

АЛЕЛОПАТИЧНА ДІЯ ЛИСТЯ ЯБЛУНІ НА ЕНТОМОПАТОГЕННІ ШТАМИ *BACILLUS THURINGIENSIS*

А.Б. Крижанівський, Т.В. Пасічник

Інститут агроекології і природокористування НААН

*Досліджено вплив водо- та спирторозчинних екстрактів і летких виділень листя яблуні на ентомопатогенні штами спорових бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt) 0371, 0376, 0408, 787, що є перспективними для створення на їх основі препарату для біо-контролю шкідливих листогризучих комах у яблуневому саду. Встановлено, що штами Bt 0371 та Bt 0408 виявляють найбільшу толерантність до алелопатичної дії листя яблуні і тому довше і з більшою чисельністю порівняно з іншими зберігаються на поверхні листя після обробки саду.*

Ключові слова: яблуня, *Bacillus thuringiensis*, алелопатія, водо- та спирторозчинні виділення, леткі виділення.

Яблуко – найпоширеніший фрукт у помірній зоні України, що є джерелом вітамінів, мікроелементів, органічних кислот, клітковини та інших корисних для здоров'я людини поживних речовин. У світовому валовому виробництві фруктів яблука посідають друге місце після цитрусових, а за рівнем виробництва та площами плодоносних насаджень – друге місце, після бананів. У 2010 р. ці показники становили 69,5 та 4,7 млн га відповідно. Україна у 2010 р. займала 13-те місце у світі і 5-те в Європі з виробництва яблук [1]. Зважаючи на смак і корисність фруктів зростає їх споживання. Поряд із тим посилюються вимоги споживачів до смакових якостей сортів і збільшення терміну їх зберігання, що є основним стимулюючим параметром для розвитку яблуневих насаджень [2] та розроблення екологічно безпечних способів захисту їх від хвороб та шкідників з урахуванням збереження якості плодів [3].

Одним із перспективних методів захисту рослин, що забезпечує вихід екологічно безпечної продукції, є застосування засобів мікробіологічного контролю чисельності комах-шкідників на основі живих культур ентомопатогенних бактерій, зокрема *B. thuringiensis*. Але в природних умовах бактерії потрапляють під дію різних екологічних чинників, а за нанесення на листя яблуні –

під алелопатичний вплив екстрактивних речовин рослини. Як відомо з літератури, вони можуть не тільки пригнічувати ріст спорових мікроорганізмів, але й спричиняють відхилення від їх нормального розвитку. Наприклад, за дії екстрактивних речовин капусти [4] та картоплі [5] відбувається затримка на 2–3 доби утворення спор та кристалів *B. thuringiensis*, акації – на одну, а клена та горіха на дві доби. За дії екстрактивних речовин ялини, ялівцю, модрини та кедра під час культивування цього виду бактерій спостерігається утворення аномальних форм клітин [6, 7].

З огляду на вищевикладене, вивчали алелопатичну активність яблуні на штами бактерій *B. thuringiensis*, які виявляють високу ентомопатогенну дію проти листогризучих комах – шкідників яблуневих насаджень.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліджували алелопатичну активність летких, водо- та спирторозчинних виділень листя яблуні на культури штамів ентомопатогенних бактерій лабораторним методом [8]. Штами *B. thuringiensis* 0371, 0376, 0408 та 787 отримано з Інституту сільського господарства АР Крим.

Для проведення експерименту 7-добові спорові культури змивали стерильною водою з поверхні м'ясо-пептонного агару

(МПА), потім отриману бактеріальну суспензію переносили в трилітрові ємності з 250 мл 5%-го кукурудзяного екстракту і культивували впродовж 3-х діб. Далі культуральну рідину, що містила близько $5 \cdot 10^9$ КУО/мл, 10-кратно розводили. Отриманими робочими суспензіями культур штамів бактерій здійснювали контамінацію картопляного агару суцільним поверхневим посівом на чашках Петрі. У центрі чашки вирізали лунку діаметром 10 мм, в яку поміщали 5 г свіжоприготовленої водної або спиртової витяжки з листя яблуні та інкубували посів при температурі 27°C.

