

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, 03041, Київ, Україна

²Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03608, Україна

БАКТЕРІАЛЬНІ ХВОРОБИ РІПАКУ

У посівах ріпаку ярого та озимого виявлені та описані бактеріальні ураження культури, ідентифіковані їх збудники. Характерні симптоми захворювання були такі: побуріння тканини стебла та його ослизнення, хлороз листя, пожовтіння та початок м'якого гниття у місцях прикріплення черешків листків, втрата пігментації (фіолетове забарвлення). Досліджено патогенні властивості колекційних та морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості виділених штамів збудників бактеріальних хвороб ріпаку. Встановлено, що всі виділені нами ізоляти є високо- та середньоагресивними щодо різних сортів ріпаку. За комплексом фенотипових ознак 44 % від загальної кількості виділених нами ізолятів споріднені з представниками роду *Pseudomonas*, 37 % – *Xanthomonas* та 19 % – *Pectobacterium*.

Ключові слова: бактеріальні хвороби ріпаку, бактерії родів *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, бактеріоз коренів, слизивий бактеріоз.

Ріпак є цінною олійною культурою, адже насіння містить 40-44 % олії та 18-22 % білка. 90 % насіння використовують для виробництва жирів, а решту для технічних цілей. Він є хорошим попередником, ефективним сидеральним добривом, добрим медоносом, фітосанітаром полів тощо. Проте, як і інші сільськогосподарські культури за певних несприятливих умов, порушення технології вирощування, різких змін кліматичних умов, збільшення антропогенного навантаження, а також інтродукції великої кількості нових сортів як закордонної, так і вітчизняної селекції, ріпак уражується хворобами різної етіології, що призводить до зниження якості його насіння та урожайності [3, 6, 7, 9]. І хоча на думку сучасних фітопатологів найбільшої шкоди посівам ріпаку наносять збудники хвороб грибної етіології, аналіз фітосанітарного стану посівів ріпаку свідчить про стрімке збільшення відсотка рослин, уражених саме бактеріальними збудниками, які є не менш шкідливими, ніж гриби [5, 8, 11, 14]. Відомо, що до основних бактеріальних хвороб ріпаку належить бактеріоз коренів (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* та *Pseudomonas fluorescens*), слизивий бактеріоз (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Pseudomonas fluorescens*) та бактеріальний опік ріпаку, який згідно з даними літератури, є менш шкодочинним захворюванням та викликається як *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, так і *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [3, 11, 14]. Крім того, ріпак потенційно здатні уражувати *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* тощо. При розробці заходів для захисту рослин від бактеріозів велике значення відіграє екосистемний моніторинг, діагностика захворювань та вивчення біологічних властивостей їх збудників, які вивчені ще недостатньо.

Тому метою наших досліджень був моніторинг бактеріальних хвороб ріпаку з наступною їх ідентифікацією за допомогою патогенних, морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей.

Матеріали і методи. Збір зразків уражених рослин ріпаку проводили регулярно в вегетаційні періоди 2010-2012 рр. на дослідних полях і ділянках Національного університету біоресурсів і природокористування України (Київська обл.), Коростишівського району Житомирської області, Інституту сільського господарства Степової зони (Дніпропетровська обл.), Інституту сільськогосподарської мікробіології і агропромислового виробництва НААН України (Чернігівська обл.).

Для виділення і культивування бактерій використовували картопляний агар (КА). Досліджували 18 ізолятів бактерій, збудників слизивого бактеріозу та бактеріозу коренів, виділених нами з різних уражених органів та тканин ріпаку. Для порівняльних досліджень використали 32 штами фітопатогенних бактерій *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (80036, 8171, 8185, 8173, 8050, 820, 8160, 8188, 8172, 8196, 8182, 8174, 8836, 8659, 8147, 8195, 8166, 8159,

