

УДК 521.2:582.951.4:621.039.8

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧЕРНОЙ НОЖКИ
РЕСТОВАСТЕРИУМ РНУТОРНТНОРУМ И ЕГО ЭКЗОПРОДУКТОВ
В СЕЯНЦАХ КАРТОФЕЛЯ**

М. Н. ПРЕДКО, Е. Г. ДАВИДОВА, В. В. РАЧИНСКИЙ
(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Методом радиоактивных индикаторов исследовано проникновение в сеянцы картофеля возбудителя черной ножки *Pectobacterium phytophthorum* и его экзопродуктов. Установлено, что независимо от условий контакта (атмосферное давление, предварительная обработка корней и др.) бактериальной суспензии с растениями клетки возбудителя локализуются преимущественно в корнях, в то время как его экзопродукты достигают верхушки растения и при вакуумин-фльтрации накапливаются преимущественно в стебле.

Среди бактериальных заболеваний картофеля наиболее вредоносна черная ножка, вызываемая в основном бактериями вида *Pectobacterium phytophthorum* [3]. Важным резервом повышения урожайности картофеля и его сохранности является выведение сортов, устойчивых к бактериозам. В этой связи весьма актуальна разработка массовых методов оценки селекционного материала на устойчивость к черной ножке. Ранее нами было показано, что в условиях пониженного давления (10,1 кПа) в течение 2 ч удается индуцировать заболевание ра-

стений [4]. Известно, однако, что экзоферменты возбудителя черной ножки имеют первостепенное значение в проявлении симптомов болезни [5]. Культивирование бактерий возбудителя на жидкой среде с картофельной мезгой или с сахарами приводит к выделению экзоферментов. Основой данного ферментного комплекса является пектинтрансэлиминаза (ПТЭ). Наличие синтеза ПТЭ при отсутствии специфического индуктора позволяет предположить, что образование ПТЭ у возбудителя черной ножки закономерно [1]. Поэтому невыясненными оставались вопросы: могут ли проникать в неповрежденное растение сами бактерии или их экзопродукты и где они локализируются. Для их решения нами был использован метод радиоактивных индикаторов.

Методика

В качестве испытываемого материала использовали семена картофеля комбинации Дозмоделовский×Омега. Растения выращивали на грядах в зимней теплице при температуре 18—20 °С в условиях естественного освещения с досветкой в вечерние часы люминесцентными лампами (общий фотопериод 14 ч).

Сеянцы, имевшие 4—5 листьев, извлекали, обмывали в проточной воде, кончики корней подрезали под слоем воды, чтобы исключить возможность закупорки сосудов пузырьками воздуха.

Возбудителем черной ножки служили бактерии вида *Pectobacterium phytophthorum*. Использованный штамм этого вида высокопатогенный. При заражении им клубней через трое суток на них развиваются симптомы, характерные для черной ножки. Растения картофеля также поражаются этим штаммом. Болезнь проявляется в виде пожелтения нижних листьев и последующего загнивания нижней части стебля.

Бактерии выращивали на минеральной среде Омелянского. Единственным источником углерода и энергии служила 1—6—¹⁴С-глюкоза. В 50 мл минеральной среды растворяли 0,276 г Д-глюкозы, меченной ¹⁴С. В стерильную среду смывали односуточную культуру бактерий, выращенную на твердой среде. Культивировали 48 ч на термостатированной качалке при температуре 24 °С. Биомассу бактерий отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 20 мин и 3 раза промывали средой Омелянского. За время культивирования в клетках в результате ассимиляции ¹⁴С-глюкозы накопилось 11 % исходного количества радиоактивной метки, которая не отмывалась минеральной средой. Это значит, что были получены клетки бактерий, меченные ¹⁴С.

Бактерии с радиоактивной меткой путем разведения в дистиллированной воде довели до концентрации 10⁶ клеток в 1 мл по стандарту мутности. Заражение сеянцев проводили через корневую систему при пониженном (10,1 кПа) и нормальном давлении в течение различного периода времени

(от 0,3 до 24 ч), а также после кратковременной обработки корней (3—5 с) 70 % этанолом с последующей 3-кратной промывкой дистиллированной водой. После заражения в пределах изучаемых экспозиций растения замораживали при температуре —25 °С.

Локализацию бактерий, меченных ¹⁴С, определяли путем предварительной оценки радиоактивности суспензии клеток бактерий, раствора продуктов выделения бактерий, а также измерения радиоактивности в корнях, стеблях и верхушке сеянцев [2]. Для измерения радиоактивности в растениях каждый образец помещали в пробирку, добавляли по 1 мл NaOH и гидролизовали 1 ч. на водяной бане. После гидролиза отбирали 0,4 мл раствора и помещали в бюксы со сцинтиллятором, приготовленным на диоксановой основе. Радиоактивность измеряли на спектрометре «Рак-бета 4215» фирмы ЛКБ-Валлак.

