

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД

сумарних клітинних ліпідів збудників бактеріальних хвороб рослин томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Визначено жирнокислотний склад сумарних клітинних ліпідів збудників бактеріальних хвороб рослин томата в господарствах Дніпропетровської області. Встановлено, що причиною ураження рослин томата були бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* та *Xanthomonas vesicatoria*. З'ясовано, що профілі жирних кислот клітинних ліпідів, які виділено з ізолятів, варіюють в межах від C_{14} до C_{18} , з різним якісним та кількісним складом.

бактеріальні хвороби, томат, клітинні ліпіди, жирні кислоти, ідентифікація

Бактеріальні хвороби томата, які поширені у відкритому і закритому ґрунті, змушують виробника до постійного санітарного контролю посадок. Своєчасна діагностика хвороби дає змогу уникнути епіфітотії і зберегти врожай [8, 11]. Нині запропоновано точні молекулярні та серологічні методи діагностики збудників бактеріальних хвороб рослин томата [10, 11]. На території України розпочато випробування та впровадження наявних тест-систем.

Показано, що жирнокислотний склад сумарних клітинних ліпідів є інтегральним хемотаксономічним показником видів фітопатогенних бактерій [2, 3, 5, 10], у яких визначено близько 300 жирних кислот (ЖК) і споріднених сполук [12]. Склад і концентрація ЖК залежать від генотипу і є специфічним для певного виду, а в деяких випадках — штам. ЖК відіграють ключову роль в адаптаційних процесах бактерій до нових умов середовища, а їх кількісний склад регулюють умови культивування [5, 7]. Не дивлячись на зміни вмісту ЖК, їх якісний склад та співвідношення залишаються сталими в межах одного виду [12].

У роботах дослідників [2, 8] ідентифікація фітопатогенів за спектром ЖК збігається з даними досліджень ДНК-ДНК і ДНК-рРНК гібридизації, що підтверджує його високу специфічність [8]. З огляду на це, вивчення якісного і кількісного складу ЖК, які локалізовані в лі-

Ю.Ф. АВЕТИСЯН,
аспірант

Ю.В. КОЛОМІЄЦЬ,
кандидат біологічних наук

І.П. ГРИГОРЮК,
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Національний університет біоресурсів
і природокористування України

підах мембран бактерій, дає змогу визначити їх причетність до бактеріального ураження рослин.

Мета досліджень. Вивчити фенотипові властивості і жирнокислотний склад сумарних клітинних ліпідів патогенних ізолятів для видової ідентифікації збудників бактеріальних хвороб рослин томата.

Методика досліджень. Рослини томата з ознаками бактеріального ураження одержували в різні періоди вегетації з господарств Дніпропетровської області. Досліджували за стандартними мікробіологічними та фітопатологічними методами [6, 9].

Чисті культури збудників брали з шматочків плодів, листків і стебел томата на межі здорової та ураженої тканини. Зразки промивали проточною водою, ополіскували у стерильній воді та гомогенізували у стерильній фарфоровій ступці. Одержану суспензію висівали на картопляний агар (КА) в чашки Петрі й інкубували протягом 72 год за температури 27°C. Колонії, що виросли, відбирали для дослідження патогенних, морфологічних і фізіологічних властивостей.

Морфологічні властивості визначали за методом [9], а фізіолого-біохімічні — з використанням набору для ідентифікації бактерій API 20E (bioMerieux). Утилізацію левана спостерігали за умов зростання бактерій на МПА з 5% сахарозі.

Жирнокислотний склад сумарних клітинних ліпідів визначали методом газорідинної хроматографії у вигляді метилових ефірів

на хромато-мас-спектрометричній системі «Agilent 6800N/5973 inert». Газ-носії — гелій (1 мл/хв), температура термостату — 150—250°C, її підвищення — 4°C/хв. Температура випарювача становила 250°C. Детектор — мас-спектрометричний, температура інтерфейсу — 250°C. Для ідентифікації ефірів ЖК використовували мас-спектрометричну базу даних і стандартний набір суміші метилових ефірів ЖК (виробник «Supelco», США).

Приготування бактеріальної маси.

Бактерії культивували одну добу на КА за температури 28°C, змивали фізіологічним розчином і осаджували центрифугуванням за 2000 об./хв протягом 40 хв. Гідроліз бактеріальних клітин і метилювання ЖК проводили витримуванням протягом 1 год за температури 80°C в 3 мл 1,5% розчину H_2SO_4 в метанолі у запаяних ампулах. Одержану суміш додавали до 3 мл дистильованої води. Метилові ефіри жирних кислот екстрагували двічі сумішшю діетиловий ефір : гексан (1:1), після чого відбирали верхню фракцію, яку переносили в пробірку для упарювання [13].

