

¹Закарпатський територіальний відділ карантину рослин ІЗР УААН²Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН³Інститут мікробіології і вірусології НАНУ,

ЕНДОФІТНІ БАКТЕРІЇ, ЯКІ СПРИЧИНЮЮТЬ АНОМАЛІЇ РОЗВИТКУ РОСЛИН КАРТОПЛІ ПРИ МІКРОКЛОНАЛЬНОМУ РОЗМНОЖЕННІ

Досліджено аномалії розвитку рослин при мікроклональному розмноженні картоплі. З уражених рослин ізольовані ендоефітні бактерії, які віднесені до родів *Bacillus* та *Clavibacter*. Встановлено, що у спричиненні описаних аномалій росту пробіркових рослин картоплі бере участь *Pseudomonas fluorescens*.

Постановка проблеми

Картопля є однією з основних сільськогосподарських культур, що широко використовується в продовольчих, технічних та кормових цілях. Завдяки особливостям біології картоплі, збудники більшості захворювань перебувають у паразитично-активній формі протягом цілого року і здатні накопичуватися в бульбах та передаватися з насіннєвим матеріалом.

Для отримання здорового посадкового матеріалу, а також створення і підтримання колекцій генофонду картоплі, широко використовується метод культури апікальних меристем у різних його модифікаціях. Однак бактеріальне забруднення може нівелювати переваги культури *in vitro*. Джерелом інфекції може бути як епіфітна, так і ендоефітна мікрофлора, часто в латентному стані. Збудники найнебезпечніших для картоплі бактеріальних захворювань *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum* і *Streptomyces scabies* можуть роками виживати в культурі тканин картоплі без ознак бактеріального ураження на рослинах, мікробульбах і не виявлятися при висіванні на середовищі [2, 6, 9, 10].

© М. І. Демчинська, І. В. Демчук, О. М. Петренко, І. В. Волкова, С. М. Мороз

Під час роботи з колекційними зразками картоплі, оздоровленої біотехнологічними методами у відділі фітовірусології і біотехнології ІСГМ УААН, неодноразово спостерігали аномальний розвиток пробіркових рослин, що проявляється в утворенні наростів на стеблах і жилках листків, які згодом некротизуються. При сильному ураженні рослина деформується, її ріст припиняється. Такі пошкодження можуть завдавати значних збитків лабораторіям мікроклонального розмноження сортів картоплі.

Попередні дослідження показали, що описані аномалії розвитку пробіркових рослин картоплі не пов'язані з вірусною інфекцією і не носять фізіологічний характер. При обстеженні зразків пошкоджених тканин у світловому мікроскопі виявлені паличкоподібні рухливі бактерії.

Оскільки мікробне зараження в культурі тканин є важливою проблемою як для науково-дослідних, так і для виробничих лабораторій, завданням нашої роботи було виділення, вивчення та ідентифікація ізолятів бактерій, які обумовлюють виникнення аномалій розвитку пробіркових рослин, зниження темпів росту та якості рослин *in vitro*.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були ізоляти бактерій, виділені з пробіркових рослин картоплі сортів Зарево, Ласунак, Фантазія, Синьоглазка, Повінь, Леді Розета, Обрій, Чарівниця, Кобза з ознаками аномального розвитку.

Виділення бактерій проводили шляхом розкладання шматочків пробіркових рослин картоплі на тверде поживне середовище в чашках Петрі та методом розтирання з наступним висівом на м'ясо-пептонний (МПА), картопляний та гороховий агар. Чашки інкубували в термостаті при 30 та 37 °С. Через 5–7 діб колонії, які виростили в чашках, після перевірки на бактеріологічну чистоту відсівали для подальших досліджень.

Патогенні властивості виділених ізолятів визначали методом штучного зараження бульб картоплі (сорт Агрія) в лабораторних умовах, титр бактеріальної суспензії 10^7 – 10^9 кл/мл. Облік проявлення штучного зараження проводили за 4–бальною шкалою [4]. Надчутливу реакцію проводили на листках тютюну за методом Клемента [7].

Морфологічні, культуральні, фізіологічні та біохімічні властивості виділених ізолятів вивчали за загальноприйнятими методиками [1, 8] і порівнювали їх з властивостями типових і представницьких штамів *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7755, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 8982, *Ralstonia solanacearum* 9049, 9081, *Pseudomonas fluorescens* 8573, отриманих з колекції бактерій відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Для ідентифікації збудників користувалися визначником бактерій [5].