Для отримання витяжок заливали 5 г подрібненого листя яблуні 45 мл стерильної водопровідної води або 70%-го розчину спирту. Після 24 год. експозиції фільтрували і отримували водну та спиртову витяжки з яблуневого листя [9]. За контроль використовували аналогічні суцільні посіви досліджуваних штамів *B. thuringiensis*, у лунку яких поміщали стерильну воду або 70%-ий розчин спирту без рослинного агента. Всі варіанти дослідів проводили в триразовому повторенні.

Після інкубації посівів при 27°C позначали розміри зони пригнічення або відсутності росту бактеріальної культури (мм), що утворювалась навколо лунок з рослинним екстрактом [10].

Для дослідження аелопатичної дії летких виділень на *B. thuringiensis* проводили обробку пагонів яблуні рідкими культурами дослідних штамів з титром спор у робочій культуральній рідині $0,5 \cdot 10^9$ КУО/мл. Через три, п'ять та десять діб з оброблених пагонів брали листки у триразовому повто-

ренні та занурювали у 100 мл стерильної водопровідної води. Потім 1 мл отриманої у такий спосіб суспензії з бактеріальними клітинами висівали на картопляний агар у чашки Петрі. Інкубували при температурі 27°C. Через 3 доби підраховували кількість колоній, що утворились на поверхні поживного середовища. Контролем слугували змиви з листків, оброблених культурами штамів, але без інкубації.

Математичний аналіз результатів дослідження здійснювали за допомогою стандартних комп'ютерних програм Excel і Statistic.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Культури штамів бактерій *B. thuringiensis* 0371, 0376, 0408 та 787, що виявляють високу ентомопатогенну активність проти листогризухих шкідливих комах, можуть ефективно захищати яблуневі насадження лише за умов збереження життєздатності клітин на листі певний час після обробки. Так, слід відзначити високу аелопатичну активність летких виділень листя яблуні на досліджувані штами, особливо на клітини штаму Vt 787, чисельність життєздатних клітин якого різко знижувалась порівняно з вихідною культурою вже на третю добу і була значно нижчою від чисельності інших штамів (табл. 1). Цей штам характеризується найбільшою чутливістю до летких виділень листя яблуні, тому його життєздатність на листі буде короткотривалою, а отже і взаємодія зі шкідником теж буде недовгою, що потребуватиме повторних обробок саду для ефективного захисту від шкідників.

Таблиця 1

Аелопатичний вплив летких виділень листя яблуні на життєздатність клітин штамів *B. thuringiensis*

Варіант	Кількість бактерій на поверхні листової пластини, КУО тис./см ²			
	Вихідний титр млн/мл	3 доба	5 доба	10 доба
Vt 0371		186,8±6,0	169,2±2,3	89,2±3,1
Vt 0376		260,0±2,6	81,2±3,1	60,0±2,6
Vt 0408		318,8±0,6	208,0±5,3	70,8±4,7
Vt 787		72,0±0,4	9,2±0,4	2,0±0,3

Алелопатична дія екстрактивних речовин з листя яблуні на різні ентомопатогенні штами бактерій *B. thuringiensis*

Штамы <i>B. thuringiensis</i>	Зона пригнічення розвитку культури, мм	
	водорозчинні виділення	спирторозчинні виділення
Vt 0371	2,67±0,6	4,67±0,6
Vt 0376	5,00±1,0	5,33±0,6
Vt 0408	3,67±1,3	3,67±0,6
Vt 787	4,33±0,6	6,00±1,0
Контроль (вода)	0	0

Кількість бактеріальних клітин штаму Vt 0408, що залишились життєздатними після контакту з леткими виділеннями листя яблуні, була найвищою порівняно з іншими штамми, що свідчить про їх високу стійкість і низьку чутливість до дослідженого стрес-фактора. Зважаючи на це можна припустити, що його захисна дія буде ефективнішою завдяки більшій концентрації бактеріальних клітин на одиниці площі листової поверхні та більш тривалого терміну збереження життєздатності бактерій на листі яблуні, тобто не потребуватиме частих обприскувань саду.

Тому впродовж перших трьох днів ефективнішим буде використання штаму Vt 0408. Чисельність штамів Vt 0371, Vt 0376 на третю добу становила 186,8 та 260,0 тис. КУО/см² відповідно.

