

ЕПІФІТНА І ЕНДОФІТНА МІКРОФЛОРА ЗДОРОВОГО ЗЕРНА ТА ВЕГЕТУЮЧИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ

*Досліджена бактеріальна мікрофлора пшениці. Ідентифіковані бактерії, які знаходяться на поверхні та у внутрішніх тканинах пшениці. Показано, що сапрофіти впливають на інфекційний процес, який спричинює збудник базального бактеріозу пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *atrogena*.*

Постановка проблеми

Відомо, що бактеріальні хвороби наносять значної шкоди сільськогосподарським культурам. Але крім збудників захворювань на поверхні і у внутрішніх тканинах рослин мешкає різноманітна мікрофлора, яка здатна інтенсивно розвиватися. Характерною особливістю епіфітної мікрофлори є те, що вона використовує мінеральні і органічні речовини, які виділяються рослиною в залежності від умов навколишнього середовища. Епіфітні популяції стійкі до високих концентрацій фітонцидів, витримують періодичні колювання вологості. Крім того, різні метаболіти рослин можуть регулювати розвиток епіфітної мікрофлори – стимулювати або інгібувати його. Склад епіфітної мікрофлори може змінюватися в залежності від зміни фізіологічних та біохімічних процесів, які відбуваються в рослині. В останні роки дослідники все більше вивчають ендоефітну мікрофлору, яка локалізована всередині тканин різних органів сільськогосподарських культур і не викликає явних ознак інфекційного процесу [11, 15]. Видовий склад епіфітної та ендоефітної популяцій впливає на ураження рослин фітопатогенами. Захищеність рослин від фітопатогенів залежить від наявності у складі мікрофлори рослин мікроорганізмів з антагоністичними властивостями та здатністю швидко колонізувати поверхню рослин і мати високу конкурентну спроможність. Не дивлячись на домінуюче положення зернових серед сільськогосподарських культур

комплексне дослідження насіння і тканин вегетуючих рослин пшениці на наявність епіфітних і ендоефітних мікроорганізмів не проводилось.

Мета роботи – дослідити наявність патогенної і сапрофітної бактеріальної мікрофлори на поверхні і внутрішніх тканинах зовні здорового насіння і вегетуючих рослин пшениці.

Матеріали і методи досліджень

Для виділення епіфітної та ендоефітної бактеріальної мікрофлори нами відібрано насіння 10 сортів пшениці з різних географічних зон її вирощування, які використовуються в сільському господарстві України – Харківська 37, Поліська 29, Поліська 90, Альбатрос, Херсонська остиста, Херсонська 86, Деснянка, Рання 93, Катюша, Лютесценс. Епіфітну мікрофлору ізолювали методом змивів. Для цього брали 10 г насіння, добавляли 100 мл води або 5 г листя пшениці на 200 мл води, збовтували на качалці 20 хв при 240 об/хв і висівали в чашки Петрі з картопляним агаром нерозведену суспензію змиву і серію десятикратних розведень. Ізоляцію ендоефітних бактерій проводили за розробленою нами методикою [1] – поверхнево стерилізували зерна пшениці: промивали водогінною водою (15 хв), потім стерильною водогінною водою (1 хв), витримували в 70 %-вому етиловому спирті (5 хв) та в 16,5 %-вому перекисі водню (20 хв), змочували в спирті і обпалювали двічі. Продезинфіковане насіння розтирали асептично в ступці з наступним посівом розтертої маси на картопляний агар (КА), стерильне із зовні насіння також пророщували в стерильних умовах вологої камери в чашках Петрі. Висівали на КА екsudати, які утворювались на коренях чи проростках пшениці та відбирали мікроорганізми, які вирости після 4–5 діб культивування. Для подальших досліджень відбирали всі типи колоній, які вирости. Особливу увагу звертали на ті колонії бактерій, які найчастіше зустрічались. Патогенні властивості ізолюваних бактерій визначали в польових умовах на пшениці сорту Харківська 37 в фазі виходу колосу в трубку. Для штучного зараження використовували бактеріальну суспензію клітин в концентрації 1×10^9 КУО/мл. Результати зараження враховували через 14 днів після інокуляції за 4-бальною шкалою [7]. Для сумісної інокуляції використовували різні співвідношення бактеріальної суспензії патогена і сапрофіта (концентрація 1×10^9 КУО/мл). Реакцію надчутливості на листях тютюну проводили за методом Клемента [13].

