

ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НЕКОТОРЫХ СОРТОВ СЕМЕННОГО КАРТОФЕЛЯ

PRIMARY SCREENING OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA OF SOME SEED POTATO VARIETIES

**O. Soprunova
O. Chernukhina**

Summary. The article presents the results of research on the identification of phytopathogenic bacteria in seed potatoes of the Impala and Gala varieties grown in the Limansky district of the Astrakhan region. The research was carried out in the laboratory of the Department of Applied Biology and Microbiology of the Astrakhan State Technical University. During the work, standard methods for identifying and identifying bacterial isolates were used. As a result of this work, 9 strains of bacterial isolates, presumably belonging to the genera: *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, were isolated from seed potato tubers of the Impala and Gala varieties. Thus, studying the biodiversity of phytopathogenic microorganisms, isolating bacterial cultures, and analyzing their characteristics are key methods for developing measures and strategies to control crop diseases.

Keywords: Potato, variety, bacterial isolates, phytopathogenic, macerate plant tissue, rot, spotting.

Введение

Картофель является одной из самых востребованных и обширно употребляемых в мире культур. Его клубни могут быть применены как в качестве исходных продуктов для производства питания, так и в качестве технических или кормовых веществ.

Мировое производство картофеля продолжает расти и составляет около 360 млн тон в год, это свидетельствует о значимости этой культуры для обеспечения продовольственной безопасности и питания населения по всему миру. Согласно отчету Комиссии по сельскохозяйственным вопросам и продовольствию ООН (ФАО), годовые финансовые потери от болезней, затрагивающих урожай картофеля, составляют 3,4 миллиарда долларов, что равно 11,6 % от общего объема производства. Выращивание клубней картофеля представляет собой не легкое занятие, включающее в себя постоянную необходимость защиты от вредоносных организмов и болезней на всех этапах роста культуры, поскольку картофель очень подвержен поражениям от болезней. В России обнаружены практически все возможные заболевания

Аннотация. В статье представлены результаты исследований по выявлению фитопатогенных бактерий семенного картофеля сортов Импала и Гала, выращенный в Лиманском районе Астраханской области. Исследования были проведены в лаборатории кафедры «Прикладная биология и микробиология» Астраханского государственного технического университета. В ходе работы применялись стандартные методики по выявлению и идентификации бактериальных изолятов. В результате данной работы из клубней семенного картофеля сортов Импала и Гала выделено 9 штаммов бактериальных изолятов, предположительно относящихся к родам: *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*. Таким образом, изучение биоразнообразия фитопатогенных микроорганизмов, изоляция бактериальных культур и анализ их характеристик являются ключевыми методами для разработки мер и стратегий по борьбе с заболеваниями сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: картофель, сорт, бактериальные изоляты, фитопатогенны, мацерировать растительную ткань, гниль, пятнистость.

картофеля, но особенно опасными являются грибковые и бактериальные инфекции, например: фитофтороз, различные формы парши, фузариозная и фомозная гниль и многие другие [3].

Бактериозы, вызываемые фитопатогенными бактериями, представляют собой распространенные инфекционные заболевания картофеля, которые встречаются практически повсюду, где выращивается этот вид культуры. Эти болезни приводят к высокой гибели растений на поле, гниению клубней как при посадке, так и в период созревания нового урожая, а также к порче клубней при хранении. Бактериальные болезни также ослабляют пораженные растения и могут вызвать у них нарушения в функционировании. В результате потери урожая могут достигать более 50 %, особенно в те годы, когда бактериальные заболевания распространены широко.

Внедрение механизированной уборки способствовало распространению бактериозов в последние годы из-за увеличения механических повреждений клубней. Бактериозы представляют чрезвычайную опасность из-за низкой устойчивости к ним большинства культивируемых сортов картофеля.

Сопрунова Ольга Борисовна

Доктор биологических наук, профессор,
Астраханский государственный
технический университет
soprunova@mail.ru

Чернухина Олеся Сергеевна

аспирант, Астраханский государственный
технический университет
olesya.melnikova.92@bk.ru

Самыми опасными являются следующие заболевания картофеля: бурая бактериальная гниль (вызывается *Ralstonia solanacearum*), кольцевая гниль (вызывается *Clavibacter michiganensis (Corynebacterium sepedonicum)*), мокрая гниль (вызывается бактериями родов *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Bacillus* и *Pseudomonas*), черная ножка (вызывается бактериями рода *Dickeya*), парша обыкновенная (вызывается *Streptomyces scabiei (Actinomyces scabies Güssow)*). Бактериальные инфекции могут поражать растение все растение или его отдельные части, органы. Развитие бактериозов зависит от сочетания внешних условий. При благоприятных условиях (температура воздуха 25–28°C, повышенная влажность воздуха и почвы) бактерии быстро размножаются и становятся более инфекционными.

