УДК 579 : 632.35

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ ОПІКУ ЛИСТКІВ ЧЕРЕШНІ

Шевченко С.І., к.б.н., в.о. доцента

Мелітопольський державний педагогічний університет

Вивчені морфологічні та біохімічні властивості нової групи фітопатогенних бактерій, ізольованих з хворих дерев черешні з симптомами опіку листків. Проведено порівняльну характеристику їх властивостей з відомими групами патогенних бактерій. За сумою біологічних ознак виділені бактерії можна об'єднати в окрему групу фітопатогенів як вередливих бактерій, що розвиваються в меристемі.

Ключові слова: грамнегативні неспорові бактерії, біохімічні властивості, жирні кислоти, нова група фітопатогенів.

Шевченко С.И. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ ОЖОГА ЛИСТЬЕВ ЧЕРЕШНИ/ Мелитопольский государственный педагогический университет, Украина.

Изучены морфологические и биохимические свойства новой группы фитопатогенных бактерий, изолированных с больных деревьев черешни с симптомами ожога листьев. Проведена сравнительная характеристику их свойств с известными группами патогенных бактерий. По сумме биологических свойств выделенные бактерии можно объединить в отдельную группу фитопатогенов как привередливых бактерий, развивающихся в меристеме.

Ключевые слова: грамнегативные неспоровые бактерии, биохимические свойства, жирные кислоты, новая группа фитопатогенов.

Shevchenko S.I. BIOLOGICAL PROPERTIES BACTERIA OF A CHERRIES LEAF SCALD/ Melitopol State Pedagogical University, Ukraine

The morphological and biochemical properties of new bunch of phytopathogenic bacteria, are isolated from the patients of arbors of a cherry with symptoms of a leaf scald are investigated. Is carried out the relative characteristic of their properties with known group of pathogenic bacterium. On the sum of their biological properties the discharged bacteria can be united in separate group of phytopathogens as fastidious bacteria developing in meristem.

Key words: Gram negative nospore of a bacterium, biochemical properties, fatty acids, new group of phytopathogens.

1. ВСТУП

Черешня займає ведуче місце серед кісточкових у господарствах півдня України. В останні роки в насадженнях цієї культури нами відмічено розповсюдження захворювання, що істотно відрізняється від "бактеріального раку кісточкових" та "опіку плодових" [1]. За кордоном встановлено, що уражені листки сливи, мигдалю, ільми, черешні проявляють однакові опікові симптоми. У зв'язку з цим захворювання отримало назву "опік листків" [2].

Дослідами над місцевими рослинами вдалося встановити бактеріальну етіологію нового захворювання та їх продуктів життєдіяльності, що мають токсичний та мутагенний вплив на рослини [3].

Методами світлової та електронної мікроскопії встановлено місця локалізації патогенів у рослинному організмі [4, 5, 6].

Виявлено рослини-резерватори бактерій та умови розповсюдження їх в екосистемах [7].

На теперішній час відсутні дані з біохімічних властивостей бактерій та їх систематичної належності. У цій роботі представлена порівняльна характеристика морфо-біохімічних властивостей виділених бактерій та їх систематичний огляд.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Виявлення внутрішньотканинної мікрофлори хворих дерев проводили на модифікованому агаризованому середовищі ВС-ZE [8]. Поживне середовище містило в собі на 1л дистильованої води 5г дріжджового екстракту, 6 г казеїну, 2 г водорозчинного крохмалю, З г глюкози, 2 г KH_2P0_4, 0,5 г MgO_4, 0,4 г хрорнуватистокислого калію, 15 г бакто-агару, pH середовища 6,8. У дослідах використовували тільки свіже середовище, властивості бактерії вивчали за методами Бельтюкової [9].

Розмір клітин бактерій вивчали в електронному мікроскопі ЭМВ-1ООБР з використанням стандартного сефадексу G - 75 фірми “Pharmacia”, вивчення експоненціального росту бактерій у рідинному середовищі вивчали в умовах з використанням приладів КФК-2-УХП-4,2 з довжиною хвилі 670 нм [1].

