

УДК 632.3:579.84

© 2018

БАКТЕРІАЛЬНИЙ БІОМ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ ЗА ДІЇ КОРЕНЕЇДА

К.П. Кукол¹, Л.М. Буценко², В.П. Патица³

^{1, 2} кандидати біологічних наук

³ доктор біологічних наук, професор, академік НААН

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ, 03022, Україна

^{2, 3} Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143, Україна

e-mail: ¹katerinakukol@gmail.com, ²Plant_path@ukr.net,

³patykovolodymyr@gmail.com

Надійшла 20.02.2018

Мета. Ізолювати та ідентифікувати бактерії в складі бактеріального біому рослин буряків цукрових, уражених коренеїдом. **Методи.** Польовий — для відбору зразків рослин з ознаками ураження; лабораторні (мікробіологічні та фітопатологічні) — для виділення бактерій у чисту культуру, визначення їх патогенності; біохімічні — для встановлення властивостей ізольованих бактерій. **Результати.** Здійснено бактеріологічний аналіз зразків рослин буряків цукрових із типовими симптомами коренеїда. **Висновки.** Крім основних збудників коренеїда, у складі біому уражених рослин ідентифіковані бактерії роду *Bacillus* та виду *Pectobacterium carotovorum*, які здатні ініціювати гниття або посилювати патологічний процес, спричинений іншими мікроорганізмами.

Ключові слова: буряки цукрові, коренеїд, ураження, біом, бактерії, властивості, ідентифікація.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201805-04>

Буряки цукрові за своїм народногосподарським значенням в Україні займають провідне місце серед технічних культур. Класична технологія їх вирощування передбачає агротехнічні, біологічні та хімічні методи обмеження розвитку хвороб, бур'янів і шкідників [1]. Проте незадовільний рівень захисту рослин від шкідливих організмів, недостатнє удобрення та інші порушення технології вирощування є основними чинниками зниження врожайності коренеплодів [2].

Поширеною в усіх зонах бурякосіяння хворобою буряків цукрових є коренеїд [2–5]. Останніми роками значний розвиток спостерігається у Вінницькій (30,5%), Чернігівській (16), Черкаській (15,6), Львівській (15), Київській та Сумській (14%) областях [6].

Перші ознаки ураження з'являються на проростках ще до появи сходів на поверхні ґрунту. Хвороба розвивається у фазах вилочки, першої і другої пар справжніх листків. На початку патологічного процесу на підсім'ядольному коліні або корінці з'являється прозора, а потім бурувата пляма або смужка. Надалі це побуріння, а згодом і почорніння поширюється по підземній частині проростка. Уражені ділянки загнивають, часто утворюються перехвати [3]. Симптоми і перебіг хвороби змінюються залежно від фази розвитку рослин, видів збудників, агрокліматичної зони вирощування і погодних умов [5, 7].

Першопричиною коренеїда є несприятливі умови навколишнього середовища, які знижують стійкість рослин до мікроорганізмів, відбувається ураження ослаблених

проростків. Багаточисельні види ґрунтових мікроміцетів можуть спричиняти патологічний процес на початкових етапах росту рослин буряків цукрових, проте найчастіше рослини інфікують представники родів *Aphanomyces*, *Phyium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Rhizoctonia* [4, 5].

Сапрофітні та патогенні бактерії можуть підселятися в ослаблені та уражені тканини проростків, ініціювати або посилювати інфекційний процес. Для підбору ефективних засобів захисту сільськогосподарських культур від хвороб важливо враховувати видовий склад патогенів, які спричиняють ураження рослин із різноманітними симптомами та наслідками для рослин.

Мета досліджень — ізолювати та ідентифікувати бактерії в складі біому буряків цукрових, уражених коренеїдом.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для досліджень були проростки буряків цукрових із вираженими симптомами ураження коренеїдом, відібрані на дослідних ділянках Уладово-Люлинецької дослідно-селекційної станції. Вони характеризувалися почорнінням підземної частини проростка з перехватами темних тканин, розміщеними в нижній частині підсім'ядольного коліна.

Для ізоляції бактерій із промитих рослин з ознаками ураження відокремлювали шматочки, які б охоплювали частину ураженої та здорової тканин, розтирали їх у ступці з 0,5 мл стерильної водогінної води і використовували для бактеріологічного посіву на поверхню картопляного агару (КА). Бактерії культивували за температури 28°C упродовж 2-х діб.

Морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні властивості виділених бактерій досліджували, використовуючи класичні методи [8, 9]. Утворення пігментів визначали візуально в ультрафіолетовому світлі за вирощування бактерій на середовищі Кінг Б та м'ясо-пептонному агарі. Здатність до засвоєння окремих вуглеводів як єдиного джерела вуглецевого живлення встановлювали на середовищі Омелянського, яке містило індикатор бромтимол синій. Як джерело вуглецю використовували (0,5%) фруктозу, лактозу, арабінозу, сахарозу, рафінозу, галактозу, рамнозу, мальтозу, дульцитол, інозитол, сорбітол та інулін. Тип засвоєння глюкози (O–F test) визначали, засіваючи середовище

Омелянського з глюкозою та індикатором у 2-х пробірках. Після посіву одну з пробірок заливали вазеліновим маслом шаром 1 см. Наявність росту бактерій визначали за зміною кольору середовища. Для встановлення наявності пектолітичних ферментів вивчали здатність ізолятів бактерій мацерувати шматочки картоплі, буряку столового і моркви. Здатність індукувати реакцію надчутливості визначали, вводячи суспензію бактеріальних клітин 1×10^7 КУО/мл під епідерміс листків тютюну за методом Z. Klement et al. [9]. Ідентифікацію виділених бактерій здійснювали відповідно до визначника Бергі [10].

Результати досліджень. У результаті бактеріологічного аналізу досліджуваних зразків проростків буряків цукрових із типовими симптомами ураження коренеїдом виділено різні морфологічні типи ізолятів бактерій, 65% з яких мали колонії сірого кольору, 15 — білого та 20% — світло-жовтого. За росту на картопляному агарі колонії ізолюваних бактерій різнилися між собою за ступенем прозорості, мали гладеньку або зморшкувату поверхню та рівні або лапчасті краї.

Перевірку патогенних властивостей здійснювали штучним зараженням гібридів буряків цукрових вітчизняної та зарубіжної селекції (Український ЧС-72 та Крокодил). Було встановлено, що жоден з ізолятів бактерій, виділених з уражених коренеїдом рослин буряків цукрових за штучного зараження рослин обох гібридів, не спричиняє видимих симптомів ураження. Також жодний ізолят не спричиняв реакцію надчутливості у листках тютюну.

За дослідження пектолітичної активності ізолятів бактерій, виділених з уражених коренеїдом рослин, визначено наявність ізолятів, які спричиняють мацерацію шматочків картоплі. Для виявлення здатності мацерувати тканини інших культур бактеріальну масу було нанесено на шматочки буряку столового та моркви. Після 24-годинного перебування в чашках Петрі в термостаті за температури 27°C було підтверджено здатність 5-ти ізолятів бактерій розм'якшувати тканини шматочків буряку столового та моркви. Розм'якшення шматочків було інтенсивним, спостерігалось утворення на їхній поверхні ексудату (рисунок).

Ураження коренеїдом призводить до загибелі проростків, що іноді є причиною пересівання [5]. Однак більшість фітопатологів



Мацерація тканин шматочків картоплі, буряку столового та моркви, спричинена ізолятами бактерій, виділеними з уражених коренеїдом рослин буряків цукрових

вважають першопричиною коренеїда ураження мікроміцетами. Водночас ураження пектолітичними бактеріями так само може бути причиною загибелі сходів. Точне визначення етіології збудника коренеїда є запорукою успішного проведення заходів щодо запобігання цій хворобі.

Усі ізоляти, що характеризувалися пектолітичною активністю, було відібрано для подальшої ідентифікації.

На поверхні КА 3 пектолітично активні ізоляти (К-3, К-9 та К-16) формували гладенькі, блискучі, з рівним краєм, напівпрозорі колонії сірого кольору. Ізоляти К-3, К-9 та К-16 є грамнегативними, оксидазонегативними, рухливими паличками з ферментативним типом засвоєння глюкози і добре вираженою пектолітичною активністю, тому їх попередньо ідентифіковано як представників роду *Pectobacterium*.

Для точнішої ідентифікації виділених бактерій визначали спектр ферментації вуглеводів і ряд інших властивостей та порівнювали отримані результати з даними інших дослідників і матеріалами визначника (таблиця).

Отже, за такими ознаками, як фарбування за Грамом, рухливість, форма клітин, відсутність спорування, здатність спричиняти загнивання рослинних тканин, відсутність утворення індолу та сірководню, здатність до редукції нітратів і використання як джерел вуглецевого живлення глюкози, фруктози, лактози, мальтози, рафінози, галактози, дульцитулу, манітолу, сорбітолу, рафінози та інозитолу, виділені з уражених коренеїдом рослин буряків цукрових ізоляти бактерій К-3, К-9 і К-16 ідентичні виду *Pectobacterium carotovorum* Thompson et al. 1984.