© О.М. Захарова, М.Д. Мельничук, Л.А. Данкевич, В.П. Патица, 2012

8154, 8170, 8149, 8161, 8156, 8194, 8179, 8148, 8189, 8176, 8175, 8188, 8183, 8180) та штами *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В-1075[†], *P. syringae* pv. *syringae* В1027[†], *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175[†] з колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології (ІМВ) ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Патогенні властивості ізолятів визначали шляхом штучного зараження рослин ріпаку у фазі формування розетки листків до періоду бутонізації та цвітіння. У дослідженнях використовували 6 сортів ріпаку ярого (Марінс, Антарія, Оксамит, Марія, Микитинецький, Лужок), 2 сорти озимого ріпаку (Чорний Велетень та Аріон). Для штучного зараження використовували одноклобову бактеріальну суспензію титром 10^7 кл./мл. Контролем слугувала стерильна водогінна вода. Рослини инокулювали потрійним уколом тканини з подальшим нанесенням бактеріальної суспензії. Облік агресивності штамів проводили за розробленою нами 10-и бальною шкалою [4]. Штами з патогенністю від 7 до 9 балів вважалися агресивними, від 5 до 7 балів середньоагресивними та від 5 до 1 балів – низькоагресивними. Культурально-фізіологічні властивості бактерій вивчали загальноприйнятими класичними методами [1]. Здатність засвоювати вуглеводи та спирти, як єдине джерело живлення, визначали за ростом бактерій та зміною забарвлення середовища Омелянського, що містило індикатор бром-тимол синій та 0,5 % розчин досліджуваного вуглеводу чи спирту. Облік результатів здійснювали на 3, 7, 14 та 21 добу культивування. Наведені у роботі дані є середнім значенням досліджень, проведених у чотирьох повторах. Математичну обробку результатів проводили стандартними методами математичної статистики з використанням комп'ютерної програми MS EXCEL.

Результати та їх обговорення. Обстеження посівів ріпаку показали, що бактеріальні патогени частіше уражують ріпак озимий. Розвиток захворювання розпочинається у першій декаді жовтня місяця, у більш теплих регіонах і пізніше з утворенням порожнини всередині кореневої шийки, в меншій кількості інших частинах кореня. З часом тканини кореня буріють. На початку весни більшість уражених коренів ослизнюється і розмочалюється, що призводить до загибелі рослин. У 2011 році весною спостерігали збільшення кількості уражених рослин із причини контрастної зимової температури і безсніжжя.

Як на озимих і, особливо, ярих сортах ріпаку при підвищеній вологості спостерігається ураження серцевини стебла, яка з часом загниває і висихає, внаслідок чого стебло стає цілком порожнім. Уражені місця стебла іноді чорніють. На дорослих рослинах зазначена хвороба виявляється у вигляді в'янення як верхніх, так і нижніх листків. Згодом листки відмирають, починаючи з нижніх, зморщуються і прикривають стебло.

За період з 2010 по 2012 рр. нами проаналізовано близько 250 зразків рослин ріпаку з вищенаведеними ознаками ураження, зі 130 зразків ізольовано бактерії (табл. 1). При бактеріологічному аналізі зразків нами ізольовано 18 патогенних ізолятів бактерій, виділених із різних уражених органів та тканин ріпаку з ознаками слизового бактеріозу та бактеріозу коренів.

Слід зазначити, що бактерії виділяли протягом усього періоду вегетації ріпаку, як восени, весною (ярий ріпак), так і у другій половині літа під час збирання врожаю. При вивченні патогенних властивостей виділених нами ізолятів та колекційних штамів виявлено різну агресивність (рис. 1).

Таблиця 1

Результати фітобактеріологічного аналізу зразків ріпаку

Зразки		Кількість ізолятів			
Проаналізовано	З яких ізольовані бактерії	Ізольовано	В т.ч. ізолятів з колоніями		
			жовтого кольору з рівними краями	сірувато-білого кольору напівпрозорих з піднятим центром і хвилястим краєм	сірувато-білі, опуклі, з конусним центром і рівними краями
250	130	18	6	9	3

