

УДК 632.9:635.342

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПСЕВДОМОНАД ДЛЯ ЗАЩИТЫ КАПУСТЫ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Ф.С. ДЖАЛИЛОВ, И.В. КОРСАК, А.Н. ПЕРЕБИТЮК

(Кафедра фитопатологии)

Антагонистическую активность нескольких штаммов флуоресцирующих псевдомонад по отношению к возбудителям сосудистого и слизистого бактериозов капусты оценивали *in vitro* и на растениях, растущих в теплице. Наибольшей эффективностью характеризовался штамм *Pseudomonas* sp. AP33 — продуцент биопрепарата ризоплан. Его активность снижалась при добавлении в среду ионов трехвалентного железа, что указывало на участие сидерофоров во взаимоотношениях бактерий. В многолетних полевых испытаниях в варианте с обработкой ризопланом семян и растений в фазу кочанообразования наблюдалось ослабление развития черной ножки рассады и сосудистого и слизистого бактериоза.

Капуста белокочанная повсеместно поражается сосудистым и слизистым бактериозами. Развитие этих болезней приводит не только к резкому снижению урожая и качества капусты, но и к значительному увеличению потерь в процессе зимнего хранения кочанов [1, 2, 5]. Поскольку применение химических препаратов на капусте крайне ограничено, большой интерес представляют испытание и внедрение в производство приемов биологической защиты растений от этого заболевания. Установлено, что защитным эффектом обладает фитобактериомицин — антибиотик из

группы стрептотрицинов. На основе фитобактериомицина создан биопрепарат фитолавин-100, который рекомендован для обработки семян и корневой системы рассады капусты [8].

В последние годы проводятся работы, посвященные определению возможности использования антагонистических штаммов флуоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* для защиты растений от грибных и бактериальных заболеваний. В большинстве случаев антагонистический эффект связан с продуцированием этими штаммами сидерофоров — соединений, способных образо-

вызвать прочные комплексы (хелаты) с трехвалентным железом и осуществлять их транспорт. В Институте генетики и цитологии АН РБ на основе штамма *Pseudomonas* sp. AP33 разработан биопрепарат ризоплан [4], применение которого в борьбе с корневой гнилью зерновых дало хорошие результаты. В 1990-1993 гг. на кафедре фитопатологии Тимирязевской академии изучали возможность использования ризоплана для защиты капусты от сосудистого и слизистого бактериозов.

Методика

В опытах применяли штаммы бактерий *Pseudomonas* sp. AP33 — продуцент ризоплана, а также штаммы *Pseudomonas* sp. 1 и sp. 2, перспективные для использования в биологической защите растений. Все культуры были получены из Института генетики и цитологии АН РБ и поддерживались на среде Кинга Б.

Культуры бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* — возбудителя сосудистого бактериоза — и *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* — возбудителя слизистого бактериоза — были выделены из образцов пораженной капусты, идентифицированы общепринятыми методами [10] и перенесены на картофельный агар.

Взаимоотношения между возбудителями бактериозов капусты и штаммами *Pseudomonas* испытывали *in vitro* методом отсроченного антагонизма [11]. Каждый штамм *Pseudomonas* высевали в центр чашки Петри на среду Кинга Б и на ту же среду с добавлением FeCl_3 в концентрации 100 мкг/мл. Засеянные чашки инкубировали 24 ч при 25°C, а затем поверхность питательной среды опрыскивали асептически суспензией *E. carotovora* subsp. *carotovora* или *X. campestris* pv. *campestris* плотностью 10^9 клеток в 1 мл. Размер стерильной зоны вокруг колоний *Pseudomonas* sp. измеряли через 24 ч инкубации при 25°C.

В вегетационных опытах сравнивали способность штаммов *Pseudomonas* подавлять развитие бактериозов на капусте.

