

УДК 579.26+581.02

А. О. Кононенко, О. А. Дрегваль, Н. В. Черевач, І. В. Жерноскова, А. І. Вінніков
Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара

ВПЛИВ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ІНСЕКТИЦИДУ «БАКТОФУНГІН-LS» НА ПРОЦЕСИ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ РОСЛИН

Досліджено вплив мікробного інсектицидного препарату «Бактофунгін-LS» на основі ентомопатогенних бактерій і грибів на фізіологічні та біохімічні процеси у листках кукурудзи. Встановлено, що після обробки рослин препаратом підвищується загальний вміст пігментів (хлорофілів – на 12,8 %, каротиноїдів – на 31,3 %), зменшується співвідношення хлорофілів *a/b* і хлорофіл/каротиноїди, що є проявом фізіологічної реакції рослин на антропогенний вплив. Виявлено збільшення активності пероксидази на 13 % та поліфенолоксидази на 17,3 %, що свідчить про помірну фітоімунну відповідь та фізіологічну адаптацію рослин до дії біоінсектициду. Отримані результати дозволяють стверджувати про безпечність використання дослідженого мікробного інсектицидного препарату для рослин.

Ключові слова: біологічні інсектициди, токсини, хлорофіли, каротиноїди, пероксидаза, поліфенолоксидаза, адаптаційні властивості рослин.

А.О. Кононенко, О.А. Дрегваль, Н.В. Черевач, И. В. Жерносекова, А.И. Винников
Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ІНСЕКТИЦИДУ «БАКТОФУНГІН-LS» НА ПРОЦЕСИ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ РОСЛИН

Исследовано влияние микробного инсектицидного препарата «Бактофунгин-LS» на основе энтомопатогенных бактерий и грибов на физиологические и биохимические процессы в листьях кукурузы. Показано, что после обработки растений препаратом повышается общее содержание пигментов (хлорофиллов – на 12,8 %, каротиноидов – на 31,3 %), уменьшается соотношение хлорофиллов *a/b* и хлорофилл/каротиноиды, что является проявлением физиологической реакции растений на антропогенное влияние. Выявлено увеличение активности пероксидазы на 13 % и полифенолоксидазы на 17,3 %, что свидетельствует об умеренном фитоиммунном ответе и физиологической адаптации растений к действию биоинсектицида. Полученные результаты позволяют утверждать о безопасности использования исследуемого микробного препарата для растений.

Ключевые слова: биологические инсектициды, токсини, хлорофиллы, каротиноиды, пероксидаза, полифенолоксидаза, адаптационные свойства растений.

A. O. Kononenko, O. A. Dregval, N. V. Cherevach, I. V. Jernosekova, A. I. Vinnikov
O. Honchar Dnipropetrovsk National University

INFLUENCE OF MICROBIAL INSECTICIDE «BACTOFUNGIN-LS» ON THE VITAL PLANTS PROCESSES

The influence of microbial insecticide «Bactofungin-LS» on the base of entomopathogenic bacteria and fungi on the physiological and biochemical processes in the leaves of corn was investigated. It was founded that after treatment of plants by the biological insecticide increases the total content of pigments. The content of chlorophyll increased for 14 days by 9,14–12,8 % in comparison with the control, carotenoid – by 23.3 % after 2 days and 31.3 % after 14 days. It was determined the ratio of chlorophylls *a/b* as a measure of the balance of the photosynthetic process. It was reduction of chlorophyll *a* content compared to control. It was determined the ratio chlorophyll/carotenoids as an indicator of the balance between the amount absorbed by pigments light energy and its effective utilization in photosynthetic reactions. It was established that the ratio chlorophyll/carotenoids were decreased after 2

days by 11.6 %, after 14 days – by 14.1% compared to control, which is a manifestation of the physiological responses of plants to anthropogenic forcing. This indicates insignificant negative impact bioinsecticide on the photosynthetic apparatus of plants. It was showed an increase of peroxidase activity by 13 % and polyphenoloxidase by 17.3 %, what indicating a moderate phytoimmunic response and physiological adaptation of plants to bioinsecticide action. The obtained results indicated about the safe use of biological insecticide for plants.

Key words: biological insecticides, toxins, chlorophylls, carotenoids, peroxidase, polyphenoloxidase, adaptive properties of plants.

Одним із засобів регулювання чисельності шкідливих комах є застосування мікробних інсектицидів, серед яких провідне місце займають препарати на основі *Bacillus thuringiensis*. Кристалічні білки розглядаються як головні токсичні компоненти біоінсектицидів на основі *B. thuringiensis*, проте ці бактерії продукують й інші речовини, які згубно діють на комах, серед яких значна увага приділяється β -екзотоксину. Здатність до синтезу цього токсину виявлена у різних варіантів, зокрема у штамів *B. thuringiensis var. thuringiensis* [15].

