

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного, м.Київ
Національний аграрний університет, м.Київ

ФІТОПАТОГЕННІ БАКТЕРІЇ НАСІННЯ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

*Із здорового та ураженого насіння сосни звичайної виділено фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae*, *Erwinia nimipressuralis* та *Erwinia carotovora*, які здатні спричинювати захворювання хвої однорічних сіянців. Вивчено біохімічні властивості виділених бактерій та їхній жирно-кислотний склад.*

Постановка проблеми

Природна та інтродукована мікрофлора насіння приймає активну участь у формуванні ризосферної та епіфітної мікрофлори рослин [5]. Постійними компонентами мікрофлори насіння, кореневої системи та надземних органів рослин є фітопатогенні бактерії. В численних публікаціях наведені дані щодо заселення фітопатогенними бактеріями насіння багатьох сільськогосподарських рослин. Можна з упевненістю стверджувати, що всі види фітопатогенних бактерій, які здатні спричинювати захворювання певного виду рослин, можливо виявити на їхньому насінні. Слабо вивченим є питання колонізації фітопатогенними бактеріями насіння імунних до них видів рослин.

Щодо насіння лісових культур як носіїв фітопатогенних бактерій, то висвітлення цього питання обмежується декількома працями. І це закономірно. Адже бактеріальні хвороби лісових деревних і чагарникових порід вивчені дуже слабо, порівняно з хворобами сільськогосподарських рослин, тому і мікрофлора насіння лісових культур залишилась поза увагою учених. В 1963 р. А.Л.Щербин-Парфененко [6] виділив бактерії виду *Erwinia multivora* – збудник водянки багатьох порід, який і спричинював хвороби насіння, у тому числі і сосни звичайної. В 1965 р. D. C. Hildebrand та M. N. Shoroth встановили бактеріальну природу крапельного захворювання жолудів дуба [7].

В Україні дослідження бактеріальної мікрофлори насіння сосни звичайної не проводились.

Тому завданням нашої роботи було вивчення наявності фітопатогенних бактерій на насінні сосни звичайної Київського Полісся України.

Матеріали і методи досліджень

Насіння сосни звичайної було зібрано в держлісгоспах Київської області, а також отримано з Української лісонасінневої станції „Укрдержліснасіння”. Загалом проаналізовано 205 зразків насіння із 97 партій. Фітопатологічний і мікробіологічний аналіз насіння проводили

загальноприйнятими методами [1]. Для виявлення фітопатогенних бактерій насіння промивали проточною водогінною водою (10 хв) та стерильною водою (3 хв), асептично просушували на фільтрувальному папері. Одну частину насіння розкладали на пластинку картопляного агару (КА), а другу – спочатку асептично розтирали і після цього висівали на пластинки КА. Для виявлення фітопатогенів усередині насіння його, після промивання водою, послідовно занурювали в 16 %-й розчин перекису водню (15 хв) та в етанол (3 хв), після чого обпалювали і злущували поверхню оболонку, гомонізували та висівали на пластинки КА. Ізоляти відбирали за морфологією колоній для подальшого їхнього вивчення.

Морфологію колоній описували за особливостями росту бактерій на КА. Здатність ізолятів засвоювати вуглецевмісні речовини вивчали за ростом на середовищі Омелянського з добавкою 0,5 % досліджуваної речовини. Ферментативну активність протеаз визначали за ростом на м'ясопептонному агарі (МПА) та пептонізацією молока, амілаз – за розкладом крохмалю в КА, пектиназ – за мацерацією тканин бульб картоплі [1].