Морфологічні, культуральні, фізіологічні та біохімічні властивості виділених ізолятів вивчали за методами, описаними в роботах Герхарда [2–3] та Клемента із співавторами [14]. Ідентифікацію досліджуваних бактерій проводили в порівнянні з властивостями колекційних штамів та наведеними у визначнику бактерій [9].

Для постановки реакції преципітації в гелі антигени фітопатогенних бактерій одержували шляхом руйнування клітин ультразвуком та за модифікованим методом Грассе [5]. Досліджували термолабільні та

термостабільні антигени. Використовували ОН-антисироватки до штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 8281 та *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030 (серогрупа I), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7864 (серогрупа II), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7836 (серогрупа IV), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8116 та *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9031 (серогрупа V), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI).

Результати досліджень

Виявлено, що поверхня зовні здорового насіння пшениці досліджуваних сортів заселена різною кількістю мікроорганізмів. У залежності від сорту пшениці виявляли $0,8 \times 10^5$ – 1×10^7 колоніє-утворюючих одиниць (КУО) в 1 г зерна. Основну частину бактерій склали жовто-пігментовані *Pantoea agglomerans*, кількість яких досягала 80–90 %. При зберіганні зерна кількість епіфітних мікроорганізмів зменшувалась. Якщо на зерні домінувала жовто-пігментна мікрофлора, то на вегетуючих рослинах пшениці якісний її склад залежав від фази розвитку пшениці. Із листя пшениці у фазі кушіння і виходу колосу в трубку ізолювали в основному бактерії, колонії яких мали сіро-біле забарвлення. Бактерії типу *P. agglomerans* зустрічались рідко. Загальна кількість мікроорганізмів на листі пшениці складала 4×10^3 – $1,6 \times 10^5$ КУО/г в залежності від сорту пшениці. В фазі колосіння збільшується кількість жовто-пігментованих бактерій, а також загальна кількість бактерій. В залежності від сортозразка кількість бактерій на колосках коливається від $5,5 \times 10^5$ до 3×10^8 КУО/г. У міру дозрівання зерна зменшувався якісний склад бактерій. Якщо у фазі виходу колосу в трубку ізолювано вісім морфотипів бактерій, то у фазі цвітіння – наливу зерна – чотири–п'ять. Два ізоляти серед виділених були патогенними для рослин пшениці та давали позитивну реакцію на листі тютюну. За дослідженими культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями бактерії, ізолювані з поверхні здорового зерна і вегетуючих рослин пшениці були віднесені до різних систематичних груп за основними стабільними ознаками.

Оксидазонегативні, грамнегативні, рухливі бактерії, які не використовували лактозу, викликали реакцію надчутливості на тютюні і були патогенними для пшениці, ідентифіковані як *P. syringae* pv. *atrofaciens* П203 та П204.

Грамвід'ємні, оксидазонегативні бактерії, які пептонізують молоко, розріджують желатину, використовують глюкозу, маніт і інозит, а варіабельно – сахарозу, рафінозу і сорбіт, але не викликали інфекційного процесу при штучному зараженні пшениці, ідентифіковані як *Pseudomonas* sp.

Група рухливих, грамвід'ємних, оксидазопозитивних бактерій, які не редукують нітрати, на лакмусовій сироватці утворюють луг, молоко звертають або пептонізують, желатину розріджують, утилізують глюкозу,

сорбіт, маніт, інозит, а варіабельно – сахарозу і рафінозу, віднесені нами до *Pseudomonas fluorescens*.

Рухливі, грамвід'ємні бактерії, які на лакмусовій сироватці утворюють кислоту, розріджують желатину, ферментують в анаеробних умовах глюкозу і використовують саліцин належать до роду *Erwinia*.

Група жовто-пігментованих бактерій, які редукують нітрати, розріджують желатину і ферментують анаеробно глюкозу ідентифіковані як *Pantoea agglomerans*.

Спороутворюючі грампозитивні ізоляти, аероби, каталазопозитивні, які не редукують нітрати, не використовують лактозу і дульцит належать до роду *Bacillus*.

Крім штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* П203 та П204 всі епіфітні бактерії для рослин пшениці були непатогенними.