Термостабільний водорозчинний β -екзотоксин містить фосфорильовану алларову кислоту, зв'язану з аденозинглюкозою і є аналогом аденозинтрифосфornoї кислоти (АТФ). Дія екзотоксину проявляється в інгібуванні ДНК-залежної РНК-полімерази за рахунок зв'язування з молекулою екзотоксину замість АТФ. Особливо чутливі до дії екзотоксину комахи в період метаморфоза, що пов'язано з його впливом на молоді клітини [10]. У сублетальних дозах екзотоксин затримує процес линьки та перетворення у лялечку, може викликати появу фізіологічно неповноцінних особин, знижує репродуктивну функцію комах [15; 9]. На відміну від δ -ендотоксину β -екзотоксин характеризується більш широким спектром інсектицидної дії і може негативно впливати на нецільові організми. За даними О. Е. Вороніної β -екзотоксин спричиняє негативну дію на проростки рослин гороху, що обумовлено порушенням стану пігментних систем та синтезу хлорофілу [4]. А. В. Крижко повідомила, що штам *B. thuringiensis*, який продукує β -екзотоксин, пригнічує функціонування світлозбираючого комплексу в листках картоплі [8].

Як відомо, вміст пігментів може характеризувати фізіологічний стан рослини. Кількість пігментів у рослинах змінюється протягом онтогенезу, а також під час адаптації до умов довкілля та під впливом різних стресорів [2]. Адаптаційні властивості рослин до дії несприятливих факторів зовнішнього середовища можна також оцінити за допомогою кількісних змін активності ферментів пероксидази та поліфенолоксидази [3; 7].

Відомо, що внесені у біоценоз шляхом обприскування компоненти мікробних інсектицидних препаратів можуть певний час зберігатися на листках рослин. За даними деяких дослідників термін збереження життєздатних спор *B. thuringiensis* на верхньому боці листків обробленої рослини складає 1–2 доби, на нижньому, захищеному від світла – до 7–10 діб. Екзотоксин зберігається до 5–7 діб [10; 17]. Тому великий період збереження ентомоцидних компонентів біопрепарату може вплинути на фізіологічні процеси, які відбуваються в клітинах оброблених рослин.

Метою даної роботи було вивчення впливу мікробного інсектицидного препарату «Бактофунгін-LS» на основі штамів ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis var. thuringiensis* ІМВ-7186 та грибів *Beauveria bassiana* ІМВ-F-100043 на динаміку накопичення фотосинтетичних пігментів, активність ферментів пероксидази та поліфенолоксидази у листках кукурудзи.

Матеріали та методи досліджень. Для дослідження впливу компонентів комплексного біопрепарату на процеси життєдіяльності рослин використовували зелену масу двотижневих рослин кукурудзи, вирощених у лабораторних умовах. Модельні рослини обробляли 10 % розчином рідкої форми препарату з титром $2,5 \times 10^8$ спор *B. thuringiensis* та $1,5 \times 10^7$ *B. bassiana* методом обприскування.

Вміст пігментів вимірювали спектрофотометрично за методикою В. Ф. Гавриленко зі співавторами. Вміст окремих пігментів вимірювали при довжині хвиль 665 та 649 (хлорофіли *a* та *b*) і 440 нм (сума каротиноїдів) у загальній спиртовій витяжці на спектрофотометрі СФ-46. Концентрацію пігментів обчислювали за формулами Wintermans та De Morts для 96 % етанолу [5].

Визначення активності пероксидази та поліфенолоксидази у листках кукурудзи проводили за методом А. Н. Бояркіна [14]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 6.

Результати та їх обговорення. За результатами проведених досліджень встановлено, що протягом 14 діб після обробки препаратом у листках кукурудзи відмічено збільшення суми хлорофілів на 9,14 – 12,8 % у порівнянні з контролем (табл. 1). З даних літератури відомо, що підвищення вмісту пігментів активізує процеси росту та розвитку рослин [1].

Важливим показником збалансованості фотосинтетичного процесу є співвідношення форм хлорофілу. Хлорофіл *a* пов'язаний з реакційними центрами фотосистеми, а хлорофіл *b* із світлозбираючим комплексом фотосистеми II [1]. Як вважають деякі автори, співвідношення хлорофіл *a*/хлорофіл *b* може впливати на ростові процеси на ранніх стадіях розвитку рослин, впливаючи на потенціал врожайності [6]. Встановлено, що співвідношення хлорофіл *a*/хлорофіл *b* протягом усього терміну спостережень було менше, ніж у контролі, що свідчить про зменшення в ньому частки хлорофілу *a*.

