

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ БЕЛКА МФЗ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ПОВЫШАТЬ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К ВИРУСНЫМ И ГРИБНЫМ ПАТОГЕНАМ

Д. В. Шумилина, В. Г. Джавахия, Всероссийский НИИ фитопатологии

Благоприятное воздействие некоторых ризосферных организмов на сельскохозяйственные культуры хорошо известно. Успешное применение таких почвенных бактерий, как *Pseudomonas fluorescens*, для биоконтроля патогенов описано многими авторами [2, 4, 5]*. Она препятствует развитию болезнетворных организмов, выделяя различные антибиотики и ферменты. Последние исследования показали, что *P. fluorescens* также обладает способностью индуцировать в растениях системную устойчивость к почвообитающим грибам и паразитическим нематодам [6, 7].

Однако эффективность препаратов на основе живых микроорганизмов в значительной степени зависит от условий окружающей среды. В связи с этим становится актуальным вопрос о возможности применения не живых бактерий, а бактериальных экстрактов или же определенных веществ, выделенных из полезных микроорганизмов, способных защищать растения от патогенов.

Нами было показано ранее, что *P. fluorescens* (штамм 197) синтезирует белок МФЗ, обладающий защитным действием против фитопатогенных вирусов и грибов [1]. Впервые это защитное действие было показано для пары табак — вирус табачной мозаики (ВТМ). На листьях табака некрозообразующего сорта, обработанных белком, после инокуляции ВТМ некрозы не образовывались. Установлено, что МФЗ относится к пептидил-пролил цис-транс изомеразам FKBP типа (патент WO2005061533 Dzhavakhia V. и др., 2005).

Цель данной работы — изучение защитных свойств МФЗ на сорте табака Samsun, на котором вирус распространяется системно, образуя типичную мозаичную окраску листьев, а также исследование возможного фитотоксического действия изучаемого белка на растения табака. Кроме того, изучали прямое действие МФЗ на ВТМ и фитопатогенный гриб *Alternaria longipes*.

Растения табака выращивали при 16-часовом дне и температуре 22°C днем и 20°C ночью. Для опытов использовали растения в фазе 3—4 настоящих листьев.

Вначале МФЗ был протестирован на фитотоксичность. Водный раствор белка инфильтрировали в пространство между жилок с нижней стороны листовой пластинки и спустя неделю оценивали состояние листьев. Инфильтрация водного раствора МФЗ в концентрации 1 мг/мл не вызывала увядания, некрозообразования, изменения цвета, деформацию или какие-либо другие изменения листьев табака. В течение всего эксперимента листья, в которые ввели раствор белка, выглядели так же, как и контрольные.

Для того чтобы определить, оказывает ли МФЗ прямое действие на вирусы, была исследована способность ВТМ после инокуляции в растворе белка индуцировать развитие некрозов на табаке. Суспензию вирусных частиц помещали на сутки в раствор МФЗ, далее проводили ультрацентри-

фугирование для отделения ВТМ от белка. Для инокуляции листьев использовали исходный раствор вируса, ВТМ после инокуляции с белком и смесь вируса и МФЗ.

Количество образовавшихся некротов на листьях, инокулированных исходным раствором вируса и ВТМ, прошедшим инокуляцию с белком, существенно не различалось между собой, в то время как после применения вируса и белка совместно некротозы на листьях не образовывались (рис. 1).

