

БІОЛОГІЧНИЙ ЗАХИСТ ЯСЕНА ЗВИЧАЙНОГО ВІД *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SAVASTANOI* (ТЕОРЕТИКО-ПРИКЛАДНИЙ АСПЕКТ)

*І. М. Кульбанська, здобувач**

Національний університет біоресурсів і природокористування України

*На основі міко- та мікробіологічних досліджень взаємовідносин між різними видами фітопатогенних бактерій – збудників бактеріальних захворювань ясен звичайного, у тому числі туберкульозу, наведено експериментальні дані результатів пошуку антагоністів, що дає можливість розробки теоретико-прикладних аспектів біологічного захисту *Fraxinus excelsior* L. від *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Досліджено антагоністичну активність між бактеріями-епіфітами, ізольованими із вегетативних та генеративних органів ясен звичайного, колекційними штамами, аеробними спороутворювальними бактеріями роду *Bacillus* sp. та мікроміцетами у їхній системній взаємодії. Акцентовано увагу, що фітопатогенна бактерія *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* є основною та найбільш шкодочинною компонентою патогенної мікрофлори ясен звичайного.*

Ключові слова: *туберкульоз ясен звичайного, патогенна мікрофлора, штам, мікроміцети, антагонізм, антагоністична активність, біологічні методи захисту.*

Серед інфекційних хвороб ясен звичайного найбільшої шкоди лісостанам Західного Поділля завдає туберкульоз (збудник – фітопатогенна бактерія *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*), яка уражує як вегетативні (окрім листя), так і генеративні органи. Збудник бактеріозу призводить до послаблення росту і розвитку дерев. У процесі патогенезу в уражених стовбурах утворюються більші або менші пустоти, каверни, раковини тощо, що знецінює деревину.

* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор А. Ф. Гойчук

Нині боротьба з бактеріальними хворобами лісових деревних рослин, у тому числі туберкульозом ясена, базуються на організаційно-господарських, лісівничих та лісокультурних заходах, які мають профілактичний характер та спрямовані зазвичай на ліквідацію наслідків патології.

Останнім часом активно ведуть пошук і впроваджують у виробництво біопрепарати для захисту рослин на основі бактерій роду *Bacillus* sp. [8, 9]. У Росії широко застосовують для захисту рослин від хвороб такі біопрепарати, як агат, бактофіт, фітоспорин, фітоспорин М [6, 7].

В Інституті мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного на основі *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ 5137 створено новий біологічний препарат – «Спорофіт», який проходить випробовування в польових умовах [3]. В результаті лабораторних досліджень встановлено, що препарат проявляє антагоністичні властивості щодо різних видів бактерій роду *Xantomonas* та *Pseudomonas* [4]. Також проводять лабораторні і польові дослідження біологічного препарату «Фітодоктор» із метою розширення спектра його застосування. Запатентовано новий, високоактивний щодо широкого кола збудників штам *Bacillus subtilis* IMB B-7243 [5].

Отже, одним із перспективних напрямів біологічного методу захисту рослин від шкідливих організмів є пошук бактерій-антагоністів. Тому з'ясування взаємовідносин між різними видами фітопатогенних бактерій – збудників бактеріальних захворювань ясена звичайного (туберкульозу та всихання) у контексті виявлення активних антагоністів до фітопатогенних бактерій є надзвичайно важливим та актуальним.

Мета досліджень – встановлення антагоністичних взаємовідносин між складниками міко- та мікробіоти ясена звичайного у їхній системній взаємодії.

Матеріали та методика досліджень. Роботу виконано за загальноприйнятими методами спеціальних мікробіологічних та мікологічних досліджень [1], які проведено на базі Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Матеріал для досліджень (понад 840 зразків)

зібрано в насадженнях за участю *F. excelsior* L. свіжих дібров Західного Поділля України.

Взаємовідносини між різними видами фітопатогенних бактерій – збудників бактеріальних захворювань ясена звичайного, у тому числі туберкульозу, вивчали методом відстроченого антагонізму. В чашки Петрі на поверхню картопляного агару по діаметру петлею засівали бактеріальну масу однодобової основної дослідної культури. Через 5–7 діб культивування у термостаті за температури 28 °С перпендикулярно до основної культури на відстані 1 мм підсівали тест-культуру, яку готували таким чином: однодобову агарову (КА) культуру розводили стерильною водогінною водою до стандарту мутності з титром 10^8 кл·мл⁻¹. Облік результатів проводили на 2-гу та 6-ту добу. При обліку враховували наявність або відсутність росту тестової культури. Ступінь антагоністичної активності штамів визначали за зонами затримки росту культур фітопатогенних бактерій. Якщо затримки росту не спостерігалось (0 мм), то культуру вважали неактивною, при затримці росту від 1 до 10 мм – слабоактивною, від 11 до 20 мм – середньоактивною, вище 20 мм – високоактивною. Повторність дослідів – трикратна.