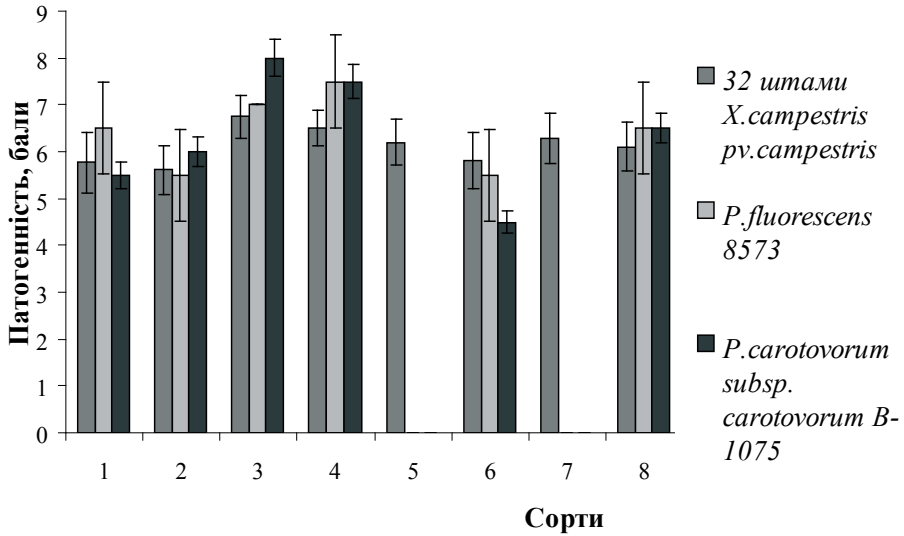


Рис. 1. Агресивність колекційних штамів щодо різних сортів ріпаку:

1 - Чорний Велетень, 2 - Аріон, 3 - Марінс, 4 - Антарія, 5 -Оксамит, 6 - Марія, 7 - Микитинецький та 8 - Лужок (середнє значення)

Аналізуючи агресивність колекційних штамів щодо різних сортів ріпаку видно, що найбільш стійкими до збудників бактеріозу коренів (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* та *Pseudomonas fluorescens*) виявилися саме сорти озимого ріпаку Чорний Велетень та Аріон, а до слизового бактеріозу (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Pseudomonas fluorescens*) – ярий сорт Марія. Зовсім не чутливими до слизового бактеріозу є сорти Оксамит та Микитинецький. Згідно з даними Зробок О.М. та ін. [8] найбільш стійким сортом до окремих збудників грибних хвороб ріпаку (фомоз, ботрідіоз та склеротініоз) виявився саме сорт Микитинецький. Крім того, найменша уражуваність альтернаріозом, як найбільш шкодоочинним захворюванням грибної етіології, спостерігалась у сортів Оксамит та Лужок.

Показано, що агресивність виділених нами ізолятів щодо різних сортів ріпаку відрізняється (рис.2).

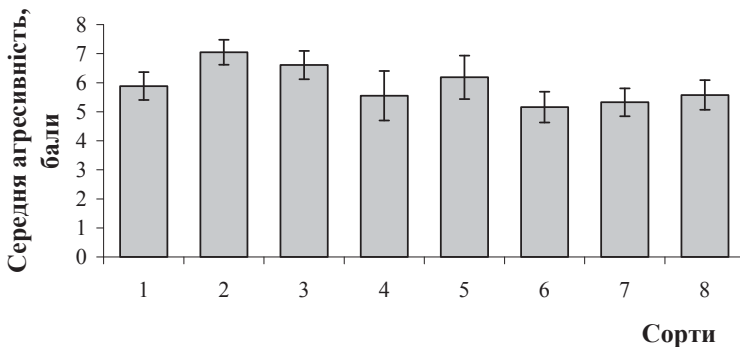


Рис. 2. Середня агресивність виділених ізолятів щодо озимих

(1 - Чорний Велетень, 2 – Аріон) та ярих (3 - Марінс, 4 - Антарія, 5 -Оксамит, 6 - Марія, 7 - Микитинецький, 8 – Лужок) сортів ріпаку

Перевірка стійкості районованих сортів ріпаку до виділених нами штамів, які викликають бактеріальні хвороби даної культури показала, що найменш чутливими до збудників виявилися саме сорти – Оксамит та Микитинецький. Натомість, сорти ріпаку ярого – Марінс та

Марія, а також сорт ріпаку озимого — Аріон були найменш стійкими до виділених нами штамів (рис. 2). Отже, найвищий рівень резистентності як до збудників грибною так і до збудників бактеріальної етіології виявили сорти — Оксамит та Микитинецький. Відмічена нами подібність стійкості сортів до грибних та бактеріальних хвороб узгоджується з даними літератури [8] та свідчить про однакову їхню генетичну детермінованість, що полегшує селекційну роботу під час виведення сортів з широкою стійкістю до патогенів.

Найбільш агресивними виявились штами 8, 9, 4а, 6а, агресивність яких в середньому становила 7 балів за 10-ти бальною шкалою. Найменш агресивними виявились штами під номером 1, 3А та 14, з агресивністю 5 балів (рис. 3).