Найвністю пектолітичної активності характеризувалися також ізоляти К-14 та К-19, які формували на КА зморшкуваті, непрозорі колонії світло-кремового кольору діаметром 2–3 мм. За своїми біологічними властивостями вони грамполітивні, оксидазонегативні рухливі споруотворювальні палички, які не редукують нітрати, не утворюють сірководень та індол і засвоюють арабінозу. На основі комплексної оцінки ізоляти К-14 і К-19 належать до роду *Bacillus*.

Ураження рослин коренеїдом може спричиняти розвиток низки гнилей під час вегетації та зберігання буряків цукрових [7]. Посилювачами процесів гниття можуть бути ізольовані бактерії з яскраво вираженою пектолітичною активністю, які зумовлювали мацерацію тканин буряків, картоплі та моркви.

Наслідки коренеїда проявляються в різних деформаціях коренеплодів і зменшенні їхньої маси [7]. Так, за слабого розвитку хвороби (25%) маса коренеплодів знижується майже на 20%, за сильного (75%) — на 43 і більше, водночас зменшується і вихід цукру з 26 до 45% [5]. Це свідчить про необхідність захисту рослин буряків цукрових від патогенів, які спричиняють ураження коренеїдом. Також слід обмежувати розвиток бактерій *P. carotovorum*, які нами було ізольовано та ідентифіковано. У літературі є дані про те, що патогенні бактерії *P. carotovorum* 8982 в умовах лабораторного дослідження нечутливі до рекомендованих виробником і вдесятеро збільшених доз таких препаратів (діючі речовини): 25 г/л флудіоксонілу, 100 г/л пенконазолу, 250 г/л дифеконазолу, 700 г/кг тіофанат-метилу, 640 г/кг манкоцебу + 40 г/кг металаксилу та 500 г/кг беномілу [12].

Характеристика пектолiтично-активних iзолятiв бактерiй, видiлених з уражених коренеїдом рослин бурякiв цукрових

Тест	Ізоляти з уражених коренеїдом рослин	<i>Pectobacterium carotovorum</i> [10]	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> [11]
Забарвлення за Грамом	—	—	—
Рухливість	+	+	+
Форма клітин	П	П	П
Спороутворення	—	—	—
Флуоресцювальний пігмент	—	—	—
Оксидаза	—	—	—
Пектолiтична активнiсть	+	+	+
Реакція надчутливості	—	—	н/д
Використання джерел вуглецю:			
глюкози (анаеробно)	К	К	К
глюкози (аеробно)	К	К	К
фруктози, лактози, сахарози, рафінози	К	К	К
галактози, рамнози	К	К	К
мальтози	К	Х	—
дульцитолу	К±	—	—
манітолу, інозитулу	К	К	К
сорбітолу	К	Х	—
арабінози	К	—	К
інуліну	К±	Х	н/д
Редукція нітратів	+	+	+
Утворення індолу	—	—	—
Утворення H ₂ S	—	—	—

Примітки. + — наявність ознаки; — — відсутність ознаки; К — утворення кислоти (зміна кольору середовища); Х — штамова варіабельність; П — палички; н/д — не досліджували.

Потребують вивчення питання чутливості зазначеного виду бактерій до хімічних засобів захисту рослин, якими здійснюють протруювання насіння буряків цукрових з метою

захисту рослин на початкових етапах росту та розвитку від комплексу шкідливих організмів, що перебувають у ґрунті і здатні уражувати проростки хворобами.

Висновки

У результаті проведених досліджень у складі бактеріального біому рослин буряків цукрових, уражених коренеїдом, на основі визначення морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей ідентифіковано

бактерії роду *Bacillus* та пектолiтично-активні бактерії *Pectobacterium carotovorum*, здатні спричиняти загнивання рослин або підселятися в уражені іншими патогенами тканини.

