

УДК 579. 57.083.12.13

## БАКТЕРІЇ-ЕНДОФІТИ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН КАРТОПЛІ

М. І. Демчинська, І. В. Демчук, С. М. Мороз

**Бактерії-ендофіти в культурі тканин картоплі.** — М. І. Демчинська<sup>1</sup>, І. В. Демчук<sup>2</sup>, С. М. Мороз<sup>3</sup>. — Досліджено та ідентифіковано бактерії, що спричинюють аномалії розвитку експлантів картоплі, які віднесені до родів *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp. та *Clavibacter* sp. Показано, що ендоефіти впливають на інфекційний процес, який викликає збудник мокрої гнилі картоплі *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

**Адреса:** <sup>1</sup>Ужгородський національний університет, кафедра ентомології, вул. Волошина, 32, м.Ужгород, 88000 Україна; e-mail: demmira@rambler.ru, <sup>2</sup>Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: Inga\_11ua@yahoo.com, <sup>3</sup>Інститут мікробіології і вірусології НАНУ, вул. Заболотно-го, 154, м. Київ, Д 03680 ГСП, Україна; e-mail: Phytopath@imv.kiev.ua

**Endophytic Bacteria in Micropropagated Potato Plants.** — M. I. Demchynska<sup>1</sup>, I. V. Demchuk<sup>2</sup>, S. M. Moroz<sup>3</sup>. — From the staggered micropropagated potato plants were isolated endophytic bacteria, which are delivered to the *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp. and *Clavibacter* sp. It is shown the endophytic bacteria influence the infectious process which is caused by the agent of soft rot potato *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

**Address:** <sup>1</sup>Uzhgorod National University, cathedra entomology, 32, Voloshuna st., Uzhorod, 88000; e-mail: demmira@rambler.ru; <sup>2</sup>Institute of Agricultural Microbiology UAAS, 97, Shevchenko st., Chernygov, 14027, Ukrain; e-mail: Inga\_11ua@yahoo.com; <sup>3</sup>Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny St., Kyiv, D 03680, Ukrain; e-mail: Phytopath@imv.kiev.ua

### Вступ

Присутність ендоефітних бактерій в рослинних експлантатах є суттєвою проблемою для комерційних та науково-дослідних лабораторій, які займаються культурою тканин рослин, в тому числі картоплі. Бактерії-ендофіти, що залишаються після поверхневої стерилізації рослинних експлантів, потрапляють в рослини-регенеранти, накопичуються і розповсюджуються в лініях під час мікроклонування. В природних умовах ендоефітні бактерії утворюють з рослиною-хазяїном стійкі асоціації на основі мутуалістичних взаємин, а в специфічних умовах *in vitro* ця рівновага порушується, що може призводити до різноманітних аномалій у розвитку пробіркових рослин.

В останні роки все більша кількість досліджень свідчить, що ендоефіти – це нормальна мікрофлора внутрішніх тканин рослин. Видовий склад ендоефітної популяції впливає на ураження рослин фітопатогенами [1]. Попередні дослідження показали, що ендоефітні бактерії картоплі передаються у бульбових поколіннях, як *in vitro*, так *in vivo*, а також можуть сприяти кращому росту і розвитку бактеризованих *in vitro* рослин.

Встановлено, що штам *E.herbicola* Eh 252 може бути біоагентом контролю м'якої гнилі картоплі [2]. Штам *Pseudomonas fluorescens* F113, що продукує 2,4-діацетилфлороглюцинол, уповільнював ріст *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* на пожи-

вному середовищі, а також запобігав загинанню механічно ушкоджених бульб в умовах *in vitro*[3].

Метою наших досліджень було вивчення бактерій, які обумовлюють виникнення аномалій розвитку пробіркових рослин, та їх взаємодію із збудником мокрої гнилі картоплі.

### Матеріали та методи

Виділення бактерій проводили шляхом розкладання шматочків пробіркових рослин картоплі (сортів Повінь, Леді Розета, Обрій, Чарівниця) з ознаками аномального розвитку на чашки Петрі з картопляним агаром (КА) та методом розтирання з наступним висівом на м'ясо-пептонний агар (МПА). Морфологічні, культуральні, фізіологічні та біохімічні властивості виділених ізолятів вивчали за загальноприйнятими методиками [4, 5, 6]. Надчутливу реакцію проводили на листках тютюну за методом, запропонованим Клементом [7]. Ідентифікацію збудників проводили за визначником бактерій [8] та колекційними штамами *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7755, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 8982, *Pseudomonas fluorescens* 8573, з колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Взаємодію виділених ізолятів із збудником мокрої гнилі *E. carotovora* subsp. *carotovora* 8982 визначали методом штучного зараження бульб кар-

топлі (сорти Леді Розета та Агрія) в лабораторних умовах, титр бактеріальної суспензії  $10^9$  кл/мл. Облік проявлення штучного зараження проводили за 4-х бальною шкалою [9].