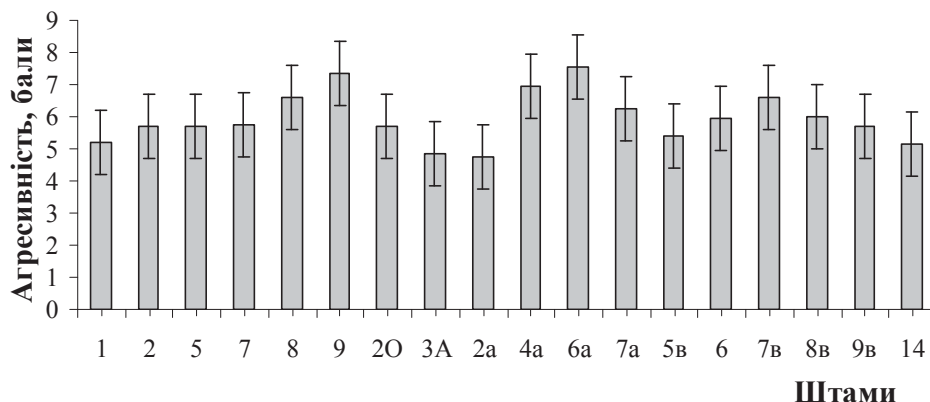


Рис. 3. Середня агресивність виділених штамів до різних сортів ріпаку

Слід також зазначити, що колекційні та виділені нами штами були гетерогенні за рівнем агресивності. Так, серед колекційних, відсоток штамів із низькою агресивністю становив 36 %, а серед ізованих нами лише – 11 %. Кількість високо- та середньоагресивних ізолятів у природній популяції виділених нами збудників бактеріальних хвороб ріпаку складає – 78 %. Натомість, відсоток колекційних штамів з високим- та середнім рівнем агресивності складає всього – 66 %, що дещо нижче порівняно з виділеними нами штамми. На наш погляд, даний факт, напевно, пояснюється тим, що під час тривалого зберігання у колекції агресивність штамів дещо знижується, що не суперечить даним літератури [4]. Спеціалізацію виділених нами штамів вивчали на окремих овочевих культурах. В результаті досліджень показано, що виділенні нами та колекційні штами є середньо- та високоагресивними для капусти сорту Амагер, моркви сорту Велес F1, картоплі сорту Слов'янка та томатів сорту Новічок, що свідчить про широку їх патогенність для ряду сільськогосподарських культур. Слід зазначити, що деякі виділені нами штами були досить агресивними щодо всіх досліджуваних нами об'єктів, що свідчить про високу агресивність досліджуваних ізолятів.

За результатами досліджень морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей штами (20, 3А, 2а, 5в, 6а, 6, 7в, 8в, 9в) це – прямі, рухомі палички, розташовані поодинокі або парами, грамнегативні і не утворюють спор. На картопляному агарі через дві доби утворюють сірувато-білі, напівпрозорі, блискучі, круглі, діаметром 1,0-2,5 мм, плоскі, з піднятим центром і, в основному, слабохвилястим краєм колонії, типові для роду *Pseudomonas* [2, 12]. Штами ростуть на МПБ (м'ясо-пептонний бульйон), пептонізують або згортають молоко, пошарово розріджують желатин. Здатні утворювати каталазу і оксидазу, підлужують лакмусову сироватку, не утворюють індол і сірководень. На мінеральному середовищі Омелянського, до якого додавали як єдине джерело вуглецю глюкозу, галактозу, арабінозу, манозу, фруктозу, ксилулу – утворюють кислоти. Не здатні зброджувати рамнозу, сахарозу, рафінозу, лактозу, мальтозу і манітол. Не засвоюють дульцитол та саліцин. Вивчений нами комплекс фенотипових властивостей підтверджує спорідненість їх з представниками роду *Pseudomonas*, а саме оксидазопозитивними представниками видів *P. fluorescens* та *P. marginalis* pv. *marginalis*

[2, 12]. Здатність виділених нами штамів уражувати окрім ріпаку, ще ряд рослин також свідчить на користь їх спорідненості з представниками видів *P. fluorescens* та *P. marginalis* pv. *marginalis*, які є класичними поліфагами.