Для визначення жирнокислотного складу загальних клітинних ліпідів бактерій їх вирощували протягом доби на КА. Клітини змивали фізіологічним розчином та осаджували центрифугуванням (2000 об/хв, 40 хв). Клітини двічі відмивали від субстрату та осаджували у тому самому режимі. Для аналізу використовували 100 мг сирової маси клітин бактерій. Гідроліз клітин та метилювання жирних кислот проводили в 1,5 % розчині сірчаної кислоти у метанолі в запаяних ампулах протягом 1 год при 80 °С. Метиліровані ефіри жирних кислот екстрагували сумішню ефір (медичний для наркозу): гексан (1:1). Розділення їх здійснювали за допомогою хроматомас-спектрометричної системи Agilent 6890N5973 inert. Газ – носій – гелій, температура – 150–270 °С з градієнтом в 4 °С, колонка – HP-5MS x 30 м x 0,25, нерухома фаза 5-й % фенілметилполісілоксан товщиною 0,25 мм. Ідентифікацію одержаних піків жирних кислот проводили порівнюючи їх зі стандартами.

Результати досліджень

В кожній партії насіння сосни звичайної виявлено дійсні (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia*) та опортуністичні (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus*, *Pantoea*) види фітопатогенних бактерій.

Виділені патогенні ізоляти бактерій ідентифікували за морфологічними, біохімічними ознаками та за жирними кислотами в клітинах. За цими ознаками вони були віднесені до видів *P. syringae*, *E. nimipressuralis* та *E. carotovora*.

Чітку реакцію надчутливості на листі тютюну спричинювали штами *Pseudomonas syringae* і дуже слабку – штами *Erwinia nimipressuralis* та *E. carotovora*. Бактерії родів *Bacillus*, *Pantoea* та *P. fluorescens* не приводили до утворення некротичних чи хлоротичних зон в місцях їхнього введення під епідерміс листя тютюну.

Штами *P. syringae* добре ростуть на картопляному агарі. Вже через добу вони утворюють видимі неозброєним оком прозорі круглі колонії, які з

часом збільшуються в розмірі до 3–4 мм. Зрілі колонії круглі, незначно припідняті до центру, часом з кратером у ньому. Край рівний або хвилястий. Поверхня колоній блискуча, гладка, рівна, часто радіально штрихована. Колонії мають сіро-біле забарвлення напівпрозорі, світліші скраю, характеризуються незначною опалесценцією.

Клітини *P. syringae* – дрібні поліморфні палички із заокругленими кінцями. Зустрічаються у вигляді ланцюжків по 5–7 клітин, спор не утворюють, грамнегативні. За біохімічними ознаками виділені нами бактерії *P. syringae*, які було ізольовано із плодів та лісових порід не відрізняються від описаних іншими авторами. Бактерії є аеробами, не засвоюють лактози в анаеробних умовах (табл. 1).

E. nimipressuralis добре росте на КА. Через 40–48 год. росту колонії круглі, діаметром до 4 мм, припідняті, край горбистий, який різкіше виділяється від середини, ніж скраю, край слабо-хвилястий, без радіальних бороздок. Поверхня колонії гладенька, блискуча, колір біло-сірий, більш темний, ніж у колоній *P. syringae*, що особливо помітно при просвітленні – тоді вони мутніші, хоч теж відносяться до напівпрозорих. За кутового просвітлення часто в колонії можна виявити темніші, не завжди суцільні кола. Можливо, це пов'язано з переривчастим ростом культури під час її інтенсивного росту. На КА водорозчинні пігменти не утворюються.

Клітини *E. nimipressuralis* спор не утворюють, грамнегативні, чітко прямі, кінці заокруглені, поліморфні, розміром 0,4–0,6 x 0,8–1,5 мк з перитрихальним розташуванням джгутиків, рухомі (перитрихальний рух), зустрічаються поодинокі, парами, ланцюжками або скупченням.

Колонії *E. sarotovora* на КА спочатку дрібні, майже прозорі, які ростуть до 3–4 мм в діаметрі, круглі з рівним краєм, припідняті до конусоподібного центра. Колір 2–3 – добової культури сіро-білий, у разі просвітлення – напівпрозорі, ущільнені до центру, блискучі, з перламутровим відтінком; неспороносні палички, кокоподібні, рухомі, з перитрихальним розташуванням джгутиків.