Результати досліджень. З вегетативних та генеративних органів ясена звичайного ми виділили різні за систематичною належністю та функціональними можливостями мікроорганізми. Зокрема, ізольовано фітопатогенні бактерії, які ми, зазвичай, звикли розглядати лише у контексті збудників інфекційних хвороб. Захисна роль фітопатогенних бактерій виявляється навіть стосовно живильної рослини чи її органу: слабо агресивний або авірулентний штам підвищує стійкість рослин до високоагресивного штаму. У природі постійно відбувається саморегуляція агресивності популяції і, залежно від умов, вона збільшується або зменшується [2].

В експерименті використано ізольовані нами з уражених гілок, верхівкових бруньок, квітів, насіння та листя *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas* sp., а також колекційні штами – *Pseudomonas savastanoi* 9174, *Pseudomonas syringae*

8511, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Ervinia carotovora* 8982, *Xantomonas campestris* 8003 б з колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Дослідження взаємовідносин між патогенами ясена звичайного проводили як між штамми одного виду, так і між штамми, які належать до різних родів і видів. Усі штами було використано в перехресних реакціях «основна культура – тестова культура». Всього поставлено 108 варіантів реакцій. Також досліджували антагоністичну взаємодію між бактеріями-епіфітами, ізольованими із вегетативних та генеративних органів ясена звичайного, та аеробними спороутворювальними бактеріями роду *Bacillus* sp. (табл. 1).

1. Антагоністичні взаємовідносини між бактеріями-епіфітами ясена звичайного та бактеріями роду *Bacillus* sp.

Тест-культури бактерій (умовне позначення, вид)	Антагоністи		
	<i>Bacillus</i> sp. П27ант	<i>Bacillus</i> sp. Віктант	Середня стерильна зона, мм
	Стерильна зона, мм		
Кр₂ <i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	9	0	4,5
Кр₄ <i>Pseudomonas</i> sp.	12	9	10,5
Кр₅ <i>Pseudomonas</i> sp.	5	7	6
9к₁ <i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	0	4	2
11₂ <i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	11	9	10
Н₁ <i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	13,5	15	14,3
К₆ <i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	0	0	0
<i>P. syringae</i> 8511	9,5	4	6,8
<i>P. savastanoi</i> 9174	16,5	19,5	18
<i>P. fluorescens</i> 8573	7,5	10	8,8
<i>E. carotovora</i> 8982	2	2,5	2,3
<i>X. campestris</i> 8003 б	20	18	19

Як видно з табл. 1, найвищу антагоністичну активність проявив штам Віктант до колекційного штаму *P. savastanoi* 9174 – зона затримки росту складала 19,5 мм (середньоактивний). Також середньоактивним він виявився щодо штаму *P. syringae* pv. *savastanoi* (Н₁) та проявив слабку антагоністичну дію до штамів *Pseudomonas* sp. (Кр₄, Кр₅), *P. syringae* pv. *savastanoi* (9к₁, 11₂) і

P. syringae 8511 (затримка росту коливалася в межах 4–9 мм). Культура виявилася неактивною до штаму *P. syringae* pv. *savastanoi* (K₆).

Штам П27ант (як і Віктант) проявив найвищу антагоністичну активність до штаму *P. savastanoi* 9174, зона затримки росту склала 16,5 мм (середньоактивний). Також середньоактивним він виявився щодо штамів *Pseudomonas* sp. (Kp₄) та *P. syringae* pv. *savastanoi* (11₂, H₁) – зона затримки росту коливалася в межах 5–13,5 мм. Виявлено слабку антагоністичну дію до штамів *P. syringae* pv. *savastanoi* (Kp₂), *Pseudomonas* sp. (Kp₅) та *P. syringae* 8511 (зона затримки росту коливалася в межах 5–9,5 мм). Культура виявилася неактивною до штаму *P. syringae* pv. *savastanoi* (K₆), (як і Віктант) та *P. syringae* pv. *savastanoi* (9K₁).

