

БАКТЕРІАЛЬНА МІКРОБІОТА НАСІННЯ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

¹Дворак К.П., ²Буценко Л.М.

¹Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН,
вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03141

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України,
вул. Заболотного, 154, м. Київ, Д03680 ДСП, Україна
e-mail: ekaterina-dvorak@rambler.ru

Проаналізовано бактеріальну мікробіоту насіння цукрових буряків, вивчено морфологічні, культурально-біохімічні властивості виділених ізолятів. Показано, що на протруєному фунгіцидом насінні зберігаються патогенні бактерії. Вивчено антагоністичну активність мікробіоти насіння цукрових буряків щодо відомих збудників бактеріальних хвороб цієї культури.

Ключові слова: цукрові буряки, насіння, мікробіота, антагонізм, штучне зараження.

Насіння сільськогосподарських культур є субстратом для різноманітних мікроорганізмів: мікроміцетів, бактерій, мікоплазм і вірусів [10]. Мікробіоту насіння поділяють на кілька груп. Епіфітна мікробіота – мікроорганізми, які заселяють поверхню насіння та споживають продукти життєдіяльності рослинних клітин. За нормальних умов такі організми не інвазуються у внутрішні тканини і не завдають шкоди рослині [4]. За сприятливих умов епіфіти розмножуються на поверхні рослин і можуть створювати біологічний бар'єр, який перешкоджає проникненню паразитів у тканини рослин. Ендofітні мікроорганізми колонізують внутрішні тканини, але при цьому не викликають симптомів захворювання і не спричиняють негативного впливу на рослину [11]. Проте в складі епіфітної і ендofітної мікробіоти можуть бути мікроорганізми, здатні не лише проникати у внутрішні частини рослин, розвиватися там, а й викликати захворювання насіння та рослин, що виростають з нього [4].

Основою сучасного захисту рослин залишається використання пестицидів. Однак за використання речовини, токсичної для певного виду патогенних організмів, може спостерігатися поява стійких форм патогенів та розмноження патогенних організмів інших таксономічних груп. Показано [3], що на поверхні насіння цукрових буряків, обробленого високотоксичними інсектицидами Карбофуран і Гаучо, фунгіцидом Тачигарен та середньо токсичним фунгіцидом ТМТД, містилося навіть більше клітин бактерій, ніж на не протруєному (100–160 тис. та 30–40 тис., відповідно).

Тому метою нашої роботи був аналіз складу та біологічних властивостей мікробіоти насіння цукрових буряків, обробленого та не обробленого пестицидами.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень були зразки насіння цукрових буряків гібридів Олександрія та Уманський ЧС-97, виведених дослідно–селекційними станціями Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН.

Гібрид Олександрія – однонасінний триплоїдний на стерильній основі, врожайно–цукристого напрямку. До реєстру сортів рослин України занесений у 1997 році [7]. Досліджуване нами насіння гібриду Олександрія було оброблене фунгіцидним протруйником Максим XL 035 FS, т.к.с.

Гібрид Уманський ЧС-97 – це однонасінний диплоїдний МС гібрид цукристого напрямку. Гібрид стійкий до цвітущості, толерантний до коренеїда і церкоспорозу. У реєстр сортів рослин України занесений у 2003 році [7]. Насіння гібриду Уманський ЧС-97 використовували для дослідження без попередньої обробки.

Енергію проростання та схожість насіння досліджуваних гібридів визначали згідно ДСТУ [5].

Для ізоляції бактерій насінні клубочки після 15 хв промивання проточною та стерильною водою розтирали в ступці з 2 мл фізіологічного розчину, після чого невелику кількість матеріалу наносили на поверхню картопляного агару (КА) густими штрихами від одного краю чашки Петрі до іншого. Чашки витримували за температури 28 °С.

Для порівняльних досліджень використали колекційні штами збудників бактеріозів цукрових буряків: *Pseudomonas*

wieringae (Elliot) Savulesku 1947 штами 7923, 7921; *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Brown & Jamieson 1913) Yong, Dye & Wilkie 1978 штами 8544, 8545; *Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces 1950 штами 6, 10, 22, 7325, 8715, *Rhizobium vitis* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942 штами 9052, 9054, 8628, які зберігаються в колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Культуральні, фізіолого–біохімічні та морфологічні властивості виділених бактерій визначали, використовуючи класичні методи [1, 9]. Утворення пігментів визначали візуально в ультрафіолетовому світлі при вирощуванні бактерій на середовищі Кінг В. Бактерії ідентифікували у відповідності з визначником Берджі [6].

Для визначення наявності пектолітичних ферментів вивчали здатність ізолятів мацерувати шматочки картоплі. У виділених ізолятів визначали також здатність індукувати реакцію надчутливості та антагоністичну активність відносно колекційних штамів збудників бактеріозів цукрових буряків [1].