За фізіологічними, біохімічними властивостями ізольовані бактерії не відрізняються від описаних в літературі [3] (табл. 1) і за визначником Бергі [4] віднесені нами до зазначених видів.

Для підтвердження належності виділених ізолятів до певних видів було використано аналіз складу жирних кислот клітинних ліпідів бактерій. Жирнокислотний склад вивчали у трьох ізолятів – 381, 381б, 381в (рис. 1 – 3). Склад жирних кислот ізолятів 381 та 381в був ідентичним. В їхніх клітинах виявлено додеканову (C 12:0), 2-гідроксидодеканову (C 12:0 2ОН), *cis*-9-гексадеценону (C 16:1), гексадеканову (C 16:0), *cis*-9, 10-гексадеканову (C 17:0 *syn*), гептадеканову (C17:0), октадеканову (C 18:0) та *trans*-9-октадеценону (C 18:1) жирні кислоти. Відрізняються ці штами за наявністю в них *cis*-9, 10-гексадеканової та гептадеканової жирних кислот. У клітинах ізолятів 381 та 381в переважають жирні кислоти з парним числом атомів вуглецю – 98,35–98,82 %. Серед жирних кислот з парним числом атомів у ізолятів 381 та 381в переважають *cis*-9- гексадеценон – 36,3 та 40,3 %, гексадеканон – 22,4 та 20,4 %, *trans*- октадеценон – 28,9 та 27,1 % відповідно.

Сумарна їхня кількість становить 87,6 та 88,9 % відповідно. У клітинах бактерій ненасичені жирні кислоти переважають над насиченими – *cis*- 9 -октадеценова та *trans*-9-октадеценова. Питома кількість їх у штама 381 становить 65,2 %, а у штама 381в – 67,4 %. Характерною ознакою фітопатогенних флуоресцентних псевдомонасів є величина співвідношення гексадеканової до октадеценової жирних кислот. Для обох штамів вона менше 0,9 і становить для ізоляту 381 – 0,61, а для ізоляту 381в – 0,51 (табл. 2). Таким чином, за складом жирних кислот клітинних ліпідів ізоляти 381 та 381в належать до виду *P. syringae*.

Таблиця 1. Біохімічні властивості фітопатогенних ізолятів, виділених із насіння сосни звичайної

Тест	<i>E. carotovora</i>		<i>E. nimipressuralis</i>		<i>P. syringae</i>	
	1	2	1	2	1	2
Утворення спор	-	-	-	-	-	-
Фарбування за Грамом	-	-	-	-	-	-
Флуоресцентний пігмент	-	-	-	-	-	-
Засвоєння: глюкози аеробно	к	к	кг	кг	к	к
глюкози анаеробно	к	к	кг	кг	-	-
мальтози рамнози лактози	к	к	кг	кг	-	-
фруктози	к	к	кг	кг	к	к
ксилози	к	к	кг	кг	к	к
манози	к	к	кг	кг	-	-
сахарози	к	к	кг	кг	к	к
сорбіту	-	-	к	д/в	-	-
гліцеролу	к	к	к	д/в	д/в	д/в
дульциту	-	-	кг	к	-	-
інозиту	к	к	-	-	к	к
манітолу	д/в	д/в	к	кг	к	к
саліцину	к	к	к	кг	-	-
Молоко: зсідання	+	+	+	+	-	-
пептонізація	-	-	-	-	+	+
Наявність ферментів: амілази	-	-	+	+	+	+-
пектинази	+	+	-	-	-	-
протеїнази	+	+	-	д/в	д/в	д/в
оксидази	-	-	+	+	-	-
каталази	+	+	+	+	+	+
желатинази	+	+	-	-	+	+
Утворення: індолу	-	-	-	-	-	-
аміаку	+	+	-	-	-	-
сірководню	+	+	-	-	-	-
Лакмусова сироватка	л	л	л	л	л	л

Примітки: “1” - ізоляти, виділені із насіння сосни; “2” – дані літератури [3, 4];

“+” ознака позитивна; “-” ознака негативна; “к” – утворення кислоти,

„кг” – утворення кислоти з виділенням газу; „л” – утворення луку;

“д/в” – дані відсутні.