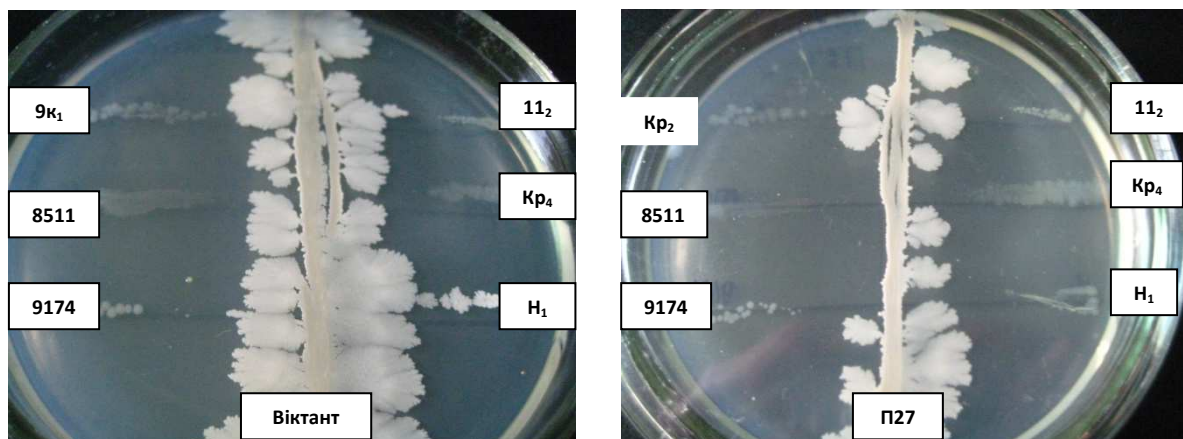


Рис. Антагоністична дія Віктант та П27ант на бактерії-епіфіти ясена звичайного

Епіфіти, ізольовані нами з генеративних органів ясена звичайного, не проявили антагоністичної дії щодо тестових культур – патогенів ясена звичайного; зона затримки росту – 0 мм.

Щодо взаємодії між бактеріями-епіфітами та мікроміцетами, ізольованими нами із органів ясена звичайного, то ми не виявили антибактеріальної і антигрибної. Незначні зони, які утворилися при дії бактерій на мікроміцети, теж фактично нульові. Можна допустити, що і в природі фітопатогенні бактерії поза патологічним процесом не впливають на ріст мікроміцетів. Мікроміцети, на відміну від бактерій-епіфітів, певною мірою пригнічували ріст тест-культур фітопатогенних бактерій. Аналогічні результати

отримали й інші автори [2]. У взаємодії мікроміцетів та *Bacillus* sp. виявлено лише поодинокі випадки антагоністичної взаємодії.

Для перевірки ефективності припущення щодо чутливості фітопатогенних бактерій до перерахованих вище антагоністів ми в польових умовах провели штучне ураження гілок ясен звичайного чистими культурами патогенних бактерій H_1 (*P. syringae* pv. *savastanoi*), K_{p4} (*Pseudomonas* sp.), 9_{k1} (*P. syringae* pv. *savastanoi*), *Savastanoi* (*P. syringae* pv. *savastanoi*), виділених із вегетативних та генеративних органів ясен звичайного із характерними ознаками ураження туберкульозом, чистими культурами антагоністів Π_{27} , Віктант та $K_{1-4\text{ант}}$ (робочий розчин титром 1×10^7 КУО·мл⁻¹), а також сумішшю бактерії та антагоніста (табл. 2).

2. Результати перевірки антагоністичної активності фітопатогенних бактерій-епіфітів ясен звичайного та антагоністів у польових умовах

Тест-культура (умовне позначення)	<i>Savastanoi</i>	H_1	K_{p4}	9_{k1}	$\Pi_{27\text{ант}}$	Віктант	$K_{1-4\text{ ант}}$
Π_{27}	+	+	+	+	+	—	—
Віктант	±	±	+	+	—	+	—
$K_{1-4\text{ ант}}$	+	+	±	+	—	—	+
<i>Savastanoi</i>	+	—	—	—	—	—	—
H_1	—	+	—	—	—	—	—
K_{p4}	—	—	±	—	—	—	—
9_{k1}	—	—	—	+	—	—	—

*Примітка: — негативна, + позитивна реакція; ± варіабельність.

Узагальнюючи результати досліджень антагоністичних взаємовідносин між міко- та мікрофлорою вегетативних та генеративних органів ясен звичайного у лабораторних умовах, можна стверджувати, що серед бактерій ясен звичайного, у тому числі фітопатогенних, не виявлено високоактивних антагоністів, що не дає підстав для подальшого їх використання як біологічного пестициду.

Висновки

1. Серед бактерій ясена звичайного, у тому числі фітопатогенних, не виявлено антагоністів зі стерильною зоною, яка перевищує 30 мм, що не дає підстав для подальшого їх вивчення як біологічного пестициду.
2. Чинниками обмеження заселення ясена звичайного фітопатогенними бактеріями є спороносні бактерії та мікроміцети.
3. Серед вивчених ізолятів не виявлено стимуляторів росту патогенних мікроорганізмів.