Перевірку наявності антагоністичних властивостей ізолятів по відношенню до штамів фітопатогенних бактерій здійснювали методом відстроченого антагонізму. В якості тест-культур використано колекційні штами фітопатогенних бактерій: *R. solanacearum* 9049, 9081, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7757, 7755, *E. carotovora* subsp. *carotovora*

8982. Зону інгібування тест-культур вимірювали через 48–72 год. інкубації при 27 °С.

Результати досліджень

Явище аномального росту пробіркових рослин картоплі спостерігається майже на всіх сортозразках, але найбільше воно виражене на сортах Зарево, Ласунак, Фантазія, Синьоглазка, Повінь, Леді Розета, Обрій, Чарівниця, Кобза, починаючи з фази 3–4 листків. На жилках листків і стеблах уражених рослин утворюються спочатку крихкотілі водянисті білі нарости, які згодом підсихають і темніють. Через кілька днів на місці підсохлих наростів утворюється досить глибокий коричневий некроз. Якщо відбувається некротизація верхівки або листових пазух, то гинуть точки росту. Часто ці явища супроводжуються утворенням “вузликів” на корінцях, які подібні до наростів верхньої частини рослин, або мають іншу морфологію. Всі ці пошкодження призводять до затримки або припинення росту і часом до загибелі рослин, чим завдають значної шкоди виробничим лабораторіям мікроклонального розмноження сортів картоплі. Найбільше наведених аномалій розвитку спостерігається при підвищенні температури повітря в культивацийній кімнаті до + 25 – 30 °С.

Обстеження в світловому мікроскопі зрізів пошкоджених тканин стебла, жилок і корінців на різних стадіях розвитку наростів показало, що в будь-якій частині рослини відбувається сильне надмірне розростання провідної тканини, яке виходить назовні через розриви епідермісу. Зі свіжих “наростів” стебел в стерильних умовах були виготовлені нативні давлені препарати, мікроскопія яких показала наявність у них паличкоподібних рухливих бактерій.

З тканин пробіркових рослин картоплі з описаними симптомами було отримано ряд ізолятів бактерій, які за характером росту на поживних середовищах, біохімічними та патогенними властивостями віднесено до: *P. fluorescens*, *Bacillus* sp., *Clavibacter* sp. (табл.).

Ізоляти *Bacillus* sp. 1, 6, 7 і 9 на картопляному агарі формують зморшкуваті непрозорі колонії світло-кремового кольору з хвилястим краєм. На м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) вони ростуть у вигляді зморшкуватої плівки з утворенням пластівцевого осаду. У світловому мікроскопі бактерії *Bacillus* sp. 1, 6, 7 і 9 – грампозитивні спороутворюючі палички, клітини розміщені поодинокі або інколи утворюють ланцюжки з 2–3 клітин. Вони оксидазонегативні, каталазопозитивні, розріджують желатину, редукують лакмусову сироватку та використовують саліцин. На бульбах картоплі в місці внесення бактеріальної суспензії виникає незначне сухе, трохі вдавнене побуріння.

P. fluorescens – частий супутник фітопатогенних бактерій при ураженні ними сільськогосподарських культур. Бактерія виділяється також при дослідженні ендofітної фази фітопатогенних бактерій апікальних меристем інших рослин, зокрема яблуні [3]. На картопляному агарі бактерії виділені нами штамом *P. fluorescens* 2 формують прозорі світлі колонії круглої форми з рівним краєм, на МПБ ростуть у вигляді кільця, з

незначним осадом, на середовищі Кінг В продукують екзогенний флуоресцентний пігмент.

Таблиця. Порівняльна характеристика фізіолого-біохімічних властивостей ізолятів ендоспориальних бактерій

Властивості	Ізоляти бактерій		
	<i>Bacillus sp.</i> 1, 6, 7, 9	<i>P. fluorescens</i> 2	<i>Clavibacter sp.</i> 3, 5
Забарвлення за Грамом	+	-	+
Рухливість	+	+	-
Ендоспори	+	-	-
Оксидаза	-	+	-
Каталаза	+	+	+
Амілаза	+	-	+
Целлюлаза	-	-	-
Протопектиназна активність	-	-	-
Редукція нітратів	-	+	-
Лакмусова сироватка	+	+	-
Утворення індолу	-	-	-
Розрідження желатини	+	+	+
Використання джерел вуглецю:			
глюкози :			
аеробно	-	+	+
анаеробно	-	-	-
рамнози	-	+	-
лактози	-	-	+
мальтози	-	-	-
сахарози	-	-	+
трегалози	-	+	-
рафінози	-	+	+
дульцитолу	-	-	-
інозитулу	-	+	-
манітолу	-	+	-
сорбітолу	-	+	-
саліцину	+	+	-
Флуоресцентний пігмент	-	+	-
Антагонізм до тест-культур	-	-	-