Упродовж 10-ти діб спостерігалось стрімке падіння чисельності бактерій, що було індивідуальним для кожного штаму. Найбільший спад відзначено за штамом Vt 787, чисельність якого на 10-ту добу експерименту ставала нижчою у 36 разів порівняно з третьою добою. Леткі виділення листя яблуні однаково впливали на штам Vt 0408 та 0376 і спричиняли зниження чисельності бактерій у 4 рази. Бактерії штаму Vt 0371 відзначалися найменшою чутливістю до інгібуючої дії летких виділень листя яблуні, адже кількість його клітин упродовж часу проведення досліду знизилась лише вдвічі. Отже, за обробки яблуневих садів проти шкідників штам Vt 0371 буде значно довше зберігатись на листках яблуні і краще контролювати чисельність шкідника, а ефективність препарату, нанесеного на листя яблуні, буде вищою.

Слід відзначити, що найвища чисельність та ефективність захисної дії культур ентомопатогенних бактерій буде найвищою впродовж перших трьох діб після обробки. Цей чинник потрібно враховувати під час вибору часу обробки – у найбільш вразливу фазу розвитку шкідника.

Щодо алелопатичної дії водо- і спирторозчинних виділень листя яблуні на культури ентомопатогенних бактерій, потрібно відзначити низьку толерантність штамів Vt 0371 та Vt 0408 порівняно з іншими штамми. З огляду на розміри зони пригнічення росту культури штаму Vt 0371 на поверхні поживного середовища, на нього чинився мінімальний вплив водорозчинних виділень (табл. 2). Існують літературні дані, що на цей штам бактерій також слабо впливають екстрактивні речовини листя картоплі, але значно пригнічують ріст культури штаму Vt 787 [5]. Наші дослідження також підтвердили високу чутливість штаму Vt 787, але щодо дії водорозчинних екстрактів листя яблуні.

Спиртові екстракти сильніше пригнічували ріст бактеріальних культур. Чутливість бактерій штаму Vt 0371 дещо поступалася чутливості бактерій штаму Vt 0408 та Vt 0376, зона пригнічення яких менша в середньому на 1,0 та 0,7 мм відповідно. Найчутливішим до спирторозчинних виділень листя яблуні виявився штам Vt 787, у якого спостерігався найбільший обсяг зони пригнічення росту культури на поверхні поживного середовища. Цей штам відрізняється від інших штамів тим, що не синтезує водорозчинний екзотоксин, тобто його ферментативна система побудована інакше і потребує додаткового вивчення.

ВИСНОВКИ

Для тривалішого зберігання *B. thuringiensis* на листі яблуні та відповідно – підвищення ефективності його захисної дії від шкідливих комах потрібно використовувати штам ентомопатогенних бактерій, найменш чутливий до алелопатичного впливу яблуні. Серед досліджуваних штамів Вt 0408 найбільше відповідає такій вимозі. Впродовж досліджень він проявляв найбільшу толерантність до виділень яблуні,

навіть після тривалого контакту з листям більшість його клітин зберігала свою життєздатність, а інгібування росту культури було мінімальним серед інших штамів. За такими ознаками найбільш чутливим штамом до дії виділень яблуні є штам Вt 787. Проте найдовше чинить опір пошкоджувальній дії летких виділень листя яблуні штам Вt 0371 – значною мірою вона проявляється лише після 10 діб їхнього контакту, підвищуючи ефективність біоконтролю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сало І.А. Ринок яблук в Україні / І.А. Сало // Вісник аграрної науки. – 2013. – № 3. – С. 63–66.
2. Сало І.А. Ринок плодів в Україні / І.А. Сало // Вісник аграрної науки. – 2013. – № 6. – С. 63–65.
3. Крижанівський А.Б. Вплив інсектицидів на основі *Bacillus thuringiensis* на шкідливу ентомофауну яблуневого саду / А.Б. Крижанівський // Агроекологічний журнал. – 2013. – № 4. – С. 127–129.
4. Кольчевський А.Г. Влияние фитонцидов растений, произрастающих в биоценозах капустных и картофельных полей на *B. thuringiensis var. thuringiensis* шт. 202 / А.Г. Кольчевский // Бюл. ВНИИ с.-х. микробиологии. – 1981. – № 33. – С. 57–60.
5. Крижко А.В. Екологічні аспекти застосування *Bacillus thuringiensis* в системі захисту картоплі від колорадського жука: дис. ... канд. с.-г. наук: 03.00.16 / А.В. Крижко. – К., 2011. – 176 с.
6. Гукасян А.Б. Бактериостатическое и бактерицидное действие хвои и ее химических компонентов на возбудителя болезни сибирского шелкопряда /
- А.Б. Гукасян // Изв. Сиб. отд. АН СССР. – 1958. – № 7. – С. 174–188.
7. Константинопольская Н.И. Взаимоотношения энтомопатогенных бактерий с другими микроорганизмами / Н.И. Константинопольская, Н.М. Горохова // Микроорганизмы в борьбе с вредителями лесного хозяйства. – М., 1966. – С. 65–74.
8. Данини Е.М. Элементарные методики изучения антибактериальных свойств фитонцидов высших растений / Е.М. Данини; [под ред. Б.П. Токина] // Фитонциды, их роль в природе и значение для медицины. – М.: Изд-во академии медицинских наук СССР, 1952. – С. 330.
9. Гродзинский А.М. Основы химической взаимодействия / А.М. Гродзинский. – К: Наукова думка, 1973. – 205 с.
10. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги; [пер. с венг. И.Ф. Куренного]; под ред. и с предисл. Г.С. Муромцева. – М.: Колос, 1983. – 296 с.