Дані щодо жирнокислотного складу клітин фітопатогених псевдомонасів порівняно з іншими наведено в роботах D.E. Stead [8, 9]. Згідно з наведеними даними, характерною ознакою *P. syringae* є наявність гідроксикислот: 3-гідроксидеканової, 2-гідроксидедеканової та 3-гідроксидедеканової. Ми виявили у клітинах бактерії лише одну кислоту – 2-гідроксидедеканову. Можливо це пов'язано з умовами культивування та виділення жирних кислот, на що вказують З. П. Васюренко та ін. [2].

Тим більше, що зазначені жирні кислоти містяться у клітинах в мінімальних кількостях, часом у концентрації 0,09 %. За іншими показниками складу жирних кислот клітини штамів 381 та 381в – за величиною співвідношення гексадеканової кислоти до гексадеценної (менше 0,9), вмістом гептадеканової кислоти, сумою ненасичених кислот та за основними жирними кислотами вони належать до *P. syringae*.

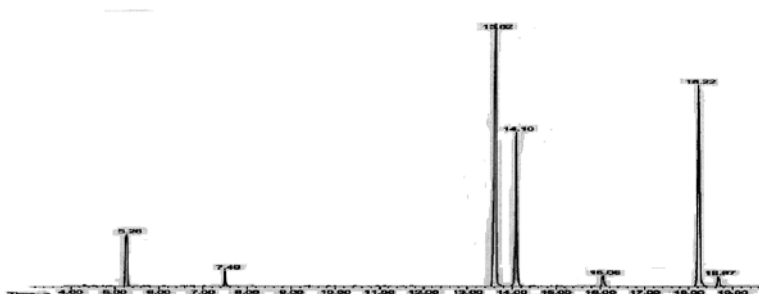


Рис. 1. Жирнокислотний профіль ізоляту 381

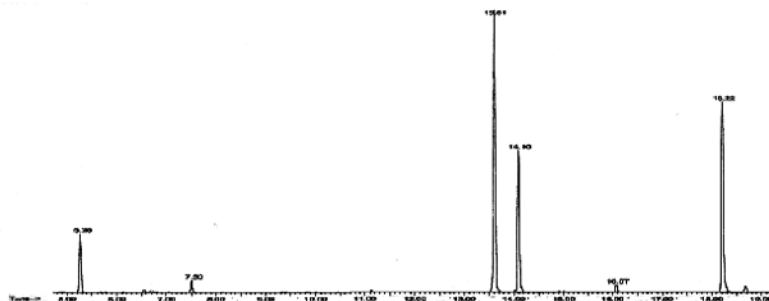


Рис. 2. Жирнокислотний профіль ізоляту 381в

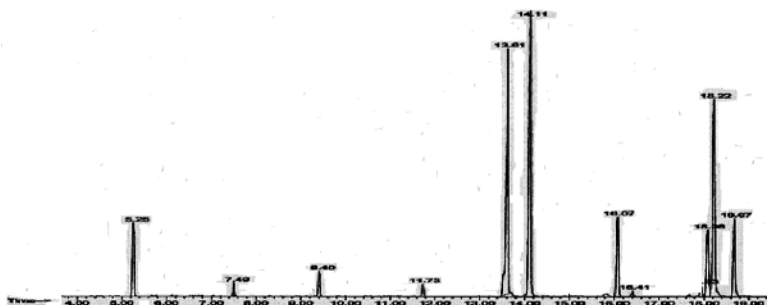


Рис.3. Жирнокислотний профіль ізоляту 381в

За вмістом жирних кислот у клітинах штам 381в відмінний від штамів 384 та 381в, хоча за жирними кислотами, які зустрічаються у великій кількості, та за присутністю 2-гідроксидодеценаної кислоти (менше 3 %) не відрізняється від них (табл. 3). Клітини штаму 381в містять значно менше ненасичених жирних кислот і, передусім, співвідношення гексадекананої кислоти до гексадеценаної перевищує 0,9.

