

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ЛИСТЯ ЯБЛУНІ ЗА ВПЛИВУ ШТАМІВ *BACILLUS THURINGIENSIS* ТА КОНФІДОРУ ЕКСТРА*

А.Б. Крижанівський

Інститут агроекології і природокористування НААН

*Досліджено вплив біопрепаратів інсектицидної дії на основі штамів *Bacillus thuringiensis* та хімічного інсектициду Конфідор Екстра на ферментативну активність листя яблуні. Встановлено, що біопрепарати позитивно впливають на ферментативну активність, а отже й на фізіологічний стан рослин завдяки зміцненню її антиоксидантної системи та фітоімунітету. Обробка яблунь Конфідором Екстра не мала істотного впливу на пероксидазну та поліфенолоксидазну активність, а її показники були на рівні контролю.*

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, яблуня, ферментативна активність, Конфідор Екстра.

Обробка насаджень яблуні засобами захисту від шкідників і хвороб є невід'ємним елементом технології вирощування цих культур. Але під час обприскування в біоценоз вносяться чужорідні біологічні та хімічні агенти, які порушують природний фон і можуть спричинити зміни фізіологічних процесів рослин.

За обробки рослин рідкою культурою *B. thuringiensis* спори та кристали ендотоксину можуть зберігатися тривалий час [1] як компонент природної мікрофлори [2], що може впливати на фізіологічні процеси, які відбуваються в клітинах листків рослини. Одним з показників таких змін є пероксидаза, що чутливо реагує на різноманітні форми впливу на рослину. Цей фермент концентрується у клітинах епідермісу, провідної тканини та замикальних клітинах прориху.

Серед найважливіших процесів формування й розвитку захисних реакцій у клітинах рослин є активація пероксидази як протидія стресу [3], адже за несприятливого впливу чинників навколишнього природного середовища (НПС) вона змінює свою активність пропорційно із збільшенням ступеня антропогенного навантаження

на рослину, що свідчить про їх можливу взаємозалежність [4].

Поліфенолоксидаза не входить до складу антиоксидантних систем, але бере участь в окисленні фенольних сполук. В умовах стресу (опромінення, вплив низьких температур, механічне пошкодження, зміни хімічного складу НПС) її активність збільшується, що сприяє утворенню захисних бар'єрів рослини [5].

Тому метою роботи було вивчення пероксидазної та поліфенолоксидазної активності листя яблуні, що надає можливість оцінити адаптаційні властивості впливу чинників НПС.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Польові дослідження проводили на базі Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України в 2014 р. на яблунях сорту Джонаголд. Вибірка становила 10 дерев, з триразовою повторністю.

Матеріалом для досліджень були культури штамів *B. thuringiensis* 0371, 0376, 0408 та 787, отримані з Інституту сільського господарства Криму НААН.

Ентомопатогенний штам *B. thuringiensis* 787 продукує специфічний білковий кристалічний ендотоксин для листогризух шкідників з рядів *Coleoptera* та *Lepidoptera*. Штами *B. thuringiensis* 0371, 0376, 0408, крім білкового кристалічного ендотоксину, продукують неспецифічний водорозчин-

© А.Б. Крижанівський, 2015

* Науковий керівник — д-р с.-г. наук, професор О.В. Шерстобова.

ний екзотоксин широкого спектра дії на шкідливих комах [6].

Обприскування рослин здійснювали рідкими культурами *B. thuringiensis* 0371, 0376, 0408 та 787 з розрахунку 9 л/га бактеріальної суспензії з титром спор *B. thuringiensis* у робочій рідині 0,4-109 КУО. Витрата робочої рідини – 900 л/га. Для порівняння використовували інсектицидний препарат Конфідор Екстра (при нормі використання препарату 63 г/га та витраті робочої рідини 900 л/га). Як контроль використовували дерева, що обробляли водою. Обробку яблунь здійснювали у вечірній період доби за безвітряної погоди, при температурі повітря 25–26°C, у найбільш уразливу фазу розвитку шкідника – гусениці [7] за допомогою обприскувача SADKO SPR-5 (5 л). Листки для аналізу відбирали починаючи з наступного дня після обприскування, з інтервалом у два дні.