Патогенні властивості ізолятів визначали шляхом штучного зараження цукрових буряків (гібриди Баккара, Ольжич) та квасолі (сорт Мавка). Використовували суспензію бактерій (в концентрації 10^9 кл/мл стерильної водопровідної води), яку наносили на поверхню листків рослин з наступним травмуванням голкою [1]. Повторність дослідів 5–7–кратна.

Результати та обговорення. Проведені в 2012 році обстеження посівів цукрових буряків в Уладово–Люленецькій дослідно–селекційній станції (Вінницька область) показали, що на рослинах в період вегетації зустрічаються симптоми бактеріальної плямистості листків, хвостової гнилі та раку коренеплодів. Для визначення наявності фітопатогенних бактерій на насінні культури та впливу протруйників на склад мікробіоти проводили бактеріологічний аналіз зразків.

Насіння обох гібридів, взяте для аналізу, зовні виглядало здоровим і характеризувалося показниками, наведеними в табл. 1. Проростки із досліджуваних зразків насіння також були здоровими, без видимих ознак ураження.

Таблиця 1. Енергія проростання та лабораторна схожість насіння цукрових буряків

Гібрид	Енергія проростання (4-й день), %	Лабораторна схожість (10-й день), %
Уманський ЧС-97	68	93
Олександрія	70	90

Із досліджуваних зразків насіння виділено 18 різних типів ізолятів бактерій, з яких 12 – з насіння гібриду Уманський ЧС-97 та 6 – з гібриду Олександрія (табл. 2). Виділена більша кількість ізолятів із необробленого пестицидами насіння гібриду Уманський ЧС-97, що свідчить про більшу різноманітність його мікробіоти.

Таблиця 2. Результати бактеріологічного аналізу насіння цукрових буряків

Зразки		Кількість ізолятів бактерій		
гібрид	наявність хімічної обробки	всього ізолятів	у тому числі з колоніями	
			від кремового до оранжевого кольору	сірувато-білого кольору
Уманський ЧС-97	не оброблене	12	11	1
Олександрія	Максим XL 035 FS, т.к.с	6	3	3

У результаті аналізу нами виділено 1 ізолят із сірувато-білими колоніями та 11 ізолятів з колоніями, забарвленими в жовтий колір (від кремового до оранжевого) із насіння гібриду Уманський ЧС-97, яке не було оброблене пестицидами. З насіння гібриду Олександрія виділено 3 ізоляти жовтого кольору та 3 ізоляти сірувато-білого кольору. При пересівах інтенсивність кольору останніх залежала від партії картопляного агару. У всіх виділених ізолятів досліджено морфологічні та культурально-біохімічні властивості (табл. 3).

Таблиця 3. Морфологічні та культурально-біохімічні властивості бактерій, ізольованих з насіння цукрових буряків

Тести	Ізоляти, виділені з насіння гібриду																	
	Уманський ЧС-97											Олександрія						
	Б-27	Б-28	Б-29	Б-30	Б-31	Б-32	Б-33	Б-34	Б-35	Б-41	Б-45	Б-47	Б-36	Б-37	Б-38	Б-39	Б-40	Б-46
Забарвлення по Граму	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Рухливість	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+
Форма клітин	П	П	К*	П	П	П	П	П	К*	П	П	П	П	К*	П	П	П	
Спори	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Флуоресцентний пігмент	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–
Оксидаза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Використання джерел вуглецю:																		
Глюкоза (анаеробно)	К	К	К	–	К	–	–	–	К	–	–	К	–	–	–	К	–	К
Глюкоза (аеробно)	К	К	К	К	К	К	–	–	К	–	–	К	К	К	–	К	К	К
Рамноза	К	К	К	К	К	К	К±	–	н/в	–	–	К	К±	–	К±	К	К	н/в
Сахароза	К	К	К	К	К	К	К	–	н/в	–	–	К	К±	–	К±	К	К±	н/в
Ксилоза	К	К	К	К	К	К	К	–	н/в	–	–	К	К	К	К	К	К	н/в
Мальтоза	К	К	К	К	К	К	К	–	н/в	–	–	К	К	К±	К	К	К	н/в
Арабіноза	К	К	К	К	К	К	К	–	н/в	К±	К±	К	К	К	К	К	К	н/в
Маніт	К	К	К	К	К	К	К	–	н/в	–	–	К	К	–	К±	К	К±	н/в
Сорбіт	К	К	К	К	К	К	К	–	н/в	–	–	К	К	–	К±	–	К±	н/в
Колір колоній	жовтий	жовтий	сірий	жовтий	жовтий	жовтий	жовтий	жовтий	жовтий	рожевий	рожевий	жовтий	сірий	сірий	сірий	жовтий	кремовий	жовтий

Примітка: +/- – наявність або відсутність ознаки; К – утворення кислоти (зміна кольору середовища); К± – менш інтенсивне утворення кислоти; ± – часткова наявність ознаки; П – палички; К* – коки; н/в – результат не визначено.