Список літератури

1. Гвоздяк Р. И. Методы выделения возбудителей бактериозов древесных пород / Р. И. Гвоздяк, А. Ф. Гойчук // Лесн. хоз-во. – 1991. – № 31. – С. 55–56.
2. Гвоздяк Р. І. Взаємовідношення між збудниками бактеріозів томатів / Р. І. Гвоздяк, Л. М. Яковлева, Є. П. Черненко, С. М. Мороз // Міжнародна наукова конференція «Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія» (4–6 жовтня 2005 р.) : збірник статей. – Житомир, 2005. – С. 118–122.
3. Жмурко Л. І. Спророфіт проти сірої гнилі гречки / Л. І. Жмурко, Р. Є. Грищенко, С. В. Лапа, Н. В. Ткаченко // Карантин і захист рослин. – 2005. – № 6. – С. 10–11.
4. Лапа С. В. Препарат спорофіт як засіб захисту від фітопатогенних бактерій / С. В. Лапа, Н. В. Житкевич, М. М. Кирик // Міжнародна наукова конференція «Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія» (м. Київ, жовтень, 2005) : тез. доп. – К. : Альфа-Прайм, 2005. – С. 69.
5. Лапа С. В. Антагонистическая активность штаммов бактерий рода *Bacillus* к возбудителям грибных и бактериальных болезней зернобобовых культур / С. В. Лапа, Л. А. Пасичник, Л. А. Данкевич // Информац. бюллетень ВПРС МОББ. – Санкт-Петербург, 2011. – № 42. – С. 120–124.
6. Смирнов В. В. Эндوفитные бактерии, использование их в защите растений от болезней / В. В. Смирнов, М. Я. Менликиев, И. Б. Сорокулова, О. Н. Рева // Міжнародна наукова конференція «Фітопатогенні бактерії.

Фітонцидологія. Алелопатія» (м. Київ, жовтень, 2005) : збірник статей. – К. : Альфа-Прайм, 2005. – С. 181–185.

7. Франк Р. И. Биологический фунгицид бактофит / Р. И. Франк, Л. А. Сазонова, С. Г. Удальева // Средства защиты растений. – 2004. – № 5. – С. 25.

8. Perez S. M. Control de la pustule bacteriana de la soya con un extracto microbiano. / S. M. Perez, T. V. Marrero, V. R. Martinez // Cienc. agr. – 1990. – № 40. – P. 31–35.

9. Rukayadi Y. Survival and epiphytic fitness of a nonpathogenic mutant of *Xantomonas campestris* pv. *Glycines* / Y. Rukayadi, A. Suvanto, B. Tjahono, R. Harling // Appl. and Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, No 3. – P. 1183–1189.

*На основе мико- и микробиологических исследований взаимоотношений между различными видами фитопатогенных бактерий – возбудителей бактериальных заболеваний ясеня обыкновенного, в т. ч. туберкулеза, приведены экспериментальные данные результатов поиска антагонистов, что дает возможность разработки теоретико-прикладных аспектов биологической защиты *Fraxinus excelsior* L. от *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Исследована антагонистическая активность между бактериями-эпифитами, изолированными из вегетативных и генеративных органов ясеня обыкновенного, коллекционными штаммами, аэробными спорообразовательными бактериями рода *Bacillus* sp. и микромицетами в системном их взаимодействии. Акцентируется внимание, что фитопатогенная бактерия *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* является основной и наиболее вредоносной компонентой патогенной микрофлоры ясеня обыкновенного.*

Ключевые слова: *туберкулез ясеня обыкновенного, патогенная микрофлора, штамм, микромицет, антагонизм, антагонистическая активность, биологические методы защиты.*

*Experimental data results antagonists, enabling the development of theoretical and applied aspects of biological protection *Fraxinus excelsior* L. of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*., including tuberculosis are devoted based on micro and microbiological studies of the relationship between different types of pathogenic bacteria - pathogens of bacterial*

diseases Fraxinus excelsior L. Studied antagonistic activity between bacteria, epiphyte, isolated from the vegetative and generative organs Fraxinus excelsior L., collection strains spore form aerobic bacteria of the genus Bacillus sp. Micromycetes in the system and their interaction. The attention that the pathogenic bacterium Pseudomonas syringae pv. savastanoi - is the main and most deleterious component pathogenic of Fraxinus excelsior L.

Key words: tuberculosis of European ash, pathogenic microflora, strain, micromycetes, antagonism, antagonistic activity, biological methods of protection.