Развитие слизистого бактериоза оценивали методом отделенных листьев. Рассаду капусты сорта Слава 1305 выращивали в теплице, у растений в возрасте 35 дней отделяли листья среднего яруса и раскладывали их в кюветы на влажную фильтровальную бумагу. Готовили суспензии клеток *E. carotovora* subsp. *carotovora* и штаммов *Pseudomonas* плотностью 10^8 клеток в 1 мл. Затем суспензии клеток патогена смешивали с клеточными суспензиями *Pseudomonas* в равных соотношениях. В контроле суспензию *E. carotovora* subsp. *carotovora* разводили стерильной водой в соотношении 1 : 1. Таким образом, концентрация патогена во всех вариантах составляла 5×10^7 клеток в 1 мл. Инокуляцию бактерий в отделенные листья проводили препаративной иглой, предварительно смоченной в бактериальной суспензии. Кюветы накрывали стеклом и выдерживали при температуре 25°C в течение 48 ч. Учитывали число успешных заражений и площадь поражения. В каждом варианте анализировали 3 повторности по 23 листа в каждой.

Влияние совместной инокуляции *X. campestris* pv. *campestris* и штаммов *Pseudomonas* на развитие симптомов сосудистого бактериоза изучали на листьях рассады самонесовместимых линий капусты Дв8 и Хс1-35 (предоставлены Г.Ф. Монахосом). Готовили бактериальные суспензии патогена и псевдомонад, а затем и их смеси, как было описано выше. Листья отделяли от растений в возрасте 30 дней. Препаративную иглу, смоченную бактериальной суспензией, вводили в центральную жилку листа на расстоянии 2-3 мм от его края. Через 17 дней после заражения измеряли длину некроза жилки. В каждом варианте было 4 повторности, по 6 листьев в каждой.

Биопрепарат ризоплан изготавливали по методике, разработанной А.Н. Перевитюком, со стандартным титром $2 \cdot 3 \times 10^9$ клеток в 1 мл.

Полевые опыты проводили в 1990-1993 гг. в АО «Ленинское» Коломенского района Московской области.

Схема опыта включала следующие варианты: 1 — контроль — без обработки; 2 — гидротермическая обработка семян (50 °С, 30 мин); 3 — протравливание семян фитолавином-100 (4 г/кг); 4 — комплексная обработка ризопланом: обработка семян (20 мл/кг) и 3-кратное опрыскивание растений в поле (0,1 %).

Эффективность предпосевного протравливания контролировали методом прорастивания на увлажненной фильтровальной бумаге. Обработанные семена высевали в пленочную теплицу. В день высадки в открытый грунт учитывали пораженность рассады черной ножкой. Для этого подсчитывали число здоровых и пораженных черной ножкой растений, находящихся внутри рамки 50x50 см. В каждом варианте было 5 повторностей.

При появлении первых признаков заболевания в варианте 4 проводили обработку 0,1 % ризопланом, а последующие опрыскивания — с интервалом 20 дней. Для лучшего смачивания поверхности листьев в рабочий раствор добавляли прилипатель. После высадки в открытый грунт каждые 15-20 дней проводили учет пораженности растений сосудистым и слизистым бактериозами по шкале Студенцова [6, 7]. В каждом варианте имелось 3 повторности по 60 растений.

Результаты

При совместном культивировании в среде Кинга Б патогенных бактерий и штаммов *Pseudomonas* установлено, что штамм 2 подавлял рост *E.carotovora* sbsp. *carotovora*, но не оказывал ника-

кого влияния на рост возбудителя сосудистого бактериоза. Штаммы 1 и AP33 вызывали образование стерильных зон в культурах обоих патогенов. Добавление в среду ионов трехвалентного железа резко снижало антагонистический эффект штамма AP33, что указывало на участие внеклеточных сидерофоров во взаимоотношениях микроорганизмов (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Размер стерильной зоны (мм) при совместном культивировании *in vitro* патогенных бактерий со штаммами *Pseudomonas*