Всі ізоляти, які нам вдалося виділити, є грамнегативними, оксидазонегативними, не утворюють спор. 61 % з них є рухливими. За формою клітин 83 % виділених бактерій є паличками, 17 % – дрібні коки. З виділених бактерій 44 % є факультативними анаеробами (Б-27, Б-28, Б-29, Б-31, Б-35, Б-46, Б-47, Б-39). Наявність флуоресцентного пігменту встановлено у ізолятів Б-30, Б-36, Б-40.

Як джерело вуглецю ізоляти Б-27, Б-28, Б-29, Б-30, Б-31, Б-33, Б-47, Б-36, Б-38, Б-39, Б-40 в різній мірі можуть використовувати рамнозу, сахарозу, ксилозу, мальтозу, арабінозу, маніт і сорбіт. Ізоляти Б-41, Б-45 та Б-37 використовують лише деякі з цукрів: Б-41 і Б-45 – арабінозу, Б-37 – ксилозу, мальтозу і арабінозу.

Нами ідентифіковані як представники роду *Pseudomonas* 17 % ізолятів (Б-30, Б-36, Б-40), що є аеробними рухливими паличками, які утворюють флуоресцентний пігмент і не утворюють спор.

Ізоляти Б-27, Б-28, Б-35, Б-46, Б-39 належать до виду *Pantoea agglomerans*.

Ізоляти Б-41 та Б-45 є представниками метилотрофних бактерій. Ці бактерії постійно заселяють філосферу сільськогосподарських, лікарських, декоративних та диких рослин [8].

Решта 8 ізолятів є представниками сапрофітної мікрофлори, які за проведеними нами тестами не можуть бути віднесені до певного виду.

Досліджено вірулентні та антагоністичні властивості виділених ізолятів (табл. 4).

Передбачаючи наявність серед виділених ізолятів пектолітичних бактерій, що викликають м'які гнилі, вивчали здатність ізолятів мацерувати шматочки картоплі. Встановлено, що жоден ізолят не спричиняє мацерацію картоплі. Таким чином, серед них немає збудників гнилей цукрових буряків (табл. 4).

Здатність індукувати реакцію надчутливості перевіряли у ізолятів, які попередньо ідентифіковано як *Pseudomonas sp.* Ізоляти Б-30 і Б-40 ініціювали утворення коричневих некрозів на листках тютюну. Здатність індукувати реакцію надчутливості пов'язана з вірулентними властивостями бактерій. Ізолят Б-36 не індукував реакцію надчутливості і, очевидно, є представником сапрофітної мікробіоти.

Таблиця 4. Вірулентні та антагоністичні властивості ізолятів з насіння цукрових буряків

Ізоляти	Тести				
	реакція надчутливості	мацерація картоплі	антагонізм	штучне зараження	
				цукрових буряків	квасолі
Б-27	н/д	–	–	–	–
Б-28	н/д	–	–	–	–
Б-29	н/д	–	–	–	–
Б-30	+	–	–	+	+
Б-31	н/д	–	–	–	–
Б-32	н/д	–	+	–	–
Б-33	н/д	–	–	–	–
Б-34	н/д	–	–	–	–
Б-35	н/д	–	–	–	–
Б-41	н/д	–	–	–	–
Б-45	н/д	–	–	–	–
Б-47	н/д	–	–	–	–
Б-36	–	–	–	–	+
Б-37	н/д	–	–	–	–
Б-38	н/д	–	–	–	–
Б-39	н/д	–	–	–	–
Б-40	+	–	+	+	+
Б-46	н/д	–	–	–	–

Примітка: +/- – наявність або відсутність ознаки; +* – антагонізм до *Xanthomonas axonopodis* б; +** – антагонізм до *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8545; н/д – не досліджували.

За штучного зараження рослин цукрових буряків встановлено, що ізолят Б-30 викликає на листках появу жовтих смужок та слабку деформацію жилки в місці уколу. Ізолят Б-40 спричиняв на листках виникнення плям, спочатку (3–4 доба) водонасичених, пізніше плями збільшувались у розмірах і темніли. Решта ізолятів не виявили патогенних властивостей за штучного зараження рослин цукрового буряку. За штучного зараження рослин квасолі ізоляти Б-30, Б-40 та Б-36 викликали на листках появу жовтих смужок.