Рассчитывали распределение меченого углерода между указанными частями растения в процентах от общего количества меченого углерода, поступившего в растение. Для определения удельной радиоактивности экстрацеллюлярных продуктов бактериальную суспензию центрифугировали при 10 000 об/мин, а надосадочную жидкость пропускали через бактериальный фильтр, что обеспечивало полное удаление бактериальных клеток. В целях измерения радиоактивности отбирали пробы по 0,2 мл. Для проведения иммуоферментного анализа предварительно проводили сорбирование в лунки полистирольных плат рабочего раствора антист, приготовленных на основе сывороток, высокоспецифичных по отношению к бактериальным клеткам. Инкубировали в течение ночи при температуре 4° С, затем 3 раза промывали специальным раствором. Наливали по 0,1 мл исследуемого раствора в лунки плат и инкубировали 1 ч при температуре 37°С, удаляли раствор с плат и трижды промывали указанным раствором. После добавляли по 0,1 мл субстрата пероксидазы в лунки плат и выдерживали при комнатной температуре до получения окраски, оптическую плотность которой определяли спектрофотометрически [6].

Результаты

Растения подвергали воздействию меченных ¹⁴С бактерий через 2 сут после приготовления бактериальной суспензии на основе использования дистиллированной воды. За это время бактериальные клетки продуцировали в среду продукты метаболизма, также меченные ¹⁴С.

**Локализация меченого углерода в сеянцах картофеля (расп/мин)
при разных способах заражения суспензией, содержащей меченные ^{14}C клетки
и их экзопродукты**

Способ заражения	Целое растение	Корни	Стебель	Верхушка
Время инкубации 0,3 ч				
Вакуумная инфильтрация	2 300 ±250	1 070	833	406
Атмосферное давление	2 600 ±260	850	991	759
Вакуумная инфильтрация+обработка 70 % этанолом	3 349±360	2 180	932	237
Время инкубации 2 ч				
Вакуумная инфильтрация	462+400	2 800	1 330	499
Атмосферное давление	2 354 ±240	1 090	786	480
Вакуумная инфильтрация+обработка 70 % этанолом	10 740 ±920	8 100	2 000	580
Время инкубации 24 ч				
Атмосферное давление	25 700 ±1 900	22 850	1 850	1 000
Атмосферное давление+обработка 70 % этанолом	47 700 ±3 200	43 170	1 430	3 100

Пр и м е ч а н и е . Представлены средние арифметические данные 3 биологических повторностей.

Поэтому сравнивали результаты обработки сеянцев картофеля не только суспензией, содержащей бактериальные клетки и их продукты, но и раствором этих продуктов. Для этой цели бактериальные клетки удаляли из раствора, как указано выше, и определяли удельную радиоактивность полученного раствора меченых продуктов. Она в 13—17 раз меньше удельной радиоактивности исходной суспензии, содержащей, кроме продуктов метаболизма, 10^6 клеток в 1 мл. Иммуноферментный анализ раствора продуктов метаболизма бактерий показал наличие специфической реакции связывания антигенов фильтрата бактерий. Это означает, что в полученном растворе, как и следовало ожидать, содержится специфический комплекс экзоферментов. О поступлении бактерий и их продуктов судили по накоплению меченого углерода в различных частях сеянцев после контакта корневой системы с суспензией или раствором экзопродуктов.

При контакте растений с бактериальной суспензией радиоактивная метка обнаруживается во всех частях растения (корни, стебель, верхушка) и распределяется между ними неравномерно (табл. 1). При кратковременном контакте корней с бактериальной суспензией (0,3 ч) в растениях накапливается сравнительно небольшое количество меченого углерода, на которое уровень давления и обработка корней 70 % этанолом существенного влияния не оказывают. Меченый углерод локализован не только в корнях, но и в стебле и верхушке растений (табл. 1), где доля его достигает 29 % к общему количеству поступившего в растение меченого углерода. Сопоставление этих данных и результатов поступления меченных ^{14}C экстрацеллюлярных продуктов бактерий (табл. 2) показывает, что общий уровень накопления меченого углерода из суспензии при вакууминфильтрации в течение 0,3 ч ниже, чем при инфильтрации в растение раствора, очищенного от бактериальных клеток. В верхушках и корнях в обоих случаях накапливается практически одинаковое количество меченого углерода, но в стебле абсолютное количество поступающего меченого углерода из очищенного раствора в несколько раз выше, чем из суспензии. Оно составляет 60 % к количеству меченого углерода, поступившего в растение. Следовательно, за 0,3 ч в растение (в ткань стебля и верхушку растения) проникают только продукты выделения бактерий, т. е. ферменты — факторы патогенеза [1, 5].