Показано, що штами (1, 2, 5, 7, 8, 9) це – прямі, рухомі палички, розташовані поодинокі або парами, грамнегативні і не утворюють спор. При рості на картопляному агарі утворюють невеликі, округлі, гладкі, блискучі, жовті колонії з рівними краями, характерні для роду *Xanthomonas* [2, 12]. Дані ізоляти ростуть на МПБ, пептонізують або згортають молоко, розріджують желатин. Не здатні редукувати нітрати, утворюють каталазу, але не синтезують оксидазу, підлужують лакмусову сироватку. На мінеральному середовищі Омелянського, до якого додавали як єдине джерело вуглецю глюкозу, галактозу, арабінозу, ксилозу, мальтозу, сахарозу, рафінозу, манітол – утворюють кислоту, але не здатні засвоювати рамнозу, лактозу, дульцитол і саліцин.

Вивчення комплексу ознак фенотипу даних штамів підтверджує їх спорідненість із типовими представниками роду *Xanthomonas* і зокрема колекційним штамом *X. campestris* pv. *campestris* 8185 [2].

Є. Матвеевою і О. Ігнатовим [9] виявлено, що ріпак, як і соняшник може уражатися не тільки представниками виду *X. campestris* pv. *campestris*, а й *X. arboricola*. Показано, що виділені з ріпаку штами не несли характерного для *X. campestris* pv. *campestris* гену цитохрому P450, відрізнялися за послідовностями генів гірази В, генів *xcc006-007* і не мали жодного із 19 досліджуваних генів авірулентності [13, 10, 15]. Тобто, коректна ідентифікація збудників, які належать до роду *Xanthomonas* і здатні викликати захворювання ріпаку та соняшнику можлива лише із залученням сучасних молекулярно-генетичних методів.

Досліджені нами штами (4а, 7а, 14) – це прямі, рухливі поодинокі або розташовані парами, грамнегативні, аспорогенні палички. На картопляному агарі через дві доби утворюють сірувато-білі, опуклі, з конусним центром і рівними краями колонії типові для роду *Pectobacterium* [2, 7]. Здатні рости на МПБ, редукувати нітрати і пошарово розріджувати желатин. Варіабельні за здатністю пептонізувати і згортати молоко. Оксидазонегативні та каталазопозитивні. На мінеральному середовищі Омелянського, до якого додавали як єдине джерело вуглецю фруктозу, лактозу, рамнозу, ксилозу, рафінозу, галактозу, глюкозу, сахарозу, манітол та саліцин, утворюють кислоту. Не здатні використовувати дульцитол. Вивчений нами комплекс фенотипових властивостей вказує на спорідненість даних штамів із типовими представниками роду *Pectobacterium* і зокрема типовим штамом *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* В-1075[†] [2, 12].

Отже, на основі дослідження патогенних властивостей нами показано, що популяція збудників бактеріальних хвороб ріпаку у природі гетерогенна – 78 % високо- і середньоагресивних та 11 % низькоагресивних штамів. Слід зазначити, що найбільш агресивними серед усіх виділених нами ізолятів виявився збудник слизового бактеріозу *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, а найменш агресивним – поліфаг *Pseudomonas fluorescens*. Всі досліджувані нами штами є досить агресивними, як на різних сортах ріпаку, так і капусті сорту Амагер, та за основними морфолого-культуральними і біохімічними властивостями є спорідненими з основними збудниками бактеріозу коренів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, слизового бактеріозу *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Pseudomonas fluorescens*. Ізольовані нами збудники потребують наступної коректної ідентифікації із залученням новітніх молекулярно-генетичних методів досліджень, що і планується надалі.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ РАПСА

Резюме

В посевах рапса ярового и озимого обнаружены, описаны бактериальные поражения культуры и идентифицированы их возбудители. Характерные симптомы заболевания были следующие: побурение ткани стебля и его ослизнения, хлороз листьев, пожелтение и начало мягкого гниения в местах прикрепления черешков листьев, потеря пигментации (фиолетовая окраска). Исследованы патогенные свойства коллекционных и морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенных нами штаммов возбудителей бактериальных болезней рапса. Установлено, что все выделенные нами изоляты являются высоко- и среднеагрессивными по отношению к разным сортам рапса. По комплексу фенотипических признаков 44% от общего количества выделенных нами изолятов близкородственны с представителями рода *Pseudomonas*, 37% - *Xanthomonas* и 19% - *Pectobacterium*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактериальные болезни рапса, бактерии родов *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, бактериоз корней, слизистый бактериоз