Таблиця 2. Склад жирних кислот клітинних ліпідів ізолятів, виділених із насіння сосни звичайної

Кислота	Час утримання стандартів	Вміст жирної кислоти, % від загальної площі піків		
		381	381в	381в
Додеканова (C 12:0)	5,29	7,17	6,68	8,41
2-гідроксидодеканова (C 12:0 2ОН)	7,51	2,34	1,34	1,77
Тетрадеканова (C 14:0)	9,42	-	2,48	-
Пентадеканова (C 15:0)	11,75	-	1,32	-
Cis-9-гексадеценанова (C 16:1)	13,60	36,30	22,90	40,30
Гексадеканова (C 16:0)	14,10	22,10	26,00	20,40
Cis-9,10 гексадеканова (C 17:0 сусло)	16,07	-	7,44	1,18
Гептадеканова (C 17:0)	16,42	1,65	0,57	-
Cis-9-октадеценанова (C 18:1 cis)	18,09	-	6,11	-
Trans-9-октадеценанова (C 18:1 trans)	28,24	28,9	17,9	27,1
Октадеканова (C 18:0)	18,68	1,52	7,25	0,88
Нонадеканова (C 19:0)	20,86	-	-	-
Сума C 16:1 + C 16:0 + C 18:1 cis + C 18:1 trans	-	87,3	72,91	87,8
Сума C 16:1 + C 18:1 cis + C 18:1 trans	-	65,2	46,91	67,4
Співвідношення C 16:0/C 16:1	-	0,61	1,35	0,51

Висновки

- Насіння сосни звичайної є носієм фітопатогенних бактерій, тому може слугувати первинним джерелом інфікування.
- За морфологічними, біохімічними ознаками та складом жирних кислот ізольовані з насіння сосни фітопатогенні бактерії належать до видів *P. syringae*, *E. nimipressuralis* та *E. carotovora*.
- Виявлені на насінні сосни звичайної бактерії є поліфагами.

Перспективи подальших досліджень

Враховуючи обнасінення фітопатогенними бактеріями насіння сосни звичайної необхідно вивчити наявність фітопатогенних бактерій на насінні інших хвойних порід і визначити їх особливості в залежності від умов існування.

Література

1. Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С.С. Методы исследований возбудителей бактериальных болезней растений. – К.: Наук. думка, 1968. – 316 с.
 2. Васюренко З. П., Фролов А. Ф., Смирнов А. В., Рубан Н. М. Жирнокислотные профили бактерий, патогенные для человека и животных. –К.: Наук. думка, 1992. – 253 с.
 3. Гвоздяк Р. И., Яковлева Л. М. Бактериальные болезни лесных древесных пород. –К.: Наук. думка, 1979. – 241 с.
 4. Определитель бактерий Берджи. 9-е изд. М: Мир, 1997. – Т.1. – 432с.
 5. Патица В. П., Конь С. Я., Волкогон В. В., Шерстобаєва О. В., Мельничук Т. М., Калініченко А. В., Гриник І. В. Біологічний азот. – К.: Світ, 2003. – 422 с.
 6. Щербин-Парфененко А. Л. Бактериальные заболевания лесных пород. – М.: Гослесбумиздат, 1963. – 146 с.
 7. Hildebrand D. C., Schroth M. N. Erwinia acorn draft of Quercus, a neve disease // Phytopathology, 1965, Vol. 55, № 10. – P 1061.
 8. Stead D. E. Grouping of plant-pathogenic and some other Pseudomonas sp. by using cellular fatty acid profiles // Inter.J.Sys.Bacter. – 1992, Vol. 92, №2. – P. 281–295.
 9. Stead D. E., Henessey J., Elphinstone J. G., Wilson J. Modern methods for classification of plant pathogenic bacteria including Pseudomonas syringae // Developments Plant Pathology, 1998, Vol. 9. – P. 427–434.
-
-