Кукол Е.П.¹, Буценко Л.Н.², Патька В.Ф.³
¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, ул. Васильковская, 31/17, г. Київ, 03022, Україна, ²Інститут мікробіології

і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, ул. Заболотного, 154, г. Київ, 03022, Україна; e-mail: ¹katerinakukol@gmail.com, ²plant_path@ukr.net, ³patykovolodymyr@gmail.com

Бактеріальний біом свеклы сахарной при действии корнееда

Цель. Изолировать и идентифицировать бактерии в составе биомы растений свеклы сахарной, пораженных корнеедом. **Методы.** Полевой — для отбора образцов растений с признаками поражения; лабораторные (микробиологические и фитопатологические) — для выделения бактерий в чистую культуру, определения их патогенности; биохимические — для установления свойств изолированных бактерий. **Результаты.** Осуществлен бактериологический анализ образцов растений свеклы сахарной с типичными симптомами корнееда. **Выводы.** Кроме основных возбудителей корнееда, в составе биомы растений свеклы сахарной, пораженных корнеедом, установлено наличие бактерий рода *Bacillus* и пектолитически активных бактерий *Pectobacterium carotovorum*, которые способны инициировать гниение или усиливать патологический процесс, вызванный другими микроорганизмами.

Ключевые слова: свекла сахарная, корнеед, поражение, биом, бактерии, свойства, идентификация.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201805-04>

Kukol K.¹, Butsenko L.², Palyka V.³

¹Institute of plant physiology and genetics of NAS

of Ukraine, Vasylykivska Str., 31/17, Kyiv, 03022, Ukraine, ^{2,3}D. Zabolotnyi Institute of microbiology and virology of NAS of Ukraine, Zabolotnyi Str., 154, Kyiv, 03022, Ukraine; e-mail: ¹katerinakukol@gmail.com, ²plant_path@ukr.net, ³patykvavolodymyr@gmail.com

Bacterial biome of sugar beet with black root of sugar beet

The purpose. To isolate and identify bacteria in structure of biome of plants of sugar beet, contaminated with black root of sugar beet. **Methods.** Field — for sampling plants with disease symptoms; laboratory (microbiological and phytopathological) — for allocation of bacteria in pure culture, determination of their disease-inciting power; biochemical — for determination of properties of the isolated bacteria. **Results.** Bacteriological analysis of samples of plants of sugar beet with typical symptoms of black root of sugar beet is carried out. **Conclusions.** Except for the basic causal organisms of black root of sugar beet, in structure of biome of plants of sugar beet, contaminated with black root of sugar beet they fixed presence of bacteria of stem *Bacillus* and pectolytic-active bacteria of *Pectobacterium carotovorum* which are capable to initiate putrefaction or reinforce pathological process caused by other microorganisms.

Key words: sugar beet, black root of sugar beet, contamination, biome, bacteria, properties, identification.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201805-04>

Бібліографія

1. Лихочвор В.В., Петриченко В.Ф., Іващук П.В., Корнійчук О.В. Рослиництво. Технології вирощування сільськогосподарських. Львів: НВФ «Укр. технології», 2010. 1088 с.

2. Трибель С.О., Стригун О.О. Динаміка вирощування цукрових буряків в Україні та фітосанітарний стан посівів. Зб. наук. праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН. 2012. Вип. 14. С. 217–222.

3. Пожар З.А. Комплексная система защиты сахарной свеклы от болезней. Эффективные меры борьбы с болезнями и вредителями при интенсивной технологии возделывания сахарной свеклы. Киев: ВНИИС, 1990. С. 5–9.

4. Роїк М.В., Нурмухаммедов А.К. Хвороби коренеплодів цукрових буряків. Київ: Поліграф-Консалтинг, 2004. 224 с.

5. Саблук В.Т., Шендрік Р.Я., Запольська Н.М. Шкідники та хвороби цукрових буряків. Київ: Колообіг, 2005. 448 с.

6. Пінчук Н.В., Буткалюк Т.О., Вергелес П.М. Встановлення основних збудників коренеїда цукрових буряків та ефективність використання

заходів боротьби. Сільське господарство та лісівництво. 2016. Вип. 3. С. 245–254.

7. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М. та ін. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин. Київ: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. 444 с.

8. Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования бактериальных болезней растений. Киев: Наук. думка, 1968. 316 с.

9. Klement Z., Rudolf K., Sands D.C. Methods in phytobacteriology. Budapest: Akademiai Kiado, 1990. 568 p.

10. Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Second Edition. Springeu, 2005. V. 2, part B. 1106 p.

11. Максименко Л.А., Пархоменко Н.И., Мороз С.Н., Горб Т.Е. Изучение свойств изолятов пектолитических фитопатогенных бактерий, выделенных в Украине. Микроб. журн. 2013. Т. 75, № 6. С. 66–72.

12. Петриченко В.Ф., Корнійчук О.В., Пасічник Л.А. та ін. Бактеріальні хвороби сільськогосподарських рослин і пестициди. Вісн. аграр. науки. 2013. № 4. С. 21–26.