Розділ метилових ефірів жирних кислот (ЖК) проводили методом газорідинної хроматографії (ГХР). Умови розділу: хроматограф “Chrom-5” з полум'яно-іонізаційним детектором, скляна колонка (1,2м × 0,3 см), нерухома фаза SE - 30 (5%) на хроматоні N-AW-DMCS (160-200 меш), діапазон температур - 130-235°С, при подачі гелію - 30 мл/хв, водню - 30- мл/хв, повітря - 300 мл/хв. Ідентифікували метилові ефіри жирних кислот за часом затримання. Стандартами були метили жирних кислот фірми “SERVA”. Кількісний склад ЖК визначали в процентах від загальної площі піків. Повторюваність – трикратна [10].

ДНК виділяли швидким методом, процент Г-Ц в ДНК визначали за точкою плавлення. Молекулярну масу оцінювали електрофорезом в 0,8%-ному агарозному гелі. Маркерами були ДНК фага λ та E. coli [11].

Робота виконана на базі лабораторій Мелітопольського держуніверситету, Київського інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами досліджень встановлено, що в опікових листках присутні два типи мікроорганізмів – грамнегативні неспорові нерухомі та грампозитивні спорові рухомі бактерії. На поживному середовищі спорові колонії покривають суцільним газоном ділянки середовища біля досліджуваної рослинної тканини, тоді як перші після 10-12 днів культивування утворюють вузький безкольоровий слизький ремінець.

Методами інокуляції на тестові рослини з багаторазовою їх повторністю встановлено, що грампозитивні бактерії не викликають появу типових опікових симптомів на листках і тому були виключені з подальших досліджень. Грамнегативні бактерії в тепличних умовах через 14-18 та в польових через 30-35 днів викликали появу типових опікових симптомів на листках [1].

З 88 штамів грамнегативних бактерії для визначення біохімічних властивостей з метою їх ідентифікації було відібрано 22 штами, які мали найбільшу вірулентність (Табл. 1). За своїми морфологічними ознаками бактерії опіку листків черешні (ОЛЧ) не можуть бути віднесені до аеробних грамнегативних бактерій - мають невеликі розміри та не мають джгутиків. Використовують багатовуглецеві сполуки як джерело вуглецю, не ростуть в умовах високих концентрацій NaCl. Ріст в анаеробних умовах не спостерігається.

За цими даними збудника опіку листків черешні треба відносити до грамнегативних аеробних паличок у частині 7 “Грамнегативні аеробні палички та коки” за визначником Бергі. У цій частині виділено 5 родин: 1. Pseudomonaceae; 2. Rhizobiaceae; 3. Azotobacteriaceae; 4. Methylomonadaceae; 5. Halobacteriaceae Зараження через кореневу систему при контакті надрізаних та здорових корінців сіянців черешні з бактеріями не викликали утворення бульбочок, характерних для сімейства Rhizobiaceae. Також за своїми морфологічними та фізіологічними властивостями не мають схожості з представниками Azotobacteriaceae, Methylomonadaceae та Halobacteriaceae [12]. Однак за своїми біохімічними ознаками бактерії (ОЛЧ) мають схожість з представниками родини Pseudomonaceae в каталазній та оксидазній активності, в утворенні індолу, використанні арабінози, глюкози, галактози, ксилози, сахарози, гліцерину, манози. Відрізнялись у здатності розріднювати желатину, використанні інозиту, маніту, лактози, сорбіту, рафінози (Табл.1).

Вони також схожі до Erwinia за каталазною, оксидазною активністю, не утворюють індол та сірководень, але збудник (ОЛЧ) не розріднює желатину. Також Erwinia не використовують гліцерин, саліцин, манозу. Відрізняються між собою в % Г-Ц в ДНК та в рухомості (Табл.1).