### Результати досліджень і їх обговорення

При культивуванні *in vitro* окремих сортів картоплі відмічали аномальний розвиток кореневої системи рослин: утворення густої щіточки нерозгалужених корінців, які закінчуються темними потовщеннями (рис. 1, б), утворення рихлих "вузликів" у місці розгалуження кореня з утворенням нормального бічного корінця (рис. 1, в) або утворенням темного потовщення замість бічного корінця (рис. 1, г). Рослина з такого типу коренями або росте нормально, або, частіше, має калусоподібні розростання на листках та стеблах (рис. 2), що можуть призводити до затримки росту, деформації стебел та загибелі пробіркової рослини. Попередніми дослідженнями встановлено, що причиною цих аномалій є бактерії.

За характером росту на поживних середовищах, культуральними та біохімічними властивостями, отримані ізоляти бактерій віднесено до *P. fluorescens*, *Bacillus* sp., *Clavibacter* sp.

Ізоляти *Clavibacter* sp. 3 та 5 на КА формували жовті, круглі колонії з рівним краєм. Гідролізували крохмаль, розріджували желатину, були каталазо-позитивними та оксидазонегативними. Використовували глюкозу, сахарозу, лактозу та рафінозу.

Ендофітні бактерії, які на картопляному агарі формували зморшкуваті, непрозорі колонії світло-кремового кольору з хвилястим краєм, розріджували желатину, редукували саліцин, не використовували лактозу і дульцит ідентифіковані як *Bacillus* sp.

На картопляному агарі ізолят *P. fluorescens* 2 формував прозорі світлі колонії круглої форми з рівним краєм, на середовищі Кінга В продукує екзогенний флуоресціюючий пігмент. Використовував глюкозу, рамнозу, сахарозу, манніт, сорбіт. Каталазо- та оксидазопозитивний.

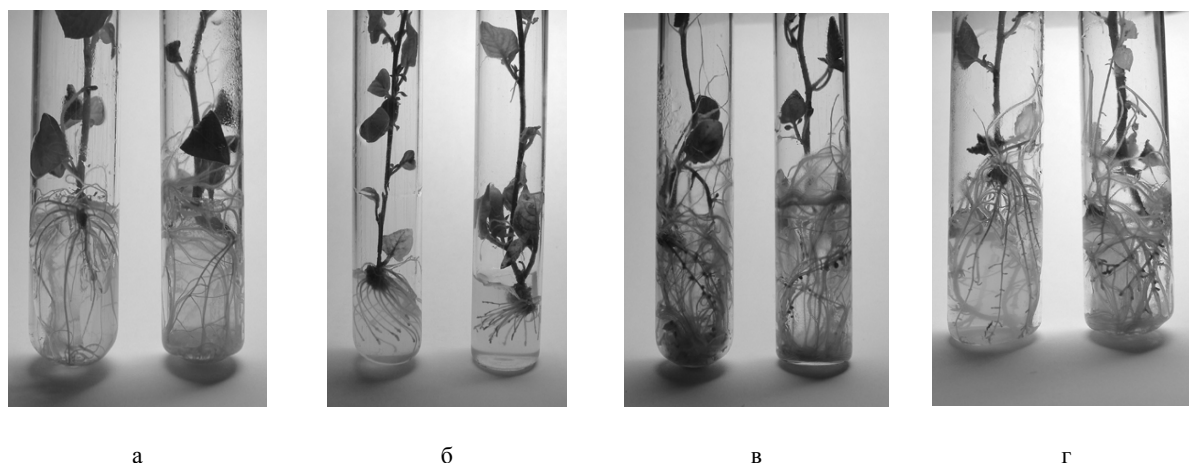


Рис. 1. Типи аномального розвитку кореневої системи пробіркових рослин картоплі

(а – рослина з нормальною кореневою системою, б, в, г – пояснення в тексті).

Таблиця 1. Результати штучного зараження експлантатів картоплі сумішшю *E. carotovora subsp. carotovora* 8982 з ендофітами

Варіанти дослідів (співвідношення патоген:ендофіт)	Сорт Агрія					Сорт Леді Розета				
	<i>Clavibacter</i> sp. 3	<i>Clavibacter</i> sp. 5	<i>P. fluorescens</i> 2	<i>Bacillus</i> sp. 1	<i>Bacillus</i> sp. 9	<i>Clavibacter</i> sp. 3	<i>Clavibacter</i> sp. 5	<i>P. fluorescens</i> 2	<i>Bacillus</i> sp. 1	<i>Bacillus</i> sp. 9
	1:0 (К)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
9:1	2,7	2,8	1,2	2,2	2,3	2,1	2,6	2,0	2,5	2,6
4:1	2,1	2,3	0,9	1,7	2,1	1,5	2,2	1,5	2,1	1,7
7:3	1,5	1,9	0,6	1,5	1,1	1,8	2,0	1,6	1,5	1,6
6:4	0,8	1,2	0,8	0,4	0,9	0,9	1,6	1,1	1,8	1,2
1:1	0,6	0,9	0,3	0	0,6	0,4	1,4	0,7	1,1	0,4
4:6	0,3	0,8	0	0,2	0,5	0,2	0,7	0,1	1,2	0,3
3:7	0,4	0,3	0	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,6	0,3
1:4	0,2	0,3	0	0,2	0,1	0,1	0,1	0	0,4	0,1
1:9	0,2	0	0	0,3	0,1	0	0,1	0	0,4	0,1
0:1 (К)	0	0	0	0,4	0,4	0	0	0	0,2	0,1