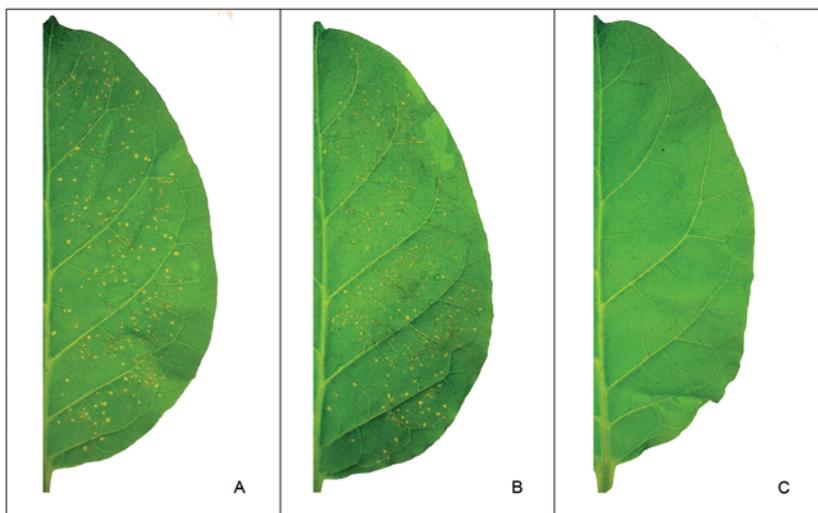


Рис. 1. Развитие некротов на листьях табака, инокулированных ВТМ (А), ВТМ после инокуляции с МФЗ и последующей очистки от белка (В), смесью ВТМ и МФЗ (С)

Некротообразующие сорта табака являются устойчивыми к распространению ВТМ по растению и, для того чтобы более полно изучить способность МФЗ индуцировать устойчивость растений к данному вирусу, были проведены дополнительные испытания с использованием восприимчивого сорта табака Samsun. Обработку растений проводили путем опрыскивания водными растворами МФЗ белка. Для того чтобы исключить контактное действие белка на вирус, при обработке растения нижний лист помещали в целлофановый пакет для защиты его от попадания капель препарата. Инокуляцию растений проводили спустя сутки, натирая суспензией вируса необработанные нижние листья. Накопление ВТМ в соке растений определяли через каждые 5—10 дн. с использованием иммуноферментного анализа.

Контрольные растения, обработанные водой, накапливали высокое количество вирусных частиц в соке уже спустя 2 нед. после инокуляции. В то же время на растениях, обработанных даже низкими концентрациями белка (10 мкг/мл), развитие болезни значительно задерживалось (рис. 2).

Для изучения действия МФЗ на грибные патогены растений были выбраны табак и *A. longipes* в качестве модельной пары хозяин — патоген.

Для получения спороносящей культуры гриб *A. longipes* выращивали на среде РСА (морковь — 20 г/л, картофель — 20 г/л, агар — 15 г/л) в чашках Петри при постоянном освещении ультрафиолетовым светом в течение 14 дн. при

* Со списком литературы можно ознакомиться на сайте www.agroxxi.ru

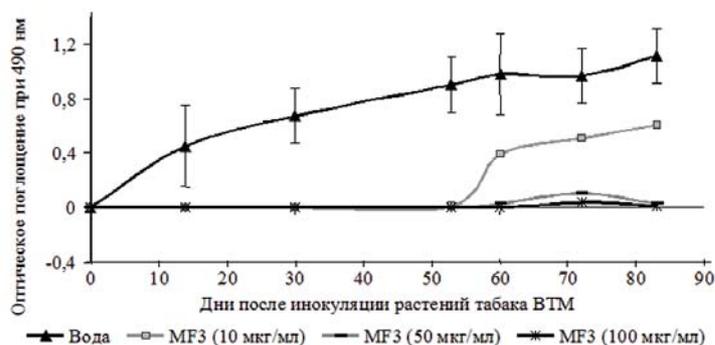


Рис. 2. Накопление ВТМ в листьях табака, обработанных растворами MF3 в концентрациях, 10, 50 и 100 мкг/мл

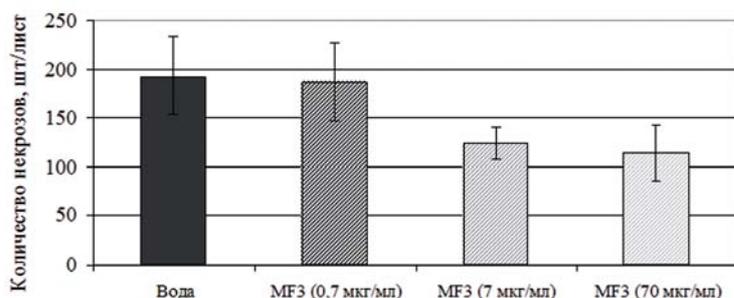
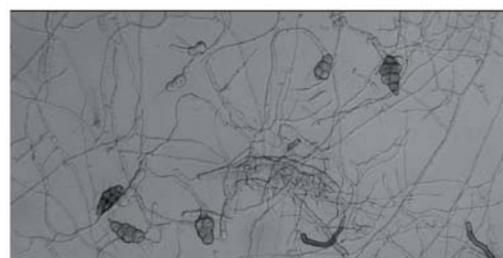