Встановлено, що в більшості випадків у насінні всіх досліджуваних сортів наявна внутрішня інфекція. Кількість бактерій у внутрішніх частинах пшениці невелика і складає $1 \times 10 - 1 \times 10^2$ КУО на 1 грам насіння. Хоча із даних літератури відомо, що загальна кількість бактерій-ендофітів у різних органах рослин може досягати 1×10^6 КУО/г [12]. Якщо врахувати, що в 1 г пшениці міститься 23–24 насінини, то в середньому на насінину припадає 0,4 – 4 колоній бактерій. Найбільш ймовірно, що деякі насінини стерильні.

Якісний і кількісний склад ендоефітних бактерій залежав від сорту пшениці. Виявлено, що сортозразки пшениці на 44–97 % інфіковані ендоефітними мікроорганізмами. Найчастіше у сортозразках пшениці виявляли мікроміцети – від 37 до 95 % (в залежності від сорту пшениці). Зерно було інфіковане бактеріями на 63 %. Серед бактерій переважали спороутворюючі, їх кількість досягала 55 % від загальної ендоефітної бактеріальної мікрофлори. Рідше виявляли жовто-пігментовані бактерії *P. agglomerans*, частка яких складала 26–36 %, і зовсім – рідко бактерії інших видів – *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, бактерії роду *Erwinia* (до 13 %). Якісний склад ендоефітної мікрофлори не відрізняється від епіфітної, за винятком фітопатогенних бактерій, які не виявлені серед ендоефітів. За фізіолого-біохімічними властивостями бактерії, ізольовані з поверхні не відрізнялись від виділених з внутрішніх тканин пшениці. Серед ізольованих ендоефітних бактерій нами не виявлено штамів фітопатогенних бактерій, які уражують зернові культури – збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* та штриховатої плямистості пшениці *Xanthomonas translucens*. Хоча за даними деяких авторів [8, 16] фітопатогенні бактерії *P. corrugata*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *syringae* можуть бути компонентом ендоефітної мікрофлори деяких рослин і деревних порід.

Іноді з внутрішніх тканин насіння пшениці одночасно виділяли бактерії і мікроміцети. Частіше в зерні пшениці знаходились мікроміцети і жовто-пігментовані бактерії *P. agglomerans* і рідко – мікроміцети разом з спороутворюючими бактеріями. Отримані нами результати підтверджують дані попередніх дослідників про те, що мікроміцети частіше зустрічаються в тих рослинних тканинах, де менше спорових бактерій [10]. Це може свідчити про антагоністичні відносини між ендofітними бактеріями і мікроміцетами.

Усі бактерії, які ізольовані з внутрішньої частини насіння для рослин пшениці (в польових умовах) були непатогенними і не викликали реакцію надчутливості на листі тютюну.

Виявлено, що досліджувані непатогенні бактерії родів *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* та *Pantoea*, які не проявляли антагоністичних властивостей до фітопатогенних бактерій, впливають на патологічний процес, який викликає *P. syringae* pv. *atrofaciens* (табл. 1). Якщо епіфітні бактерії знижували ознаки штучного зараження і при співвідношенні сапрофіт-патоген 1:1 агресивність патогена зменшувалась вдвоє, то при внесенні ендofітних бактерій до *P. syringae* pv. *atrofaciens* навіть в невеликому співвідношенні (1:9) агресивність патогена значно знижувалась. При інокуляції однаковою кількістю патогена і ендofіта (1:1) збудник базального бактеріозу втрачав здатність викликати інфекційний процес.

Зниження агресивності патогена відбувалось не за рахунок зменшення концентрації клітин фітопатогена в інокулюмі. Оскільки навіть при найменшому співвідношенні патогена до сапрофіта (1:9) в бактеріальній суспензії знаходилось 1×10^8 КУО/мл *P. syringae* pv. *atrofaciens*, а порогова концентрація для виникнення патологічного процесу складає 1×10^6 КУО/мл. Тому зниження інтенсивності захворювання у фітопатогена на нашу думку відбулося за рахунок впливу епіфітних і ендofітних бактерій.