Внешние проявления бактериальных заболеваний картофеля включают гниль, пятнистость и увядание. Основными источниками инфекции являются больные клубни и части пораженных растений в почве. Фитопатогенные бактерии передаются через зараженный посадочный материал, грунтовые воды, капли дождя и росы, воздух, насекомых и даже человека [2].

Производство картофеля в Астраханской области является одной из ключевых отраслей сельского хозяйства. Увеличение количества высококачественного картофеля требует внедрения комплекса мер по защите растений от болезней, вредителей и сорняков. Оценка качества картофеля должна начинаться с анализа семенного материала, поскольку фитопатогены развиваются внутри растений и могут находиться в спящем состоянии. Посадка зараженных семян становится причиной заражения клубней данного растения.

Целью исследования являлось выделение бактерий из семенного картофеля и первичный скрининг наличия у выделенных изолятов фитопатогенных свойств.

Материал и методы исследований

Для изоляции чистых культур бактерий в ходе исследований использовались семенной материал картофеля сортов Импала и Гала, выращенный в Лиманском районе Астраханской области.

Картофель Гала крайне неприхотливый, раннеспелый сорт, хорошо приспособляется к любым условиям, для него важен лишь обильный полив. Нет жестких сроков посадки, а сбор урожая можно начать уже на 70–80 день. Клубни — круглоовальные, с желтоватой кожицей; мякоть — бледно-желтая с хорошим вкусом, почти не разваривается и не темнеет. Содержание крахмала около 13 %, достаточно низкий показатель, поэтому картофель подходит для здорового питания. Растет картофель этого сорта быстро, хранится долго.

Импала — сорт картофеля раннего срока созревания. Клубни крупные, овальной и удлинненно-овальной формы, выровненные, со светло-желтой мякотью; кожура гладкая, желтого окраса. Сорт столового назначения, с хорошими вкусовыми свойствами. Мякоть после варки не темнеет. Содержание крахмала — 10,5–14,6 %, сухого вещества — 17,7 %.

В ходе исследований использовали клубни картофеля с наиболее характерными признаками поражения фитопатогенами (наличие пятнистости, сухой и влажной гнили). Клубни мелко нарезали и смешали с водой затем полученные суспензии засеивали с помощью шпателя на питательные среды для выделения и культивирования большинства фитопатогенных бактерий: Кинг В, TZCA, YDC. Также использовали селективную среду YMA для получения и культивирования фитопатогенных бактерий рода *Agrobacterium*. Инкубационный период составил 7 суток. Для получения чистых культур бактерий из выросших на чашках Петри изолированных колоний, осуществляли пересев на соответствующие питательные среды. Чистоту полученных изолятов оценивали визуально и микроскопией фиксированных окрашенных препаратов [4].

Далее осуществляли проверку патогенности бактериальных изолятов в отношении картофеля, моркови и свеклы (проявление признаков заболевания, гниения, мацерация тканей), что способствует установить наличие фитопатогенности бактериальных изолятов, по способности расщеплять крахмал, клетчатку и каротин. [4]. Корнеплоды картофеля, свеклы и моркови промыли в проточной и стерильной воде и высушивали. С использованием скальпеля нарезали диски корнеплодов, после чего они были стерилизованы в 96% этаноле и обожжены в пламени спиртовки. Затем диски были помещены в чашки петри на влажные фильтры. Каждый диск был посеян суточными культурами исследуемых бактериальных изолятов. Чашки петри с дисками были убраны в термостат для культивирования при оптимальной температуре 30 °C в течение трех дней. Определение наличия или отсутствия мацерации проводилось визуально по колониям на дисках, изменению их структуры, окраске и другим признакам [5].

Установив, что бактериальные изоляты патогенны, определяли их морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства, необходимые для предварительной идентификации.

Морфологические признаки бактерий (форму клеток, наличие/отсутствие спор и т. п.), выросших на питательных средах, изучали на фиксированных и окрашенных препаратах с использованием светового микроскопа Микромед P-1-LED. Для анализа физиолого-биохимических свойств изолятов применяли суточную культуру

бактерий и стандартные методы идентификации, такие как окраска по методу Грама, определение грампринадлежности с использованием раствора гидроксида калия, проверка подвижности и определение наличия каталазы.

Определение подвижности [5]. Исследование подвижности бактерий проводили на «голодном» агаре. Среду разлили в пробирки (3–5 мл). Посев бактериальных изолятов проводили методом укола микробиологической петлей в питательную среду в пробирки. Пробирки инкубировали при 37 °С в термостате в течение 3-х суток. Неравномерное изменение цвета среды (помутнение) в пробирках свидетельствует о подвижности бактериальных изолятов, а рост бактерий у линии укола свидетельствует об их неподвижности.

Определение каталазы [5]. На предметное стекло наносили биомассу исследуемой культуры бактерий и 3% раствор перекиси водорода. При положительной реакции хорошо заметно выделение кислорода, по образованию пузырьков газа, что свидетельствует о продукции каталазы исследуемым штаммом.