Таблиця 1

Вміст хлорофілів у листках кукурудзи після обробки біопрепаратом «Бактофунгін-LS», мг/100 г сирової речовини

Варіант досліджу	День досліджу	Хлорофіл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	Хлорофіл <i>a</i> + Хлорофіл <i>b</i>	Хлорофіл <i>a</i> / Хлорофіл <i>b</i>
Контроль	До обробки	48,60±0,03	17,56±0,17	66,16±1,90	2,77
	2	50,13±0,08	18,44±0,24	68,57±0,21	2,72
	7	53,17±0,12	19,73±0,05	72,90±0,08	2,69
	14	49,87±0,35	17,26±0,08	67,13±0,37	2,89
Оброблені рослини	До обробки	48,90±0,21	17,60±0,12	66,59±0,12	2,77
	2	50,97±0,24*	23,77±0,17*	74,74±0,35*	2,14
	7	54,83±0,25*	27,00±0,12*	81,84±0,36*	2,03
	14	51,67±0,55	24,03±0,13*	75,70±0,68*	2,15

Примітка: $P < 0,05$, * – достовірність різниці відносно контролю.

У досліджах із вивчення впливу біоінсектициду на жовті фотосинтетичні пігменти на другу добу спостерігали також збільшення концентрації каротиноїдів на 23,3 % (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст каротиноїдів у листках кукурудзи після обробки біопрепаратом «Бактофунгін-LS», мг/100 г сирової речовини

Варіант досліджу	День досліджу	Сума каротиноїдів	Хлорофіл/ каротиноїди
Контроль	До обробки	13,27±0,12	4,99
	2	13,45±0,27	5,1
	7	13,79±0,10	5,29
	14	12,17±0,15	5,52
Оброблені рослини	До обробки	13,40±0,06	4,96
	2	16,59±0,11*	4,51
	7	17,35±0,10*	4,72
	14	15,98±0,06*	4,74

Примітка: $P < 0,05$, * – достовірність різниці відносно контролю.

На сьому добу після обробки рослин вміст каротиноїдів підвищився на 25,8 %. На чотирнадцяту добу цей показник підвищився на 31,3 % в порівнянні з контролем.

Також визначали співвідношення хлорофіл/каротиноїди як показника збалансованості між кількістю поглинутої пігментами світлової енергії та ефективністю її використання у фотосинтетичних реакціях. При обробці кукурудзи препаратом «Бактофунгін-LS» співвідношення хлорофіл/каротиноїди зменшувалось на другу добу на 11,6 % порівняно з контролем. На сьому добу цей показник зменшився на 10,8 %, і на 14 – на 14,1 % (див. табл. 2).

Отримані результати свідчать, що у пігментному комплексі збільшується доля каротиноїдів відносно до хлорофілу, що вказує про порушення балансу між кількістю поглинутої пігментами світлової енергії та ефективністю її використання у фотосинтетичних реакціях. Отже біопрепарат «Бактофунгін-LS» спричинює деяку негативну дію на фотосинтетичний апарат рослин, що проявляється у зменшенні співвідношення хлорофіл *a*/хлорофіл *b* та співвідношення хлорофіл/каротиноїди.

Збільшення сумарного вмісту хлорофілів *a* і *b* та каротиноїдів у листках оброблених рослин свідчить про фізіологічну адаптацію рослин кукурудзи до несприятливих умов зовнішнього середовища. На відміну від даних А. В. Крижко у наших дослідженнях не спостерігалось суттєвого негативного впливу біопрепарату, що містить β -екзотоксин, на синтез фотосинтезуючих пігментів [8]. Можливо, це пов'язано з невеликою концентрацією цього токсину у складі «Бактофунгін-LS».

Одним із компонентів захисної системи рослин є пероксидаза, яка бере участь у синтезі лігніну, фітоалексинів, окисненні фенолів та активних форм кисню, що володіють високою фунгітоксичністю. Індуктором цього ферменту можуть бути різні фізичні та хімічні фактори, а кількісні зміни його активності пов'язують із адаптаційними властивостями рослин до дії несприятливих факторів навколишнього середовища [3]. Тому наступні наші дослідження були спрямовані на визначення впливу мікробного препарату на активність ферменту пероксидази у порівнянні з контрольними рослинами. Аналіз активності ферменту у листках оброблених рослин проводили через 2, 7 та 14 діб.