Жирнокислотний склад сумарних клітинних ліпідів у вигляді метилових ефірів ідентифікували за часом їх утримання порівняно зі стандартами. Стандартами слугували метилові ефіри ЖК фірми Supelco (США).

Результати досліджень. Зразки рослин томата, які одержали з господарств Дніпропетровської області, відзначалися уповільненим ростом і пригніченим зовнішнім виглядом. Для першої групи рослин характерними були симптоми чорної бактеріальної плямистості томата (збудник *Xanthomonas vesicatoria*), другої — чорної бактеріальної крапчастості (збудник *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).

З уражених рослин нами виділено 35 ізолятів. Для досліджень відбирали круглі і жовті з рівними краями слизові колонії, які характерні для *X. vesicatoria* [4] (далі ізоляти А), а також сіро-білі, округлі й слабо підняті з гладкою блискучою поверхнею, що характерні для збуд-

ників роду *Pseudomonas* sp. [4] (дали ізоляти Б). Вони спричинювали ураження органів рослин томата за умов штучного зараження.

Мікробіологічні дослідження, які описано в роботі Ю.Ф. Аветисян, Ю.В. Коломиец [1], підтвердили, що хвороба рослин томата в господарствах Дніпропетровської області викликана збудниками бактеріальної плямистості *X. vesicatoria* і бактеріями виду *Pseudomonas* sp. [4]. Для уточнення одержаних результатів проведено визначення кількісного та якісного складу ЖК клітинних ліпідів ізолятів.

З'ясовано, що профілі ЖК клітинних ліпідів ізолятів знаходяться в межах від C_{14} до C_{18} , однак їх якісний і кількісний склад був різним (табл.).

Порівнювальна оцінка складу ЖК клітинних ліпідів збудників бактеріальних хвороб рослин томата господарств Дніпропетровської області (2013 р.)

ЖК	Ізоляти А	Ізоляти Б
	% загального вмісту ЖК	
$C_{10:0}$	1,6	—
$C_{10:0}$ 3-ОН	—	0,5
$C_{12:0}$	—	5,1
$C_{12:0}$ 2-ОН	—	2,0
$C_{12:0}$ 3-ОН	—	0,6
i- $C_{13:0}$ 3-ОН	0,9	—
i- $C_{15:0}$	2,3	—
a- $C_{15:0}$	9,2	—
$C_{15:0}$	1,4	—
i- $C_{16:0}$	6,7	—
$C_{16:1}$ cis 9	32,7	35,6
$C_{16:0}$	20,5	23,4
$C_{16:1}$ B	3,1	—
a- $C_{17:0}$	2,5	—
$C_{18:1}$ cis 9	1,5	—
$C_{18:1}$ cis 11	—	26,8
$C_{18:0}$	5,6	4,4

У літературі узагальнено і систематизовано інформацію щодо кількісного та якісного складу ЖК родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas* [2, 3, 12]. Зокрема, за наявності в клітинних мембранах фітопатогенних бактерій 2- та 3-гідрокси ЖК виділено шість груп, деякі з яких поділяють на підгрупи [12].

До першої групи віднесено бактерії з $C_{10:0}$ 3-ОН, $C_{12:0}$ 2-ОН та $C_{12:0}$ 3-ОН ЖК [12]. Першу групу поділяють на 5 підгруп (1a, 1d, 1c, 1e

та 1f). До підгрупи 1a належать *P. agarici*, *P. aeruginosa*, *P. asplenii*, *P. aureofaciens*, *P. caricapapayae*, *P. chlororaphis*, *P. cichorii*, *P. ficuserectae*, *P. fluorescens* biovar 1, *P. fluorescens* biovar 2, *P. fluorescens* biovar 3, *P. fluorescens* biovar 4, *P. fluorescens* biovar 5, *P. fuscovaginae*, *P. gingeri*, *P. marginalis* pv. *alfalfae*, *P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. marginalis* pv. *pastinacae*, *P. meliae*, *P. putida* biovar A, *P. putida* biovar B, *P. reactans*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. tolaasii* та *P. viridiflava* [12].

Особливістю фітопатогенних бактерій підгрупи 1a є подібність жирнокислотного профілю до *P. syringae* pv. *syringae* (відношення $C_{16:0}$ до $C_{16:1}$ cis 9 менше 0,9, сума $C_{16:1}$ cis 9 та $C_{18:1}$ cis 11 більша 52%). Крім того, *P. syringae* pv. *tomato*, як виняток, не містить $C_{17:0}$ та $C_{19:0}$ ЖК, у підгрупі 1a виявлено невеликий відсоток 3-оксидеканової кислоти (до 5—6%), порівняно з іншими [12].