Досліджували серологічну спорідненість штамів-епіфітів *P. syringae* pv. *atrofaciens* П203 і П204 з антисироватками до *P. syringae* п'яти серологічних груп, які зустрічаються на зернових культурах – I, II, IV, V, VI. Виявлено, що штамми з пшениці в реакції аглютинації з антисироватками до *P. syringae* pv. *atrofaciens* серогруп I і V реагували в низькому титрі (1:100–1:200). Найбільш виражену аглютинацію спостерігали з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7864 (серогрупа II) і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI) за схемою серогруповання фітопатогенних бактерій групи *P. syringae*, розроблених

Л.Т. Пастушенко і І.Д. Сімонович [6]. В реакції подвійної дифузії в агарі (табл. 2) епіфітні штамми *P. syringae* pv. *atrofaciens* П203 і П204 утворювали по одній лінії преципітації з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI), по дві слабій лінії преципітації з антисироваткою до *P.*

syringae pv. *atrofaciens* 7836 (серогрупа IV) і по три лінії преципітації з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7864 (серологічна група II).

Таблиця 1. Результати штучного зараження ярової пшениці сумішшю *P. s.* pv. *atrofaciens* з сапрофітами (сорт Харківська 37)

Співвідношення патоген : сапрофіт в інокулюмі	Розвиток базального бактеріозу (в балах) патогена з					
	епіфітними бактеріями			ендофітними бактеріями		
	Erwini a sp. 283	Bacillus sp. 270	P.agglomerans П324	Pseudomonas fluorescens ЗП	Bacillus sp. К-1	P.agglomerans 1a
1 : 0 (К)	3,5	3,5	3,0	3,0	3,0	3,0
9 : 1	2,6	2,9	2,6	2,4	1,1	1,9
4 : 1	1,8	2,5	1,8	1,2	0,5	0,7
7 : 3	1,9	2,5	1,9	1,2	0,6	0,9
6 : 4	2,0	2,3	2,0	0,5	0	0,9
1 : 1	1,6	2,2	1,6	0,1	0,2	0,2
4 : 6	1,8	2,3	1,8	0,1	0,2	0
3 : 7	1,6	2,1	1,6	0,1	0,2	0
1 : 4	1,4	1,7	1,4	0,1	0,3	0
1 : 9	1,6	1,25	1,4	0	0,1	0
0 : 1 (К)	0,6	0,6	0	0	0	0

Тому штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* П203 і П204 були віднесені до серогрупи II. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені з уражених рослин пшениці були віднесені раніше до чотирьох серогруп (II, IV, V, VI) і найбільш чисельною була серогрупа IV. Таким чином штами збудників бактеріальних хвороб зернових культур, виділені як епіфіти домінують в інших серологічних групах, ніж штами, які ізольовані з уражень. Це відзначено нами у всіх досліджуваних зернових культурах.

Таблиця 2. Антигенні властивості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* в реакції преципітації

Антигени штамів бактерій	Кількість ліній преципітації з антисироватками до штамів різних серогруп <i>P. syringae</i>						
	8281 I*	9030 I*	7864 II*	7836 IV*	8116 V*	9031 V*	7194 VI*
П203			3	2 сл.			1
П204			3	2 сл.			1
8281	2	3				1	
7836				2			
7864			3				
8116		2 сл.			2	2	
7194							3

Примітка: * – серогрупа за схемою Пастушенко і Сімонович [6]

Висновки та перспективи подальших досліджень

Отже, нами показано, що зовнішні і внутрішні тканини пшениці заселені мікроорганізмами. З поверхні зовні здорового насінні пшениці всіх досліджуваних сортів виділяються в основному жовто-пігменті бактерії *P. agglomerans*. При зберіганні насіння кількість мікроорганізмів

зменшується. На вегетуючих рослинах пшениці кількість жовто-пигментних бактерій збільшується у міру досягання зерна. Серед виділених епіфітних ізолятів два були патогенними для рослин пшениці і ідентифіковані як *P. syringae* pv. *atrofaciens*. За якісним складом сапрофітні епіфітні і ендofітні бактерії пшениці ідентичні. Нами виявлені бактерії родів *Pseudomonas*, *Bacillus* та *P. Agglomerans* як на поверхні, так і у внутрішніх тканинах пшениці. Отже ці дані підтверджують попередні результати про здатність епіфітних бактерій *P. agglomerans* проникати в тканини пшениці, що свідчить про те, що численна епіфітна мікрофлора, яка мешкає на різних сільськогосподарських рослинах може потрапляти всередину рослин, в насіння та плоди і ставати ендofітною [4]. На поверхні зерна пшениці переважає бактерія *P. agglomerans*, а у внутрішніх тканинах – роду *Bacillus*. Кількість *P. agglomerans* на поверхні зерна складає 80–90 %, а у внутрішніх тканинах – 26–36 % від загальної бактеріальної мікрофлори.