Штамм <i>Pseudomonas</i>	Кинг Б	Кинг Б + FeCl
<i>X.campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
1	7,6±0,3	7,4±0,2
2	0	0
AP33	7,9±0,2	0
<i>E.carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>		
1	5,1±0,2	4,7±0,3
2	6,8±0,3	7,0±0,2
AP33	6,1±0,4	0

Известно, что сидерофоры широко распространены у различных групп аэробных микроорганизмов. Обладая высоким сродством к железу, сидерофоры псевдомонад (например, пиовердин) делают недоступным этот элемент для фитопатогенных грибов и бактерий. Эти флуоресцирующие соединения продуцируются только в субстратах с низким содержанием железа, таких, как среда Кинга Б, которая и предназначена для селективного выделения флуоресцирующих псевдомонад. Поэтому снятие антагонистического эффекта у штамма AP33 при добавлении в среду ионов железа, вероятно, связано с прекращением продуцирования сидерофоров, что подтверждается также изменением внешнего вида колоний бактерий и цвета образуемых ими пигментов.

У штаммов 1 и 2 антагонистическая активность не изменялась в зависимости от концентрации ионов железа, из

чего следует, что в данном случае эффект обусловлен синтезом антибиотиков, но не сидерофоров.

Из табл. 2, где представлены результаты опыта по совместной инокуляции возбудителя слизистого бактериоза и *Pseudomonas* sp., видно, что добавление в инфекционную суспензию клеток *Pseudomonas* sp. снижало процент зараженных листочков и размер поражений. Наиболее сильным это снижение было в варианте со штаммом AP33, где было поражено лишь 28,6 % листьев и значительно меньше был средний размер поражений.

Т а б л и ц а 2

Развитие симптомов слизистого бактериоза на листьях капусты
(сорт Слава 1305, 1990 г., 48 ч после инокуляции)

Вариант	Успешные заражения, %	Площадь поражения, мм ²
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (контроль)	100,0	171,8
То же + <i>Pseudomonas</i> sp.1	83,3	93,3
То же + <i>Pseudomonas</i> sp.2	66,7	112,1
То же + <i>Pseudomonas</i> sp.AP33	28,6	5,0

Аналогичные результаты получены и при изучении характера развития симптомов сосудистого бактериоза в случае совместной инокуляции *X. campestris* pv. *campestris* и штаммов псевдомонад (табл. 3).

Таким образом, лабораторные и вегетационные опыты показали, что штамм *Pseudomonas* sp.AP33 — продуцент препарата ризоплан — обладает сильным ингибирующим действием по отношению к возбудителям сосудистого и слизистого бактериозов. На основании полученных данных можно предположить возможность использования ризоплана для защиты капусты от бактериозов в полевых условиях. Проверку этого предположения проводили в 1990-1992 гг. в АО «Ленинское» Коломенского района Московской области.

Все испытанные способы обработки семян приводили к статистически достоверному снижению зараженности проростков сосудистым бактериозом. Наиболее значительным оно было в случае предпосевной обработки ризопланом. Биологическая эффективность указанного приема в разные годы исследований варьировала от 74,0 до 92,3 % (табл. 4). В этом варианте наблюдали также снижение пораженности проростков альтернариозом.

После протравливания семена высевали в пленочную теплицу. Перед посадкой рассады в поле оценивали ее зараженность черной ножкой. Трехлетние опыты показали, что при обработке семян капусты ризопланом в дозе 20 мл/кг значительно снижается пораженность рассады черной ножкой. Так, распространенность заболевания в 1990 г. в контроле при гидротермической обработке, обработке фитолавином-100 и ризопланом составила соответственно 3,1;

Т а б л и ц а 3

Развитие симптомов сосудистого бактериоза на листьях капусты линий Дв8 и Хс1-35
(1990 г., 17 дней после инокуляции)