Встановлено, що ізоляти Б, ідентифіковані як бактерії роду *Pseudomonas* sp., мають менше 3% $C_{12:0}$ 2-ОН, сума $C_{16:1}$ cis 9 та $C_{18:1}$ cis 11 становить 62,33, а співвідношення $C_{16:0}$ до $C_{16:1}$ cis 9 — 0,66. У профілі переважають гексадеканова ($C_{16:0}$), гексадеценнова ($C_{16:1}$) та октадеценнова ($C_{18:1}$ cis 11) ЖК (табл.). Кількість міnorних ЖК клітинних ліпідів ізолятів Б також узгоджується з даними для підгрупи 1a [12]. Зразки, з яких виділено збудника, мали симптоми ураження бактеріальною крапчастістю (рис.) [6].

На плодах помітні дрібні темно-коричневі злегка опуклі крапки, на листках — із забарвленням від темно-коричневого до чорного (рис). Одержані дані свідчать, що ізоляти Б не містять $C_{17:0}$ та $C_{19:0}$ ЖК (табл.) і це дає підставу віднести їх до фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *tomato*.

Для ізолятів А характерна наявність значної кількості розгалужених ЖК (i- $C_{13:0}$ 3-ОН, i- $C_{15:0}$, a- $C_{15:0}$, i- $C_{16:0}$ і a- $C_{17:0}$), а пряомланцюгові $C_{16:1}$ cis 9 та $C_{16:0}$ становлять максимальну частку від загального профілю (табл.). Гідроксикислоти представлені ізоформою $C_{13:0}$ 3-ОН. Одержані нами результати підтверджують схожість жирнокислотних профілів ізолятів Б з групою б, що



Рис. Візуальні симптоми ураження на плодах (ліворуч) та листках (праворуч) рослин томата ізолятами Б *Pseudomonas* (Дніпропетровська обл., 2013 рік)

класифікована [12] і до якої належить збудник бактеріальної крапчастості рослин томата — *X. vesicatoria*.

ВИСНОВКИ

Вивчення жирнокислотного складу сумарних клітинних ліпідів виділених ізолятів корелює з результатами морфологічного та біохімічного аналізу [1]. Підтверджено, що причинами загибелі посадок томатів у Дніпропетровській області є поширення збудників бактеріальної плямистості *X. vesicatoria* та бактеріальної крапчастості *P. syringae* pv. *tomato*.

Визначення збудників бактеріальних хвороб є основою для розробки профілактичних заходів з обмеження інфекції, засобів захисту і недопущення спалаху епіфітотії бактеріальної крапчастості та плямистості.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аветисян Ю.Ф. Возбудители бактериальных болезней томата в хозяйствах Днепропетровской области / Аветисян Ю.Ф., Коломиец Ю.В. // Глобализация науки: проблемы и перспективы: сборник статей Международной научно-практической конференции (7 февраля 2014 г.). — Уфа: РИЦ БашГУ, 2014. — 3. — С. 186—189.
2. Полиамины некоторых видов родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium* / Жеребило О.Е., Гвоздяк Р.И., Матышевская М.С., Мурас В.А., Сидоренко С.С. // Микробиол. журн. — 1985. — 47, № 1. — С. 81—82.
3. Сравнительное изучение жирнокислотного состава некоторых групп несерных пурпурных бактерий / Компанцева Е.И., Имхофф И.Ф., Тиманн Б. [и др.] // Микробиология. — 2007. — 76, № 5. — С. 615—626.
4. Микроорганизмы — возбудители болезней растений / В.И. Билай, Р.И. Гвоздяк, И.Г. Скрипаль и др. — К.: Наук. думка. — 1988. — 552 с.
5. Вплив умов культивування на жирнокислотний склад клітинних ліпідів *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* / Мороз С.М., Гвоздяк Р.І., Черненко Є.П., Остапчук А.М. // Микробиол. журн. — 2010. — Т. 72, № 3. — С. 28—36.
6. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні

хвороби рослин: Монографія / Р.І. Гвоздяк [та ін.] ; за ред. В.П. Патики — К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. — 444 с.

7. Черненко Є.П. Вплив умов культивування на жирнокислотний склад *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* / Черненко Є.П., Мороз С.М. // Біологічні дослідження молодих вчених в Україні: матеріали VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів 21–22 вересня 2006 р. — Київ, 2006. — С. 76–77.

8. Черненко Є.П. Бактеріальні хвороби томату і біологічне обґрунтування заходів обмеження їхнього розвитку : автореф. дис. на здобуття наук. ст. канд. біол. наук : спец. 06.01.11 «Фітопатологія» / Є.П. Черненко. — К., 2009. — 18 с.