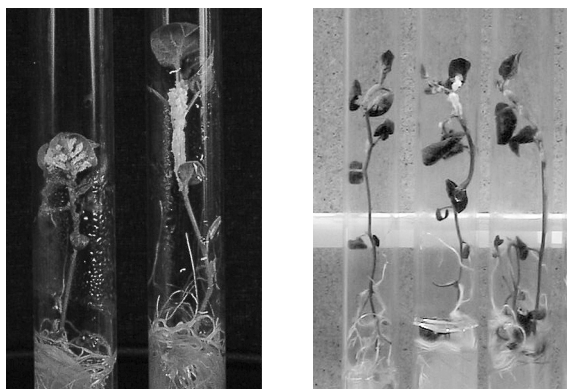


Рис. 2. Калусоподібні нарости на листках та стеблах пробіркових рослин.

Жоден з виділених ендоефітних ізолятів не виявляв антагоністичної дії щодо тест-культур фітопатогенних бактерій та не викликав реакцію надчутливості на листі тютюну. Однак, всі досліджувані ізоляти впливали на патологічний процес, який викликає *E. carotovora subsp. carotovora* (табл. 1). Найкращу здатність впливати на інфекційний процес виявив ізолят *P. fluorescens 2*, який навіть при незначному навантаженні значно знижував агресивність патогена.

Інші ізоляти проявили нижчу здатність запобігати розвитку гнилей. При інокуляції рослин картоплі бактеріальною суспензією в співвідношенні

3:7 збудник мокрої гнилі практично втрачав здатність викликати інфекційний процес.

На відміну від інших штамів, ізоляти *Bacillus sp* в співвідношенні 0:1 викликали незначну некротизацію тканин картоплі в місці інокуляції. В співвідношенні 1:1 у сорту Агрія повністю запобігали розвитку гнилей, і в меншій мірі проявили себе при інокуляції сорту Леді Розета. Наші дані про здатність бактерій-сапрофітів впливати на розвиток патологічного процесу узгоджуються з даними інших дослідників [1,3], що викликає необхідність подальшого вивчення взаємного впливу ендоефітів та патогенів у тканинах рослин.

## Висновки

Причиною аномалії росту та розвитку пробіркових рослин картоплі є бактерії-ендоефіти, які за основними культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями віднесені до різних систематичних груп.

Ендоефіти можуть впливати на інфекційний процес, який викликає збудник мокрої гнилі картоплі. Тому проблему бактерій-ендоефітів можна розглядати як перспективу для створення штучних асоціацій ендоефітів з рослинами, які сприятимуть підвищенню їх стійкості до фітопатогенів *in vitro* та *in vivo*.

**Подяки:** Автори висловлюють глибоку вдячність за допомогу у виконанні роботи Петренко О.М., Волковій І.В., Зарицькому М.М. (ІСГМ УААН), Гвоздюку Р.І. (ІМВ ім. Д.К.Заболотного НАН України).

1. Пасічник Л. А., Гвоздяк Р. І., Ходос С. Ф. Епіфітна і ендоефітна мікрофлора здорового зерна та вегетуючих рослин пшениці // Збірник статей учасників Міжнародної наукової конференції „Фітопатогенні бактерії, фітонцидологія, алелопатія”, 4–6 жовтня 2005 р., м. Київ. – С. 8–13.
2. Cronin D., Moenne Loccoz Y., Fenton A., Dunne C., Dowling D. N., O’Gara F. Ecological interaction of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora subsp. Atroseptica* // FEMS Microbiology Ecology. – 1997. – Vol. 23, №2. – P. 95–106.
3. Vanneste J. L., Perry J. N., Perry Meyer L. J., Bedford R. J., Popay A. J. *Erwinia herbicola* Eh252 as a biological control agent of bacterial soft rot on potatoes // The Forty Seventh New Zealand plant Protection Conference Proc.of Conf. (Waintngi Hotel, New Zealand, 9–11 August, 1994): Abstr. – New Zealand Plant Protection Society, Rotoria, 1994. – P. 198–200.
4. Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. Методы исследования бактериальных возбудителей болезней растений. – К.: Наукова думка, 1968. – 316 с.
5. Klement Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas* // Nature. – 1963. – 199, N 4890. – P. 299–300.
6. Klement Z., Rudolph K., Sands D. S. Methods in phyto bacteriology. – Budapest: Akademia kiado, 1990. – 568 p.
7. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. – 9<sup>th</sup> ed. – Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1984. – Vol. 1. – 964 p.
8. Немерицька Л. В. Різновиди змішаних гнилей // Карантин і захист рослин. – 2004. – № 8. – С. 22–23.

Отримано: 10 січня 2006 р.

Прийнято до друку: 19 травня 2006 р.