Вариант	Дв8		Хс1-35	
	зараженность, %	длина некроза жилки, мм	зараженность, %	длина некроза жилки, мм
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (контроль)	85,7	32,4	90,9	36,4
То же + <i>Pseudomonas</i> sp.1	53,3	16,5	64,0	21,0
То же + <i>Pseudomonas</i> sp.2	74,0	24,7	74,1	22,2
То же + <i>Pseudomonas</i> sp.AP33	12,5	13,0	23,3	18,0

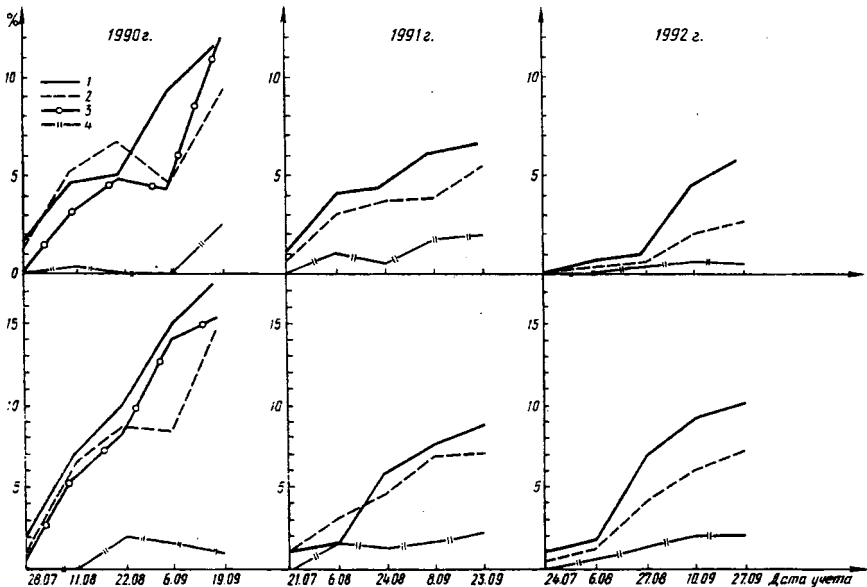
Зараженность (%) семян капусты сосудистым бактериозом и альтернариозом
(сорт Зимовка 1474, АО «Ленинское», 1990-1992 гг.)

Вариант	Сосудистый бактериоз			Альтернариоз		
	1990	1991	1992	1990	1991	1992
Контроль (без обработки)	80,7	17,0	19,6	3,2	6,4	7,9
Гидротермическая обработка, 50 °С, 30 мин	33,2	5,6	10,7	3,5	4,0	2,2
Фитолавин-100, 4 г/кг	46,2	Не опр.	Не опр.	3,6	Не опр.	Не опр.
Ризоплан, 20 мл/кг	16,0	1,3	5,1	0	4,2	2,3

2,5; 1,0 и 0,6 %. Биологическая эффективность ризоплана в 1990, 1991 и 1992 гг. достигала 80,1, 94,0 и 76,0 % и была существенно выше эффективности фитолавина-100 и гидротермической обработки. Этот вывод подтверждает ранее опубликованные данные об антагонистическом действии флуоресцирующих псевдомонад на почвенные грибные патогены [11].

Анализ динамики развития бактериальных болезней за 3 года наблюдений

указывает на высокую эффективность биопрепарата ризоплан (рисунок). Статистическая обработка полученных данных подтвердила существенность отличий этого варианта от контроля и других способов обработки капусты для двух видов заболеваний во все годы испытаний. Биологическая эффективность использования ризоплана в отношении сосудистого бактериоза колебалась от 67 до 94 %, в случае слизистого бактериоза — от 79 до 92 %.



Динамика развития слизистого (вверху) и сосудистого бактериозов в 1990—1992 гг.

1 — контроль; 2 — гидротермическая обработка; 3 — фитолавин-100; 4 — ризоплан.