9. Janse J.D. Phytobacteriology: Principles and Practice / J.D. Janse // Wallingford, UK : CABI Publishing, — 2005. — 34 p.

10. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* / R.P. Leite, G.V. Minsavage, U. Bonas [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. — 1995. — № 60. — P. 1068–1077.

11. Ozdemir Z. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures / Z. Ozdemir // J. of Plant Pathology. — 2009. — № 91. — P. 495–497.

12. Stead D.E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1992. — 42, № 2. — P. 281–295.

13. Stead D.E. Modern methods for classification of plant pathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae* / D.E. Stead, J. Hennessey, J.G. Elphinstone [et al.] // In Developments Plant Pathology. — 1998. — № 9. — P. 427–434.

Аветисян Ю.Ф., Коломиец Ю.В., Григорюк И.П.

Жирнокислотный состав суммарных клеточных липидов возбудителей бактериальных болезней растений томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Исследован жирнокислотный состав суммарных клеточных липидов возбудителей бактериальных болезней растений томата в хозяйствах Днепропетровской области. Установлено, что причиной поражения растений томата были бактерии — *P. syringae* pv. *tomato* и *X. vesicatoria*, и что профили ЖК клеточных липидов,

выделенных из изолятов, находятся в пределах от C_{14} до C_{18} с различным качественным и количественным составом.

бактериальные болезни, томат, клеточные липиды, жирные кислоты, идентификация

Avetysian Yu.F., Kolomiets Yu.V., Grygoryuk I.P.

Fatty acid composition of total cellular lipids of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bacterial diseases

Fatty acid composition of total cellular lipids of bacterial diseases of tomato plants in farms of Dnipropetrovsk region is researched. It is established that the cause of tomato plants lesions were such bacteria as *P. syringae* pv. *tomato* and *X. vesicatoria*. It was found that the profiles of the LCD cell lipids isolated from isolates ranged from C_{14} to C_{18} with different qualitative and quantitative composition.

bacterial diseases, tomato, cellular lipids, fatty acids, identification

Рецензент:

Драгозов І.В., доктор біологічних наук
Інститут мікробіології і вірусології НАН

УДК 632.51:93

© О.В. Широкоступ, 2014

ВАЖЛИВИЙ ЭЛЕМЕНТ ТЕХНОЛОГИИ ВИРОЩУВАННЯ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ

Буряки цукрові мають складну технологію вирощування, у тому числі і надійного захисту від бур'янів. Застосування гербіцидів створює небезпеку пригнічення сходів культури індукуванням у них хімічного стресу. Для компенсації небажаного пригнічення посівів застосовують їх обприскування гербіцидами разом з мікродобривами.

У дрібноділянкових польових дослідженнях проведено оцінку застосування різних систем захисту посівів буряків цукрових від бур'янів і способів раціонального внесення мікродобрива Вуксал. Встановлено, що за перевищення норм внесення гербіцидів можна частково компенсувати хімічний стрес у рослин культури застосуванням мікроелементів через 5 днів після обприскування гербіцидами.

буряки, бур'яни, гербіциди, стрес, мікроеlementи

Буряки цукрові в останні роки одержали нову перспективу щодо їх вирощування. Таку оцінку дали всім

О.В. ШИРОКОСТУП,

аспірант

Інститут біоенергетичних культур
і цукрових буряків НААН

відомій культурі на Європейському форумі буряків цукрових, який відбувся у м. Берлін 2008 року. Як найпродуктивніша культура помірного кліматичного поясу планети, буряки цукрові отримали ще одне цільове призначення для вирощування і широкого практичного використання. Крім головної цукроносної культури, вони стали ще і перспективною біоенергетичною культурою як сировина для промислового виробництва біогазу, біоетанолу та біобутанолу.

Сучасна технологія вирощування коренеплодів буряків цукрових є достатньо складною і багатоелементною. Цілком заслужено саме цю технологію називають «вищим

пілотажем» сучасного польового землеробства.

Одним з ключових елементів технології вирощування буряків цукрових є забезпечення ефективного захисту посівів культури від бур'янів. Здійснювати захист таких посівів складно. Причин багато. Орні землі в більшості регіонів країни мають високий рівень потенційної засміченості насінням бур'янів. За сприятливих погодних умов у зоні Лісостепу на площі 1 м² протягом теплового періоду року може проростати до 2500 і більше штук бур'янів різних видів [1]. Рослини культури, завдяки своїм специфічним особливостям (морфологічна будова — вкорочене стебло-розетка), мають низьку здатність протистояти появі сходів диких видів у посівах, тому площі швидко заростають бур'янами [2]. У більшості поширених видів бур'янів період появи сходів розтягнутий і їх складно успішно контролювати одним, навіть ефективним, методом [3].