Пероксидазну та поліфенолоксидазну активність листя яблуні визначали методом А.Н. Бояркіна [8].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив рідких культур на основі ентомопатогенних штамів *B. thuringiensis* та хімічного інсектициду Конфідор Екстра на пероксидазну та поліфенолоксидазну активність листя яблуні сорту Джонаголд визначали за допомогою аналізу, що проводили через кожні дві доби впродовж 12 діб після обробки рослин.

Отримані результати засвідчили про збільшення пероксидазної активності у перші вісім діб після обприскування рідкими культурами штамів *B. thuringiensis* (Bt) 0371, 0376 та 0408, які в своїх метаболітах, крім специфічного білкового ендотоксину, містять водорозчинний термостабільний β -екзотоксин, що є нуклеотидом аденінової природи і має властивості, характерні хімічним інсектицидам (табл. 1).

Штам Bt 787, що не синтезує β -екзотоксин, сприяв збільшенню пероксидазної активності на четверту добу і помірному її зниженню до восьмої доби.

Через дві доби спостерігався різкий спад ферментативної активності листя, обробленого штамми з β -екзотоксином. Штам Bt 787, навпаки, почав стимулювати пероксидазну активність, внаслідок чого вона зростала впродовж 8–12-ої доби після проведення обробки рослин.

На 12-ту добу штамми Bt 0371, 0376, 0408 також сприяли збільшенню ферментативної активності, і показники їхнього впливу були приблизно на одному рівні.

Аналізуючи вплив досліджуваних інсектицидів, слід відзначити низьку ферментативну активність листя рослин за обробки хімічним інсектицидом Конфідор екстра, що впродовж усього дослідження була нижчою від контролю в усіх варіантах обробки проти шкідників. Тому можна зробити висновок, що хімічний агент інгібує активність ферментної системи.

Таблиця 1

Вплив інсектицидів на пероксидазну активність листя яблуні, мг/г за 1 год.

Варіант	Період відбору листків (доба після обробки)					
	2 доба	4 доба	6 доба	8 доба	10 доба	12 доба
Контроль	1,40±0,02	1,22±0,04	1,43±0,12	1,40±0,12	1,33±0,04	1,59±0,08
Bt 0371	1,18±0,14	1,49±0,02	1,58±0,01	1,69±0,07	1,33±0,06	1,64±0,07
Bt 0376	1,34±0,18	1,41±0,04	1,60±0,04	1,61±0,03	1,41±0,03	1,60±0,03
Bt 0408	1,19±0,03	1,39±0,03	1,51±0,07	1,61±0,08	1,30±0,04	1,62±0,08
Bt 787	1,29±0,10	1,49±0,03	1,37±0,04	1,35±0,06	1,52±0,04	1,77±0,09
Конфідор Екстра	1,02±0,06	1,15±0,04	1,16±0,01	1,11±0,01	1,03±0,05	1,43±0,03

Вплив інсектицидів на поліфенолоксидазну активність листя яблуні, мг/г за 1 год.

Варіант	Період відбору листків (доба після обробки)					
	2 доба	4 доба	6 доба	8 доба	10 доба	12 доба
Контроль	0,069±0,005	0,074±0,003	0,110±0,010	0,087±0,009	0,074±0,003	0,077±0,012
Vt 0371	0,081±0,008	0,089±0,005	0,118±0,011	0,096±0,001	0,091±0,002	0,086±0,006
Vt 0376	0,080±0,003	0,081±0,005	0,108±0,002	0,104±0,001	0,081±0,003	0,091±0,001
Vt 0408	0,080±0,007	0,089±0,002	0,111±0,002	0,109±0,002	0,093±0,007	0,092±0,004
Vt 787	0,084±0,007	0,089±0,005	0,095±0,005	0,083±0,007	0,097±0,006	0,070±0,007
Конфідор Екстра	0,089±0,005	0,084±0,002	0,107±0,008	0,083±0,006	0,074±0,006	0,107±0,003