Якщо порівняти сапрофітні бактерії роду *Bacillus* та *P. agglomerans*, яких завжди багато на листках та в місцях ураження, з *P. syringae*, то за швидкістю засвоєння поживних речовин сапрофіти значно переважають патогенів. Можливо тому кількісна частка патогенів в епіфітній фазі незначна, а часом і зовсім відсутня. Практичну відсутність патогенів серед ендofітної мікрофлори здорового зерна пшениці [1] можна пояснити конкуренцією а поживні речовини між ендofітами-сапрофітами та фітопатогенами.

Проведені дослідження на пшениці показали зміну кількісного та якісного складу патогенної, епіфітної та ендofітної мікрофлори в залежності від фази росту та розвитку рослин.

За антигенними властивостями патогенні епіфітні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* належать до серогрупи II.

Встановлено, що досліджувані епіфітні і ендofітні бактерії впливають на хід інфекційного процесу, знижуючи симптоми прояву захворювання пшениці, спричиненого *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Механізм захисту складний і відбувається, очевидно, не тільки за рахунок антагоністичних властивостей ендofітів до патогенів.

В подальшому необхідно дослідити вплив сапрофітів на інфекційний процес, викликаний іншими фітопатогенами.

Дослідження виконані за часткової фінансової підтримки ДФФД Міністерства освіти і науки України.

Література

1. Гвоздяк Р. І., Кабашина Л. В., Пасічник Л. А., Макарчук Є. А. Ендofітна мікрофлора зерна пшениці та її взаємодія з фітопатогенними бактеріями // Доп. НАН України. – 2001.– № 1. – С.173–177.
2. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. – М.: Мир, 1983. – т. 1. – 563 с.

3. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. – М.: Мир, 1984. – т. 3. – 264 с.
4. Пасічник Л.А., Гвоздяк Р. І., Козирівська Н. О. та ін. Проникнення *Pantoea agglomerans* в коріння пшениці // Х з'їзд Товариства мікробіологів України (Одеса, вересень 2004 р.): Тези доп. – Одеса, “Астропринт”, 2004, С. 295.
5. Пастушенко Л. Т., Сімонович І. Д. Вивчення методів одержання антигенів фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіол. журн. – 1971. – 33, №3. – С. 289 – 295.
6. Пастушенко Л.Т., Сімонович І.Д. Серологические группы фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*. II. Антигенное родство различных видов // Микробиол. журн. – 1979. – 41, №4. – С. 330 – 339.
7. Пересыпкин В. Ф., Королева И. Б., Минько Н. Д. Устойчивость сортов яровой пшеницы к базальному бактериозу // Докл. ВАСХНИЛ – 1978. – № 6. – С. 11.
8. Bell C. R., Dickie G. A., Harvey W. L. G., Chan J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine // Can. J. Microbiol. – 1995. – 41, N 1. – P. 46 – 53.
9. Bergey's Manual of Systematic bacteriology. – 9-th ed. – Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1984. – v.1. – 964 p.
10. Fisher P. J., Petrini O., Scott H. M. L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.) // New Phytol. – 1992. – 122. – P. 299 – 305.
11. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Klopper J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops // Can. J. of Microbiol. – 1997. – 43, № 10. – P. 895 – 914.
12. Jacobs M. J., Bugbee W. M., Gabrielson D. A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots // Can. J. Bot. – 1985. – 63. – P. 1262 – 1265.
13. Klement Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas* // Nature. – 1963. – 199, № 4890 – P. 299 – 300.
14. Klement Z., Rudolf K., Sands D. C. Methods in phytobacteriology. – Budapest: Akademiai Kiado, 1990. – 568 p.
15. Reiter B., Pfeifer U., Schwab H., Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – 68, N 5. – P. 2261 – 2268.
16. Whitesides S. R., Spotts R. A. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees // Phytopathol. – 1991. – 81, № 4. – P. 453 – 457.