Дані електрофореграми показують, що молекулярна маса ДНК бактерій (ОЛЧ) може бути оцінена в межах 5×10^6 пн аналогічно фагу λ [11].

Аналіз морфологічних та біохімічних властивостей патогенних бактерій і збудника (ОЛЧ) показує, що вони за морфологічними ознаками не можуть бути віднесені до відомих фітопатогенів. За своїми морфо-фізіологічними властивостями вони більше підходять до Xylella fastidiosa, яка теж нерухома та має невеликі розміри, має аналогічні місця локалізації в тканинах хворої рослини [2].

Найбільш вагомою ознакою для ідентифікації патогенів є вміст Г-Ц пар у ДНК. За цією ознакою вони більш подібні до X. fastidiosa, які викликають аналогічні симптоми на листках дерев (Табл.1).

Бактерії (ОЛЧ) за деякими ознаками схожі з Erwinia та представниками Pseudomonaceae, але також мають розбіжності і не можуть бути віднесені до них.

Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів збудника (ОЛЧ) представлений жирними кислотами, що містять від 14 до 19 атомів вуглецю в ланцюгу. Основними жирними кислотами клітинних ліпідів патогену є октадеценова, гексадеценова, гектадеканова. На долю цих кислот припадає більше 85% від загальної кількості їх у складі ліпідів. У спектрі жирних кислот переважають ненасичені, їх сума складає 62,6%. Мінорні жирні кислоти СІ 5:0, СІ 7:0, СІ 8:0, СІ 7:1, 3-окситетрадеканова кислота (Табл.2).

Як свідчать результати досліджень X. fastidiosa за жирнокислотним складом відрізняється від виявленого нами збудника (ОЛЧ). У складі клітинних ліпідів (ОЛЧ) виявлена 3-окситетрадеканова кислота, яка є маркером ентеробактерій (Табл. 2).

Порівняльна характеристика жирнокислотного складу клітинних ліпідів збудника (ОЛЧ) та патогенів, які викликають подібний тип ураження рослин, дозволяє зробити висновок, що збудник (ОЛЧ) суттєво відрізняється за своїми ознаками як від Pseudomonas syringae pv. syringae, так і від E. amilovora. У складі клітинних ліпідів збудника (ОЛЧ) не виявлені 2-оксидеканова та 3-оксидеканова жирні кислоти, які характерні для роду Pseudomonas (Табл. 3).

Збудник ОЛЧ має 3-окситетрадеканову кислоту, як і E**.** amilovora 595, однак E. amilovora синтезує циклопропанові жирні кислоти і має високий вміст ненасичених жирних кислот. У збудника (ОЛЧ) у складі клітинних ліпідів не виявлена додеканова кислота. Серед ентеробактерій ця кислота не виявлена тільки у E. chrysantemi. Як і бактерії (ОЛЧ), представники E. Chrysantemi мають високий вміст ненасичених жирних кислот, основні жирні кислоти обох патогенів - гексадеценова, гексадеканова та октадеценова.
За жирнокислотним складом збудник (ОЛЧ) може бути віднесений до родини Enterobacteriaceae та найбільш близький до E. chrysantemi. Особливістю обох патогенів є відсутність у складі клітинних ліпідів додеканової кислоти, наявність 3-окситетрадеканової кислоти, високий вміст ненасичених кислот (Табл.3).

Таблиця 1 Порівняльна характеристика біологічних властивостей патогенних бактерій та збудника опіку листків черешні (ОЛЧ**)**.