Подібні дослідження впливу штамів *B. thuringiensis* на ферментативну систему проводились на картоплі [9], які підтверджують незначне збільшення активності ферменту. Так, поступове і незначне підвищення активності пероксидази під дією біологічних агентів упродовж другої – восьмої доби порівняно з контролем свідчить про стимулюючу дію біоінсектицидів на фермент. Це явище можна розглядати як імунологічну протидію рослини на мікробіологічний чинник, який не є для неї істотним стресором, а навпаки, стимулює імунітет і посилює її стійкість [10].

Відомо, що підвищення поліфенолоксидазної активності рослин, оброблених біоінсектицидами, може проявлятися як протидія рослин на інфікування патогенними мікроорганізмами [11]. Про це свідчать результати наших досліджень, де спостерігається стрімке підвищення ферментативної активності листя рослин упродовж шести діб після їх обробки (табл. 2).

Упродовж наступного періоду проведення дослідів спостерігався помірний спад активності поліфенолоксидази у варіантах,

оброблених штамми Vt 0371, 0376, 0408. На восьму добу після обробки дерев штамом Vt 787 теж спостерігалось незначне зниження активності ферменту, що через дві доби змінилось підвищенням до попереднього рівня.

На 12-ту добу вплив досліджуваних штамів мав тенденцію до зрівняння з контролем.

Обробка яблунь хімічним інсектицидом Конфідор Екстра не мала значного впливу на поліфенолоксидазну активність порівняно з контролем упродовж 10 діб. На 12-ту добу активність поліфенолоксидази значно зросла.

ВИСНОВКИ

Отримані результати свідчать, що нанесені на листя яблуні рідкі захисні біопрепарати на основі штамів *B. thuringiensis* не спричиняють стресового стану рослини, а навпаки, здійснюють помірний стимулюючий ефект на ферментативну активність листя, що свідчить про зміцнення фізіомунітету та стійкості до інших стрес-чинників.

ЛІТЕРАТУРА

1. Крижанівський А.Б. Алелопатична дія листя яблуні на ентомопатогенні штами *Bacillus thuringiensis* / А.Б. Крижанівський // Агроєкологічний журнал. – 2015. – № 2. – С. 117–120.
2. Pruett C.J.H. Effect of exposure to soil potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis* / C.J.H. Pruett, H.D. Burges, C.H. Wyborn // J. Invertebr. Pathol. – 1980. – No. 35. – P. 168–174.
3. Активність пероксидази і каталази у сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* / В.М. Васильюк, О.Д. Кругова, Н.М. Мандровська, С.Я. Коць // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 4. – С. 334–342.

4. Рачковская М.М. Изменение активности некоторых оксидаз как показатель адаптации растений к условиям промышленного загрязнения / М.М. Рачковская, Л.О. Ким // Газоустойчивость растений. — Новосибирск: Наука, 1980. — С. 117–126.
5. Дыхательные ферменты / [под ред. В.А. Энгельгардта]. — М.: Изд-во иностранной литературы, 1952. — С. 235–266.
6. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* / Р.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка. — СПб.—Пушкин: Научное издание «Инновационный центр защиты растений», 2009. — 252 с.
7. Методики випробування і застосування пестицидів / [С.О. Трибель, Д.Д. Сігарьова, М.П. Секун та ін.]; за ред. проф. С.О. Трибеля. — К.: Світ. — 2001. — 448 с.
8. Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы / А.Н. Бояркин // Биохимия. — 1951. — Т. 16, № 4. — С. 352–357.
9. 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.
10. Bartscher A. Rhizobial signals convert pathogens to symbionts at the legume interface / A. Bartscher, H. Kobayashi, W.L. Broughton // Plant Microbiology / [Ed. by M. Gillens, A. Holmes.] — Abingdon: Garland Science / BIOS Scientific Publishers, 2001. — P. 19–31.
11. Effect of coniferous extract on potato plants / I.A. Graskova, E.V. Kuznetsova, M.A. Zhivetiev et al. // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. — 2009. —Vol. 5, No. 1–2. — P. 38–44.