О.М. Zakharova¹, М.Д. Melnichuk¹, Л.А. Dankevich², V.F. Patyka²

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv
²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

BACTERIAL DISEASES OF RAPE

Summary

Bacterial destruction of the culture was described and its agents identified in the spring and winter rape crops. Typical symptoms are the following: browning of stem tissue and its mucilagization, chlorosis of leaves, yellowing and beginning of soft rot in the place of leaf stalks affixion to stems, loss of pigmentation (violet). Pathogenic properties of the collection strains and morphological, cultural, physiological, and biochemical properties of the agents of rape's bacterial diseases isolated by the authors have been investigated. It was found that all the isolates selected by the authors are highly or moderately aggressive towards different varieties of rape. According to the complex of phenotypic properties 44% of the total number of isolates selected by the authors are related to representatives of the genus *Pseudomonas*, 37% – to *Xanthomonas* and 19% – to *Pectobacterium*.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: rape's bacterial diseases, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, bacteriosis of roots, slimy bacteriosis.

The authors' address: Zakharova O.M., National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine; 15 Heroiv oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine.

1. Бельтюкова К.И., Матыевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – Киев: Наук. думка, 1968. – 316 с.
2. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г., и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. – Киев: Наук. думка, 1988. – 552 с.
3. Гвоздяк Р.И., Пасичник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гриник І.В., Патики В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В.П.Патики. – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
4. Данкевич Л.А. Гвоздяк Р.І. Патогенні та біохімічні властивості збудника бурої бактеріальної плямистості люпину – *Pseudomonas lupini* // Агроекологічн. журн. – 2005. – №1. – С. 63–68.
5. Довідник із захисту рослин / Під ред. М.П. Лісового. – К.: Урожай, 1999. – 743 с.
6. Житкевич Н.В., Жмурко Л.Г. Розповсюдження бактеріальних захворювань сої у Київській області // Х з'їзд Товариства мікробіологів України: Тези доповідей (15-17 вересня, 2004 р.). – Одеса, 2004. – С. 275.

7. Житкевич Н.В., Новохацький Л.М., Данкевич Л.А., Гнатюк Т.Т. *Curtobacterium flaccumfaciens* – новий збудник захворювання сої в Україні // Матеріали XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (25–30 травня, 2009 р) – Ужгород: Ужгородський національний університет, 2009. – С. 303.
8. Зробок О.М., Боборусь С.В. Біологічна стійкість проти збудників хвороб і продуктивність сортів ріпака ярого а агроекологічних умовах полісся // Збірник наукових праць Уманського Державного Аграрного університету. – 2009. – Вип. 71, №1. – С. 78–85.
9. Матвеева Е.В., Игнатов А.Н., Политыко В.А., Фокина В.Г. Бактериальные болезни рапса // Защита растений. – 2008. – №12. – С. 23–24.
10. Пунина Н.В., Матвеева Е.В., Игнатов А.Н., Пехтерева Э.Ш., Политыко В.А., Шаад Н.В. Оценка генетического разнообразия генов 16SpPNK, GYRB и межгенных транскриптуемых регионов 16S – 23SpPNK и ХСС 0006-0007 бактерий рода *Xanthomonas* // 50 лет на страже продовольственной безопасности страны. Юбилейный сборник ВНИИФ. – 2008. – С. 330–347.
11. Технологія вирощування і захисту ріпаку. [Секун М.П., Лапа О.М., Марков І.Л., Ретьман С.В., Журавський В.В.] / за ред. М.П. Секуна та О.М. Лапи. – Укр. Акад. аграрних наук, Інститут захисту рослин, Національний аграрний університет, 2008. – 62 с.
12. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J. T., Garrity G.M]. – New York; USA: Springer Science+ Business Media, 2005. –Vol.2. – 1108 p.
13. *Bradbury J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria.* – Ferry Zane; Kew; Surrey, England: CAB Int. Mycolog. Institute, 1986. – 332 p.
14. Henry A.W. Letal J. Etiological and pathogenicity studies on the bacterial pod spot of rape // Canadian Plant Disease Survey. – 1977. – 57, N 1-2. – P. 23–28.
15. Ignatov, A., Monakhos G., Djalilov F., Pozmogova E.V. Avirulence gene in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* homologous to *avrBs2* is recognized by two race-specific resistance genes in *Brassica oleracea* // Genetika. – 2002. – N 38 – P. 1656–1662.

Отримано 13.10.2011