REFERENCES

1. Salo I.A. (2013). Rynok jabluk v Ukraini [Market of apples in Ukraine]. Bulletin of Agricultural Science, no. 3, pp. 63–66 (in Ukrainian).
2. Salo I.A. (2013). Rynok plodiv v Ukraini [Market of apples in Ukraine]. Bulletin of Agricultural Science, no. 6, pp. 63–65 (in Ukrainian).
3. Kryzhanivsky A.B. (2013). Vplyv insektycydov na osnovi *Bacillus thuringiensis* na shkidlyvu entomofaunu jablunevogho sadu [The influence of insecticides based on *Bacillus thuringiensis* towards harmful entomofauna of apple orchard]. Ahroekolohichniy zhurnal [Agroecological journal], no. 4 (in Ukrainian).
4. Kolchevskiy A.G. (1981). Vliyaniye fitontsidov rasteniy, proizrastayushchikh v biotsenozakh kapustnykh i kartofelnykh poliy na *B. thuringiensis var. thuringiensis* sht. 202 [The impact of phytoncides plants growing in bio-cenoses of cabbage and potato fields on *B. thuringiensis var. thuringiensis* str. 202]. Byul. VNII s/kh mikrobiologii, no. 33, pp. 57–60 (in Russian).
5. Kryzhko A.V. (2011). Ekolohichni aspekty zastosuвання *Bacillus thuringiensis* v sistemі zakhystu kartopli vid koloradskoho zhuka [Environmental aspects of the use of *Bacillus thuringiensis* in the system of protection of potato from the Colorado potato beetle]. Kyiv, 176 p. (in Ukrainian).
6. Ghukasyan A.B. (1958). Bakteriostaticeskoe i bakteriцидное deystvie khvoi i ee khimicheskikh komponen-tov na vzbudatelya bolezni sibirskogo shelkopryada [Bacteriostatic and bactericidal action of needles and its chemical components on the causative agent of Siberian moth]. Math. Sib. Dep. USSR Academy of Sciences, no. 7, pp. 174–188 (in Russian).
7. Constantinople N.I., Gorokhov N.M. (1966). Vzaimo-otnosheniya entomopatogennykh bakteriy s drugimi mikroorganizmami [Relationships of entomopathogenic bacteria with other organisms]. Mikroorganizmy v borbe s vreditelyami lesnogo khozyaystva [Microorganisms in the fight against forest pests]. Moscow, pp. 65–74 (in Russian).
8. Danini Ye.M. (1952). Elementarnye metodiki izucheniya antibakterialnykh svoystv fitontsidov vysshikh rasteniy [Elementary methods for studying the antibacterial properties of volatile production of higher plants]. Ed. Tokin B. P. Fitontsidy ikh rol v prirode i znachenie dlya meditsiny. Moscow: Izd-vo akademii meditsinskikh nauk SSSR, 330 p. (in Russian).
9. Grodzinskiy A.M. (1973). Osnovy khimichnoyi vzajemodiji roslin [Fundamentals of chemical interaction of plants]. Kyiv: Scientific Thought, 205 p. (in Ukrainian).
10. Segi Y. (1983). Metody pochvennoy mikrobiologii [Methods of soil microbiology]. Transl. Kurenno I.F.; Ed. Muromtseva G.S. Moscow: Kolos, 296 p. (in Russian).