REFERENCES

1. Kryzhanivskiy A.B. (2015). *Alelopatychna diia lystia yabluni na entomopatohenni shtamy Bacillus thuringiensis* [Alelopatychna action of apple trees leaves on entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis*]. *Ahroekolohichniy zhurnal* [Agroecological journal], No. 2, pp. 117–120 (in Ukrainian).
2. Pruett C.J.H., Burges H.D., Wyborn C.H. (1980). Effect of exposure to soil potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, No. 35, pp. 168–174 (in English).
3. Vasyliuk V.M., Kruhova O.D., Mandrovska N.M., Kots S.Ya. (2007). *Aktyvnist peroksydazy i katalazy u soi, inokulovanoi Tn5-mutantamy Bradyrhizobium japonicum* [Peroxidase and catalase activity in soybean, inoculated by Tn5-mutants *Bradyrhizobium japonicum*]. *Fyzyolohyia y byokhymyia kult. Rasteniy* [Physiology and biochemistry of the crops]. Vol. 39, No. 4. pp. 334–342 (in Ukrainian).
4. Rachkovskaya M.M., Kim L.O. (1980). *Izmenenie aktivnosti nekotorykh oksidaz kak pokazatel adaptatsii rasteniy k usloviyam promyshlennogo zagryazneniya* [Changes in the activity of some oxidases as an indicator of plant adaptation to the conditions of industrial pollution]. *Gazoustoychivost rasteniy* [Gas resistant plants]. Novosibirsk: Nauka Publ., pp. 117–126 (in Russian).
5. Engelgardta V.A. (1952). *Dykhatelnye fermenty* [Respiratory enzymes]. Moscow: Izd-vo inostrannoy literatury Publ., pp. 235–266 (in Russian).
6. Kandybin R.V., Patyka T.I., Yermolova V.P., Patyka V.F. (2009). *Mikrobiokontrol chislennosti nasekomykh i ego dominanta Bacillus thuringiensis* [Mikrobiokontrol of insects and dominant *Bacillus thuringiensis*]. Sankt-Peterburg, Pushkin: Innovatsionnyy tsentr zashchity rasteniy Publ., 252 p. (in Russian).
7. Trybel S.O., Siharova D.D., Sekun M.P. (2001). *Metodyky vyprobuvannia i zastosuvannia pestytsydiv* [Methods of testing and use of pesticides]. Kyiv: Svit Publ., 448 p. (in Ukrainian).
8. Boyarkin A.N. (1951). *Bystryy metod opredeleniya aktivnosti peroksidazy* [Quick method for determining peroxidase activity]. *Biokhimiya* [Biochemistry]. Vol. 16, No. 4. pp. 352–357 (in Russian).
9. Kryzhko A.V. (2011). «Environmental aspects of the use of *Bacillus thuringiensis* in the system of protection of potato from the Colorado potato beetle», Abstract of Doctor of Agricultural Sciences dissertation, Ecology, Kyiv, Ukraine, p. 176 (in Ukrainian).
10. Bartscher A., Kobayashi H., Broughton W.L. (2001). Rhizobial signals convert pathogens to symbionts at the legume interface. *Plant Microbiology* Abingdon: Garland Science. BIOS Scientific Publishers, pp. 19–31 (in English).
11. Graskova I.A., Kuznetsova E.V., Zhivetiev M.A. (2009). Effect of coniferous extract on potato plants. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. Vol. 5, No. 1–2, pp. 38–44 (in English).