При проведении опрыскивания ризопланом по первым очагам слизистого бактериоза пораженные мацерированные ткани высыхали через 2 сут и развитие мягкой гнили приостанавливалось. Попытки выделить *E. sagotovoга* subsр. *sagotovoга* из таких высохших тканей непосредственно либо после предварительной инкубации во влажной камере успеха не имели.

Урожайность капусты сорта Зимовка 1474 в 1990 г. в АО «Ленинское» в контроле составила 76,5 т/га, при гидротермической обработке она была на 0,4 т/га выше, в варианте с фитопланом-100 — на 0,9, а в варианте с ризопланом — уже на 9,3 т/га выше. При НСР₀₅ 3,8 т/га это превышение статистически достоверно. Аналогичные данные получены также в 1991-1993 гг.

Учитывая описанные в литературе факты стимулирующего влияния флуоресцирующих псевдомонад на рост, развитие и урожайность сельскохозяйственных растений [9], мы полагаем, что прибавка урожая кочанов в варианте с применением ризоплана обусловлена, с одной стороны, ограничением развития таких болезней, как черная ножка, сосудистый и слизистый бактериозы, с другой — позитивным воздействием штамма *Pseudomonas* sp. AP33 на развитие и урожайность капусты.

Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать использование биопрепарата ризоплан для обработки семян и опрыскивания капусты в фазу кочанообразования с целью защиты растений от бактериальных болезней. Описанная выше технология при-

менения ризоплана защищена авторами патентом № 1793878 [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко Ф.И. Природа и пути инфекции главнейших бактериозов капусты и обоснование способов борьбы с ними. - Харьков: УКР.НИИ соцземледелия, 1940. - 2. Джалилов Ф.С., Монахов Г.Ф., Тивари Р.Д. Вредоносность сосудистого бактериоза капусты. - Изв. ТСХА, 1989, вып. 3, с. 69-72. - 3. Джалилов Ф.С., Корсак И.В., Перебитюк А.Н. Способ защиты капусты от бактериальных болезней. - Патент № 1793878, 08.10.92. - 4. Перебитюк А.Н., Пучко В.Н., Епифанова А.А. Штамм бактерий *Pseudomonas* sp. для получения препарата, используемого для защиты злаковых от возбудителя корневой гнили *Helmintosporium sativum*. - А.с. № 1464468, 08.11.88. - 5. Сильванович Н.А. Сосудистый бактериоз капусты и пути снижения его вредоносности. - Автореф. канд. дис. Самохваловичи, 1989. - 6. Студенцов О.В. Об устойчивости видов и сортов капусты к некоторым бактериальным и грибным заболеваниям. - Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции, л.: ВИР, 1971, т. 45, вып. 1, с. 165-179. - 7. Студенцов О.В., Петровская Н.Н. Устойчивость коллекционных образцов капусты к сосудистому бактериозу в предгорной зоне Северного Кавказа. - Бюл. ВИР, 1981, вып. 3, с. 45-48. - 8. Указания по применению фитолавина-100 в борьбе с болезнями с.-х. культур. М.: МСХ СССР, 1984. - 9. Kloeppeг J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. — Nature, 1980, № 286, p. 885-886. — 10. Lelliott R.A., Stead D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. — Oxford etc.: Black weell sci. publ., 1987. — 11. Rhodes D.J., Logan C. Potato Research, 1987, vol. 30, p. 603-611.

Статья поступила 2 декабря 1993 г.

SUMMARY

Antagonistic activity in some strains of fluorescent pseudomonads to the agents of black rot and mucous bacteriosis of cabbage was measured *in vitro* and on plants growing in the greenhouse. The strain *Pseudomonas* sp. AP33 — producer of biopreparation rhizoplane — had the highest efficiency. Its activity decreased with addition of trivalent iron into ion medium, which points to participation of siderophores in bacteria interrelations. In long-term field tests in the variant with treating seed and plants at the stage of head formation with rhizoplane, more moderate development of wire stem in sprout and of black rot and mucous bacteriosis in heads was observed.