Рис. 4. Влияние предобработки листьев табака раствором MF3 на развитие некрозов после инокуляции *A. longipes*

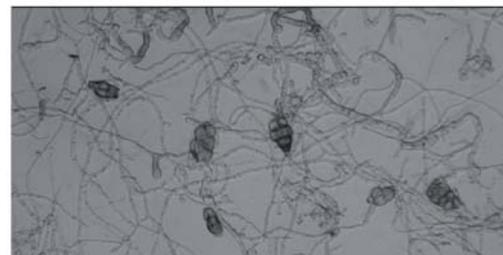
20°C. Для определения влияния MF3 на прорастание спор *A. longipes* белок вносили в суспензию спор и анализировали под микроскопом толщину и длину выросших гиф спустя 12 ч инкубации при температуре 20°C.

Полученные данные свидетельствуют о том, что даже высокие концентрации белка не подавляли прорастание спор гриба. Количество проросших спор, длина и толщина гиф в варианте с применением MF3 были такими же, как и в контроле (рис. 3).

Для того чтобы определить, способен ли MF3 защищать растения табака от *A. longipes*, их листья, предварительно обработанные водными раство-



Вода



MF3 (70 мкг/мл)

Рис. 3. Прорастание спор *A. longipes* в опытных растворах

рами с разной концентрацией белка (от 0 до 70 мкг/мл), опрыскивали суспензией спор гриба. Через 10 дн. подсчитывали число образовавшихся некрозов на контрольных и обработанных листьях.

Листья, обработанные MF3 белком в концентрации 7 мкг/мл и более, достоверно меньше заражались *A. longipes* по сравнению с листьями, обработанными водой (рис. 4). При постановке опыта обработки белком проводили с нижней стороны листьев, а инокуляцию грибом — с верхней, что исключало возможность прямого влияния MF3 на патоген.

Таким образом, MF3 белок из *P. fluorescens* способен защищать растения табака от некоторых вирусных и грибных патогенов. Можно предположить, что применение MF3 в биоконтроле не будет приводить к возникновению устойчивых штаммов, поскольку белок не оказывает прямого негативного действия на патогены. Применение MF3 для защиты растений от патогенов биопестицидов на основе подобных белков может стать новым этапом в развитии методов биоконтроля. ■

Литература

1. Шумилина Д.В., Воинова Т.М., Джавахия В.Г. Микробный фактор 3 — база для создания новых биопестицидов. // Защита и карантин растений, (2006)10, 20—21.
2. Akkopru A., Demir S. Biological Control of Fusarium Wilt in Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some Rhizobacteria. // J. Phytopathology, (2005)153. — P. 544—550.
3. Dzhavakhia V., Shumilina D. et al. "Proteins inducing multiple resistance of plants to phytopathogens and pests" WO2005061533 publication date 2005-07-07 to PCT International system to Finnish patent office.
4. Ellis R.J., Timms-Wilson T.M., Beringer J.E., Rhodes D., Renwick A., Stevenson L. and Bailey M.J. Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96 // Journal of Applied Microbiology, (1999) 87. — P. 454—463.
5. Maurhofer M., Reimann C., Schmidli-Sacherer P., Heeb S., Haas D., De Fago G. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. // Phytopathology, (1998) 88. — P. 678—684.
6. Siddiqui I., Shaukat S. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. // J. Phytopathol, (2002) 150. — P. 469—473.
7. Siddiqui I. A. and Shaukat S. S. Resistance against the damping-off fungus *Rhizoctonia solani* systemically induced by the plant-growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* (IE-6S+) and *P. fluorescens* (CHA0) // J. Phytopathology, (2002)150. — P. 500—506.