Локализация меченных ^{14}C экзопродуктов бактерий (расп/мин)
при контакте семян картофеля с фильтратом ^{14}C -бактерий

Вид контакта	Время инкубации, ч	Целое растение	Корни	Стебель	Верхушка
Вакуумная инфильтрация	0,3	4507±380	1388	2682	437
То же	2	6650 ±480	1625	4276	661
Атмосферное давление	24	6722 ±700	4720	1567	436

Контакт корней растений с суспензией бактерий в течение 2 ч как при нормальном, так и при пониженном атмосферном давлении, видимо, обеспечивает поступление только экзоферментов, поскольку уровень накопления меченого углерода (табл. 1) не превышает таковой из раствора метаболитов (табл. 2). При двухчасовой вакууминфильтрации бактерии поступают в стебель саженцев только после предварительной обработки корней 70 % этанолом. В этом случае, как видно из данных табл. 1, общее количество поступившего в растение меченого углерода значительно выше, чем при инфильтрации раствора продуктов выделения (табл. 2). Основное количество поступающих ^{14}C -бактерий локализуется в корнях, хотя, возможно, что небольшая часть их попадает и в стебель — уровень накопления меченого углерода при этом в 2—3 раза выше, чем при использовании саженцев с необработанными корнями (табл. 1).

При нормальном атмосферном давлении контакт корней с суспензией обеспечивает поступление в растение не только экзопродуктов, но и самих клеток. Абсолютное содержание меченого углерода в растениях в данном случае значительно больше, чем при фильтрации в течение 0,3 и 2 ч. Бактерии накапливаются в основном в корнях, где обнаруживается 89 % поступившего меченого углерода. В стебле и верхушке растения локализируются, очевидно, только продукты выделения бактерий, поскольку накопление меченого углерода находится на уровне накопления меченого углерода при контакте растения в аналогичных условиях с раствором экзопродуктов (табл. 1 и 2). Обработка корней 70 % этанолом позволяет в 2 раза повысить уровень накопления меченого углерода в растениях при контакте в течение 24 ч в условиях нормального атмосферного давления. И в этом случае основное количество метки обнаруживается в корнях растений (91 %), что свидетельствует о накоплении бактериальных клеток именно в указанной части растения. Абсолютное количество обнаруженного меченого углерода в верхушке, однако, в 3 раза выше, чем при контакте без предварительной обработки корней этанолом, и в 6—7 раз выше, чем при контакте корней с раствором экзопродуктов. Эти данные позволяют предположить, что обработка корней этанолом обеспечивает проникновение бактериальных клеток не только в корни, но и в стебель, и в верхушку растений. Эффективность заражения возбудителем черной ножки после обработки корней этанолом объясняется не только удалением антагонистов патогена, но и понижением естественной устойчивости корней за счет действия спирта на липидный слой мембран клеток поверхности последних.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дорожкин Н. А., Лобанюк А. Г., Новикова Л. М., Михайлова Р. В. Экзоферменты бактерий ряда *Pectobacterium* возбудителей клубневых гнилей картофеля. — Докл. АН БССР, 1982, т. 26, № 1, с. 71—73. — 2. Кобец Е. В., Давидова Е. Г., Рачинский В. В. Исследование заражения семян сосны чистой культурой гриба — возбудителя корневой губки методом радиоактивных индикаторов. — Изв. ТСХА, 1979, вып. 6, с. 125—132. — 3. Панкова К. В., Шнейдер Ю. И., Воловик А. С., Шмыгль В. А. Болезни картофеля. — М.: Колос, 1980, с. 115—127. — 4. Предко М. Н. Оценка семян картофеля на устойчивость к черной ножке методом вакуумной инфильтрации. — Деп. во ВНИИТЭИСХ, 1986, 16/29, ВС—86. —

5. Рагозина И. И. Экзоферменты *Pectobacterium phytophthorum* (Appel) и их роль в патогенезе черной ножки картофеля. — Автореф. канд. дис. М., 1970. — 6. Т р о - ф и м е ц Л. Н., Князева В. П., В а р и - ц е в Ю. А. Диагностика вирусов картофеля методом иммуноферментного анализа. — Науч. тр. НИИ картофельного хозяйства, М., 1986, с. 81—86.

Статья поступила 30 декабря 1986 г.

SUMMARY

Penetration of *Pectobacterium phytophthorum* agent and its exoproducts into potato seedlings was studied by radiotracer technique. It is found that whatever the nature of contact between bacterial suspension and the plants is (atmospheric pressure, previous root treatment etc.), the agent's cells are mainly localized in roots, while its exoproducts get to the top of the plant and under vacuum infiltration accumulate mostly in stems.