Вивчення динаміки активності пероксидази у лабораторних умовах показало, що через дві доби після обробки рослин мікробним препаратом «Бактофунгін-LS» збільшилася активність пероксидази у листі оброблених рослин на 6 % у порівнянні з контролем, на сьому добу активність пероксидази збільшилась на 13 %, на чотирнадцяту добу – на 10 % (рис. 1).

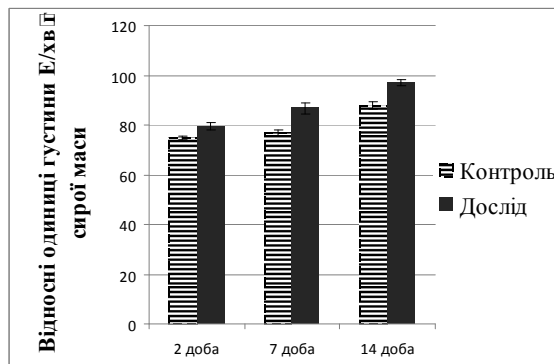


Рис. 1. Вплив інсектицидного мікробного препарату «Бактофунгін-LS» на активність пероксидази в листках кукурудзи

Таке збільшення активності пероксидази у рослинах унаслідок обробки бактофунгіном не слід вважати суттєвим, оскільки за даними літератури під дією інфекційних агентів активність цього ферменту може зростати на 50–400 % [3; 13].

Помірне збільшення активності пероксидази в листках кукурудзи, оброблених препаратом, може свідчити про фітоімунну відповідь рослинних клітин на контакт із чужорідними мікроорганізмами. З літературних даних відомо, що за стресових умов активність пероксидази підвищується і забезпечує нормальні метаболічні процеси в рослинах [3]. Такі незначні підвищення пероксидази в листках рослин підсилюють комплексну стійкість рослин і сприяють підвищенню врожайності [16].

Іншим ферментом, який пов'язують із захисними реакціями рослин на механічні пошкодження та ураження патогенами, є поліфенолоксидаза. Цей фермент функціонує в цитоплазмі й бере участь в утворенні хінонів, токсичних для мікроорганізмів. Разом із пероксидазою поліфенолоксидаза бере участь у перетворенні попередників лігніну, необхідного для потовщення оболонок, тобто утворення механічних бар'єрів проти патогенів [11]. Тому ступінь активності поліфенолоксидази використовують як критерій стійкості рослин до дії несприятливих факторів [7].

У наших дослідженнях визначення активності поліфенолоксидази у листках кукурудзи, показало незначне збільшення активності цього ферменту в оброблених рослинах (рис. 2).

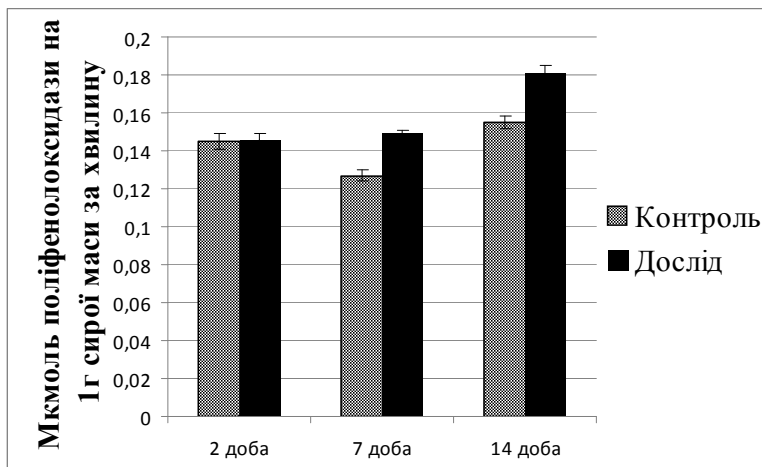


Рис. 2. Вплив інсектицидного мікробного препарату «Бактофунгін -LS» на активність поліфенолоксидази в листках кукурудзи

На сьому добу активність поліфенолоксидази збільшилась на 17,3 % у порівнянні з контролем. На чотирнадцяту добу спостерігали збільшення активності досліджуваного ферменту на 16,8 %.

За даними літератури відомо, що збільшення концентрації антропогенних забруднювачів у зовнішньому середовищі спричинює підвищення активності поліфенолоксидази на 200 – 300 % [12]. Враховуючи це, можна зробити висновок, що обробка рослин кукурудзи мікробним препаратом не є потужним стресовим фактором, а викликає лише помірну фітоімунну реакцію, яка свідчить про спроможність рослин зберегти стабільний характер окиснювально-відновних реакцій та процесів метаболізму фенольних сполук.

