIN LARGE-AND-SMALL FRUIT CROPS**

M.V. Maslova, I.V. Luk'yanchuk, K.V. Zaitseva

ABSTRACT

Testing of fruit and small fruit crops for the presence of endophytic microbiota revealed the existence of bacteria in the plant tissues of the genus *Pseudomonas* and fungi, mainly relating to necrotrophic. An assessment of the nature of exposure to toxins endophytic bacteria on phytopathogenic fungi isolated from tissues of different cultivars of cherry, red and black currant and gooseberry was made. Antagonistic action of bacteria metabolites against pathogens of dangerous diseases of fruit and small fruit crops was established. Bacterial strains from the internal tissues of the most adaptive forms and cultivars possess more pronounced fungicidal and fungistatic activity. The stimulatory effect of weak solutions of bacterial culture filtrate plants cherries and strawberries and toxic effects of metabolites bacteria at higher concentrations were revealed. Concentration of 10 % of culture fluid was recommended to use for differentiation of cherry and strawberry cultivars for a resistance to bacterial toxins.

Key words: endophytic bacterium, phytopathogenic fungi, toxin, fruit and small fruit crops, Russia.

Дата поступления статьи в редакцию 05.03.2014