Примітка: "+" – позитивний результат; "-" – негативний результат

На середовищі Гісса *P. fluorescens* 2 використовує глюкозу, рамнозу, сахарозу, манітол, сорбітол, саліцин. Каталазо- та оксидазопозитивний. Не виявляє протопектиназної активності і не гідролізує крохмаль. У світловому мікроскопі – грамнегативні палички з джгутиками, розташованими на одному з полюсів. Морфологію та розміри бактерій *P. fluorescens* 2 вивчали також за допомогою електронної мікроскопії. Середні розміри бактеріальної клітини становлять $1,16 \pm 0,032 \times 0,56 \pm 0,021$ мкм, а довжина полярного джгутика – до 10 мкм. Бактерії мають щільну слизову капсулу товщиною біля 0,5 мкм. Штам *P. fluorescens* 2 не проявляє

патогенних властивостей на бульбах картоплі і не викликає реакції надчутливості на листі тютюну, але викликає нарости на пробіркових рослинах картоплі *in vitro*.

Штами *Clavibacter* sp. 3 та 5 на КА формують жовті круглі колонії з рівним краєм. У світловому мікроскопі це грампозитивні палички, не рухливі, не утворюють спор. Вони каталазопозитивні та оксидазонегативні. Гідролізують крохмаль, розріджують желатину, не утворюють індол. Використовують глюкозу, сахарозу, лактозу та рафінозу. Не проявляють патогенних властивостей при інокуляції бульб картоплі.

Жоден із штамів виділених ендofітних бактерій не виявляє антагоністичної дії щодо тест-культур фітопатогенних бактерій *R. solanacearum* 9049, 9081, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7757, 7755, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 8982.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Підсумовуючи викладене, слід зазначити, що картоплі, як і іншим рослинам, притаманна певна ендofітна мікрофлора, яка під час ініціації культури *in vitro* залишається в експлантах і регенерантах та передається під час живцювання рослин, а також мікробульбами. В умовах *in vitro* ці бактерії у певних концентраціях можуть проявляти патогенні властивості щодо рослини-господаря. Встановлено, що у спричиненні аномалій росту пробіркових рослин картоплі беруть участь бактерії *P. fluorescens*. Однак для з'ясування ролі інших ізолятів у патологічному процесі та розробки методів звільнення від ендofітних патогенів необхідні **подальші дослідження**. Перспективним є також пошук серед бактеріальних ендofітів антагоністів до фітопатогенних бактерій.

Література

1. Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – Киев: Наук. думка, 1968. – 316 с.
2. Бубен М.В., Жукова М.И., Серета Г.М. Актуальность проблемы латентных инфекций в культуре картофеля // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції “Інтегрований захист рослин на початку ХХІ століття”. – Київ, 2004. – С. 321–324.
3. Кондратенко П.В., Колісниченко О.В., Гвоздяк Р.І., Лукач М.І. Мікрофлора експлантів яблуні // Захист рослин. – 2000. – №8. – С. 18–19.
4. Немерицька Л.В. Різновиди змішаних гнилей // Карантин і захист рослин. – 2004. – № 8. – С. 22–23.
5. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Криг, П. Сниг: В 2 т. 9-е изд. – М.: Мир, 1997.
6. Grimm F., Baumann B. Studies of the detection of latent contamination of *in vitro* potato plants by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (van Hall) Dye // Potato Research. – 1991. – 34, N 1. – P. 47–51.
7. Klement Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas* // Nature. – 1963. – 199, N 4890. – P. 299–300.

8. *Klement Z., Rudolph K., Sands D.S.* Methods in phytobacteriology. – Budapest: Akademia kiado, 1990. – 568 p.
9. *Stead D.* Bacterial diseases of potato: relevance to *in vitro* potato seed production // *Potato Research.* – 1999. – 42, N 4. – P. 449–456.
10. *Weber J., Schenk G.* Symptomless spreading of the soft rot pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye in potato plants grown *in vitro* // *Archives of Phytopathology Pflanzenschutz.* – 1999. – 24. – P. 395–402.