Висновки. Комплексний мікробний інсектицидний препарат «Бактофунгін-LS» підвищує загальний вміст пігментів (хлорофілів та каротиноїдів), що активізує процеси росту та розвитку рослин; зменшує співвідношення хлорофіл *a*/хлорофіл *b* і хлорофіл/каротиноїди, що є проявом фізіологічної реакції рослин на техногенний вплив; спричинює лише незначне збільшення (до 13 %) активнос-

ті пероксидази в листках кукурудзи, що стимулює фітоімунітет, підвищує комплексну стійкість рослин; викликає незначне підвищення активності поліфенолоксидази (до 17,3 %), що свідчить про спроможність рослин зберегти окиснювальний обмін на стабільному рівні та формування адаптаційних реакцій у рослин. Це дозволяє стверджувати про безпечність використання мікробного інсектицидного препарату «Бактофунгін-LS» на основі штамів *B.thuringiensis var. thuringiensis* та *B.bassiana* для захисту рослин від шкідливих комах.

Бібліографічні посилання

1. Абрамова Э. А. Содержание фотосинтетических пигментов и аскорбиновой кислоты в проростках вики в присутствии хлорида никеля / Э. А. Абрамова, В. В. Иванищев // Научные ведомости Белгород. гос. ун-та. Сер.: Естественные науки. – 2012. – № 9. – С.
2. Адрианова Ю. Е. Хлорофилл и продуктивность растений / Ю. Е. Адрианова, И. А. Тарчевский. – М. : Наука, 2000. – 135 с.
3. Биорегуляция микробно-растительных систем / Г. А. Иутинская, С. П. Пономаренко, Е. И. Андреюк и др.; под общей ред. Г. А. Иутинской, С. П. Пономаренко – К. : Ничлава, 2010. – 464 с.
4. Воронина О. Е. Экологические аспекты производства и применения энтомоцидных препаратов / О. Е. Воронина // Всерос. конф. «Научные аспекты экологических проблем России», посвященная 90-летию со дня рождения акад. А. Л. Яншина. – Москва, 13–16 июня 2001 г. – СПб., 2001. – С. 277.
5. Гавриленко В. Ф. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина. – М. : Высш. шк., 1975. – 392 с.
6. Генетические основы селекции растений : в 4 т. – Т. 1. Общая генетика растений / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск : Белорус. Наука, 2008. – 551 с.
7. Зайцева І. О. Фізіолого-біохімічні основи інтродукції деревних рослин у Степовому Придніпров'ї : моногр. / І. О. Зайцева, Л. Г. Долгова. – Д. : Вид-во ДНУ, 2010. – 388 с.
8. Крижко А. В. Влияние штамів *Bacillus thuringiensis* на пігментний апарат листя картоплі / А. В. Крижко // Агроекологічний журнал. – 2009. – № 2. – С. 111–114.
9. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* / Н. В. Кандыбин, Т. И. Патыка, В. П. Ермолова, В. Ф. Патыка – СПб.; Пушкин : Научное издание «Инновационный центр защиты растений», 2009. – 252 с.
10. Патыка В. Ф. Экология *Bacillus thuringiensis* / В. Ф. Патыка, Т. И. Патыка. – К. : Изд-во ПДАА, 2007. – 216 с.
11. Полевой В. В. Физиология растений : учеб. для биол. спец. вузов / В. В. Полевой. – М. : Высш. шк., 1989. – 464 с.
12. Половникова М. Г. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды / М. Г. Половникова, О. Л. Воскресенская // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 777–785.
13. Семенова Е. А. Энзиматическая активность инфицированных листьев *Glycine max* и *Glycine soja* / Е. А. Семенова, С. А. Титова, Л. К. Дубовицкая // Фундаментальные исследования. Биологические науки. – 2011. – №12. – С. 708–711.
14. Сучасні методи біохімічного аналізу рослин : навч. посіб. /Л. В. Шупранова, В. С. Більчук, Л. В. Богуславська та ін. – Д. : Вид-во ДНУ, 2011. – 80 с.
15. An Extracytoplasmic-Function Sigma Factor Is Involved in a Pathway Controlling β -Exotoxin I Production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 407-1 / S. Espinasse, M. Gohar, D. Lereclus [et all.] // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186, № 10. – P. 3108–3116.
16. Graskova I. A. Effect of coniferous extract on potato plants / I. A. Graskova, E. V. Kuznetsova, M. A. Zhivetiev // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – V. 5, № 1-2, – 2009. – P. 38–44.
17. Smith R. A. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants / Robert A. Smith, Graham A. Couche // Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – Vol. 57, №1. – P. 311–315.

Надійшла до редколегії 23.04.2015