Тести	Бактерії (ОЛЧ) (22 штами)	Xylella fastidiosa (Wells et. al., 1987)	Pseudomonas syringae (Bergey, 1984)	Xantomonas campestris (Bergey, 1984)
Форма клітин	Паличка	-“-	-“-	-“-
Рухомість	—	—	+	+
Розмір клітини (мкм)	0,3x0,8	0,25 – 0,35x 0,9 – 3,5	0,5 – 1x 1,5 – 4,0	0,4 x 1,0
Колір колонії	Сірі	Опалесцентні	Сірі / білі	Жовті
Фарб. по Граму	—	—	—	—
Аероби	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+
Оксидаза	—	—	—	—
Утв. індолу	—	—	—	—
Сірководню	—	—	—	+
Лакм. сироватка	луг.		луг.	луг.
Молоко: Згортання	+		—	+
Пептонізація	+		+	+
Розрідж. желатини	—	+	+	+
Утил. гіпурату	+	+		
% Г-Ц у ДНК	48,6	51 – 53	58 – 70	63,2 – 69,5
Використання: арабінози	К	К	К	К / —
Ксилози	К	К	К	К / —
Глюкози	К	К	К	К
Галактози	К	К	К	К
Рамнози	—		—	—
Мальтози	К	К		К
Інозиту	—		К	
Сахарози	К		К	К

Гліцерину	К		К	К
Маніту	—		К	К
Саліцину	—		—	—
Манози	К	К	К	К
Трегалози		К		К
Лактози	К		—	—
Сорбіту	—		К	
Рафінози	—		К	К
Дульциту	—		—	—
Целобіози	—	К / —	—	К
Інуліну			—	

Примітка: “+” - наявність реакції; “-“ - відсутність реакції; “К” - утворення кислоти; ”К / —” - перемінні властивості; “луг” - утворення лугів.

Таблиця 2. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів бактерій опіку листків черешні та Xylella fastidiosa (Wells et. al., 1987)

Жирні кислоти (ж. к.)	%-й склад загальної кількості (ж. к.)		Середнє значення для виділених штамів X. Fastidiosa (Wells et. al., 1987)
	ОКБ з черешні	X. Fastidiosa зі сливи (Wells et. al., 1987)	
8:0	—	2,1	0,82 ± 0,35
10:0	—	1,1	1,22 ± 0,07
20H – 10:0	—	0,8	1,36 ± 0,29
30H – 12:0	—	0,2	0,68 ± 0,38
14:0	4,5	—	—
Антиізо 15:0	—	0,5	0,74 ± 0,20
15:0	Сл.	5.2	7,96 ± 2,40
3OH – 14:0	2,5	—	—
16:1	28,0	22,5	26,74 ± 2,11
16:0	23,2	25,4	30,06 ± 2.12
Ізо – 17:0	—	4,6	3,98 ± 0,64
Антиізо 17:0	—	5,5	3,62 ± 0,72
17:1	2,6	—	—
17:0	1,6	18,2	11,62 ± 2,23
18:2	—	5,2	3,68 ± 0,84
18:1	34,3	2,0	1,70 ± 0,51
18:0	1,3	—	—
19:0	1,7	—	—
Не визначені	0,3	0,7	0,75 ± 0,13

Примітка: “сл.” - сліди кислоти; “+” наявність реакції; “-” - кислота не виявлена.

Таблиця 3. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів бактерій черешні, Erwinia amylovora, E. chrysantemi, Escherichia coli.

Жирні кислоти*	Черешні штам №10	E. amylovora №595	E. chrysantemi CPPB 402	E. coli ATCC 11775
12:0	—	2,6 ± 0,1	—	3,7 ± 0,2

13:0	—	—	—	Сл.
14:0	4,5	8,8 ± 0,1	4.4 ± 0.3	7,4 ± 0,3
15:0	Сл.	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Неіден.	0,3	—	—	—
3-OH14:0	2,5	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2
16:1	28,0	11.3 ± 0,7	36,0 ± 2,3	19,0 ± 0.2
16:0	23,2	32,0 ± 0,1	36,1 ± 1,9	30,0 ± 0,3
17:1	2,6	—	0,8 ± 0,1	—
17:0 цп	—	18,3 ± 0,1	—	9,0 ± 0,3
17:0	1,6	—	1,0 ± 0,2	—
18:1	34,3	18,8 ± 0,1	16,9 ± 2,1	26,0 ± 0,2
18:0	1,3	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1
19:0 цп	—	4,3 ± 0,1	—	1,1 ± 0,2
19:0	1,7	—	—	—