Таким чином, нами виявлено патогенні для цукрового буряку бактерії як на необробленому насінні гібриду Уманський ЧС-97,

так і на обробленому фунгіцидом Максим XL 035 насінні гібриду Олександрія. Раніше нами було встановлено, що фунгіцид Максим не впливає на фітопатогенні бактерії – збудники хвороб цукрових буряків [2].

Перевірено антагоністичну активність виділених із насіння бактеріальних ізолятів до відомих збудників хвороб цукрових буряків. Слабку антагоністичну активність має ізолят Б-40, по відношенню до *Xanthomonas axonopodis* 6 (зона затримки росту – 18 мм), та ізолят Б-32, по відношенню до *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8545 (зона затримки росту – 30 мм). Решта ізолятів не виявляє антагоністичної активності.

Встановлено, що мікробіота необробленого насіння цукрового буряку є більш різноманітною, порівняно з мікробіотою насіння, протруєного фунгіцидом. Однак, патогенні для цієї культури бактерії (ізоляти Б-30 та Б-40) виділено з обох досліджуваних зразків насіння. Це свідчить про те, що фунгіцидний протруйник Максим XL 035 FS, т.к.с, який використовується для передпосівної обробки насіння, не може захищати цукрові буряки від збудників бактеріозів.

1. Бельтюкова К.И. Методы исследований бактериальных болезней растений /К.И. Бельтюкова, М.С. Матышевская, М.Д. Куликовская, С.С. Сидоренко. – К.: Наукова думка, 1968. – 316 с.

2. Дворак К.П. Бактеріальні хвороби цукрових буряків і чутливість їх збудників до різних доз пестицидів /Дворак К.П., Буценко Л.М. //Матер. XII конфер. молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (15–16 листопада 2012 року, Київ). – К., 2012. – С. 249–250.

3. Канивец В.И. Бактериальная микрофлора протравленных семян сахарной свеклы /Канивец В.И., Пищур И.Н. //Микробиология (Росія). – 2001. – Т. 70, № 3. – С. 370–373.

4. Макрушин М.М. Насінництво: підручник /М.М. Макрушин, Є.М. Макрушина. – [видання друге, доповнене і перероблене]. – Сімферополь: ВД «АРІАЛ», 2012. – 536 с.

5. Насіння цукрових буряків. Методи визначення схожості, одноростковості та доброякісності: ДСТУ 2292-93 (ГОСТ 22617.2-94). – [Чинний від 1996-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 1996. – 11 с.

6. Определитель бактерий Берджи /[Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.

7. Роїк М.В. Буряки /М.В. Роїк. – К.: «XXI вік» – РІА «ТРУД–КІІВ», 2001 – 320 с.

8. Романовская В.А. Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины /Романовская В.А., Столяр С.М., Малащенко Ю.Р. //Микробиол. журн. – 1996. – Т. 58, № 3. – С. 3–11.

9. Чумаевская М.А. Методические указания по изоляции и идентификации фитопатогенных бактерий /М.А. Чумаевская, Е.В. Матвеева. – М.: ВАСХНИЛ, 1986. – 39 с.

10. Lindow S.E. Microbiology of the phyllosphere /Lindow S.E., Brandl M.T. //Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – P. 1875–1883.

11. Schulz B. What are endophytes? /Schulz B., Boyle C. //Microbial Root Endophytes /Eds. B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, T.N. Sieber. – Berlin/Heidelberg: Springer, 2006. – P. 1–13.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ МИКРОБИОТА СЕМЯН САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

¹Дворак К.П., ²Буценко Л.М.

¹Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН, г. Киев

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, г. Киев

Проанализирована бактериальная микробиота семян сахарной свеклы, изучены морфологические, культурально-биохимические, вирулентные свойства выделенных изолятов. Показано, что на протравленных фунгицидом семенах сохраняются патогенные бактерии. Изучена антагонистическая активность микробиоты семян сахарной свеклы по отношению к известным возбудителям бактериальных болезней этой культуры.

Ключевые слова: сахарная свекла, семена, бактериальная микрофлора, антагонизм, искусственное заражение.

BACTERIAL MICROFLORA OF SUGAR BEET SEEDS

¹Dvorak K., ²Butsenko L.

¹Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet, NAAS, Kyiv

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kyiv

The paper shows the results of bacterial microflora of sugar beet seeds study, with the analysis of morphological, culture–biochemical and virulent characteristics of isolated bacteria. The presence of pathogenic bacteria was observed on seeds pretreated with fungicide. The antagonistic activity of bacterial microflora of sugar beet seeds in relation to known bacterial diseases agents of this culture was investigated.

Keywords: sugar beet, seeds, bacterial microflora, antagonism, artificial infection.