Примітка: “CPPB” - Національна Колекція Фітопатогенних Бактерій Англії; “ATCC” - Американська колекція типових культур; “цп” - циклопропанові жирні кислоти; “*” - перше число біля атома вуглецю - кількість атомів у ланцюгу, друге - кількість ненасичених зв'язків, “3-OH14:0” - 3-окситетрадеканова кислота; “неіден.” – неідентифікована кислота.

Таким чином, за сумою біологічних ознак збудник опіку листків черешні (ОЛЧ) відрізняється від відомих патогенних бактерій і його можна віднести до окремої групи фітопатогенів.

4. ВИСНОВКИ

На півдні України з хворих дерев черешні з симптомами опіку листків виділено бактерії, які за своїми морфологічними та фізіологічними ознаками відрізняються від відомих фітопатогенів. Для встановлення остаточного систематичного положення виділених бактерій результати досліджень можна вважати попередніми, але за сумою біологічних ознак їх можна об’єднати в окрему групу вередливих бактерій, що розвиваються в меристемі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гвоздяк Р. И., Шевченко С. И., Садовский Ю. П. Изучение возбудителя ожога листьев черешни //Микробиол журн. – 1990, - 52, №2. – С. 70 – 77.
2. Wells J. M., Raju B. C., Hung H. Y., et al. Xylella fastidiosa gen. nov. sp. nov.: Gram negative, xylem – Limited, fastidions plant Bacteria Related to Xanthomonas spp. //Int. J. Syst. Bacterid. – 1987. – 37. P. – 136 – 143.
3. Шевченко С. И., Садовский Ю. П., Панченко Л. П. Токсическое и мутагенное действие продуктов жизнедеятельности риккетсиеподобных бактерий. Цитология и генетика //Цитология и генетика. – 1988. – 22, №4. – С. 17 – 22.
4. Садовский Ю. П., Шевченко С. И. Электронно-микроскопическое изучение меристематических тканей плодовых деревьев, пораженных риккетсиеподобными бактериями //Цитология и генетика. – 1988. – 22, №6. – С. 3-8.
5. Садовский Ю. П., Шевченко С. И. Взаимодействие риккетсиеподобных бактерий с клетками корневой меросистемы в начальной фазе инфекционного процесса //Цитология и генетика. – 1990. – 24, №2. – С. 3 – 5.
6. Садовский Ю. П., Шевченко С. И. Электронно-микроскопическое изучение включений в тканях растений, инфицированных риккетсиеподобными бактериями //Цитология и генетика. – 1991. – 25, №3. – С. 3 – 7.
7. Садовский Ю. П., Шевченко С. И. Растения – резерваторы риккетсиеподобных бактерий //Защита растений. – 1989. - №7. – С. 18 – 20.
8. Raju B. C., Wells J. M., Nyland G. Plum Leaf scald: isolation culture? And pathogenicity of the causal agent //ibid. – 1982. – 71, №11. – P. 1460 – 1466.
9. Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – К.: Наукова думка, 1968. – 316 с.
10. Жеребило О. Е., Вишталюк Н. М. Жирные кислоты общих липидов некоторых представителей рода Erwinia и других энтеробактерий //Микробиол. журн. – 1991. - №6. – С. 83 – 85.

11. Davis M. J., Raju B. C., Bransky R. H., et al, Periwinkle wilt Bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram – negative, xylem – inhabiting Bacteria //Ibid. – 1983. – 73, №11. – P. 1510 – 1515.

12. Bergey's manul of systematic bacteriology. – 9 th. ed. – Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1984. – Vol. 1. – 1987 – 36. – P. 45 – 52.