Определение грампринадлежности бактерий [5]. Каплю 3 % раствора гидроксида калия наносили на предметное стекло и туда же добавили исследуемую бак-

териальную культуру и перемешали. При поднятии бактериальной петли с данной взвеси происходит ее поднятие за петель, то данный бактериальный изолят принадлежит к грамотрицательным, если нет — к грамположительным.

Предварительную идентификацию выделенных изолятов бактерий, проводили по сопоставлению полученных результатов по исследованию культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, используя «Определитель бактерий Берджи» [6].

Каждый эксперимент ставили минимум в трехкратной повторности и данные обрабатывали статистически.

Результаты исследований и их обсуждение.

По результатам исследований выделено 9 штаммов бактериальных изолятов, 5 изолятов выделено из клубней картофеля сорта Импала, 4 изолята — сорта Гала. Результаты исследования представлены в таблице 1.

На питательной среде YMA выделены 2 бактериальных штамма. Первый штамм по морфологическим свойствам имеет следующие признаки: колонии светло-оранжевого цвета неправильной формы d= 0,7 см; по культуральным свойствам: Gr+ палочки со спорами,

Таблица 1.

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства выделенных бактериальных изолятов

Питательные среды	Свойства изолятов бактерий						Предварительная идентификация / выявление бактерий на картофеле
	культуральные	морфологические	физиолого-биохимические				
			подвижность	каталазная активность	окраска по методу Грама	мацерующая активность	
YMA	Колонии бежевого цвета, круглые слизистые d= 0.1 см	Gr– палочки расположены одиночно, длина 1,42 мкм, ширина 1,2 мкм	+	+	–	+	p. <i>Agrobacterium</i> / сорта Гала и Импала
	Колонии светло-оранжевого цвета неправильной формы d= 0.7 см	Gr+ палочки со спорами, длина 2,84 мкм, ширина 1,42 мкм.	+	+	+	+	p. <i>Bacillus</i> / сорта Гала и Импала
Кинг В	Колонии желтого цвета выпуклые d= 0.2 см	Gr– палочки, длинна 1,42 мкм, ширина 1,1 мкм	+	+	–	+	p. <i>Erwinia</i> / сорт Гала
	Колонии кремового цвета неправильной формы d= 0.5 см	Gr+ палочки, короткие изогнутые длина 1,42 мкм	–	+	+	+	p. <i>Clavibacter</i> / сорт Импала
YDC	Колонии белого цвета круглые d= 0.1 см	Gr– палочки одиночные, длина 2,84 мкм, ширина 1,42 мкм.	+	+	–	+	p. <i>Pseudomonas</i> / сорт Импала
TZCA	Колонии бежевого цвета неправильной формы d= 0.4 см	Gr+ палочки со спорами, длина 2,84 мкм, ширина 1,42 мкм.	+	+	+	+	p. <i>Bacillus</i> / сорта Гала и Импала

Примечание: «+» положительная реакция у микроорганизмов, «–» отрицательная реакция у микроорганизмов

длина 2,84 мкм, ширина 1,42 мкм; по физиолого-биохимическим свойствам: Gr+, подвижные и каталазоположительные бактерии, фитопатогены (способны мацерировать растительную ткань картофеля).

Второй штамм по морфологическим свойствам — колонии бежевого цвета, круглые слизистые $d=0,1$ см; по культуральным свойствам: Gr– палочки расположены одиночно, длина 1,42 мкм, ширина 1,2 мкм; по физиолого-биохимическим свойствам: Gr–, подвижные и каталазоположительные бактерии, фитопатогены (способны мацерировать растительную ткань картофеля).

По совокупности культуральных, морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенные изоляты можно предположительно отнести по определителю бактерий Берджи (1997): 1-й изолят — группа 18, тип *Firmicutes*, род *Bacillus*, 2-й изолят — 4 группа, тип *Gracilicutes*, род *Agrobacterium*.

Род *Bacillus* представлен грамположительными палочковидными бактериями, способными образовывать внутриклеточные споры. Эти микроорганизмы являются либо аэробами, либо факультативными анаэробами. Большинство видов *Bacillus* являются хемоорганогетеротрофами и могут развиваться на простых питательных средах. Они обычно подвижны и имеют жгутики, расположенные вокруг клетки. На твердых средах они формируют колонии с шероховатой структурой и неровными краями, обозначаемые как R-колонии. Оптимальная температура для их роста составляет от 30 до 37°C [7]. Отмечен рост колоний на питательной среде YMA у сортов картофеля Импала и Гала.

Род *Agrobacterium* представлен группой грамотрицательных аэробных палочек. Эти бактерии обычно располагаются поодиночке или парами и имеют размеры от 0,6 до 1,0 микрон в ширину и от 1,5 до 3,0 микрон в длину. *Agrobacterium* не образуют споры, но могут передвигаться благодаря перитрихальным жгутикам. Они каталазоположительные и, как правило, оксидазо- и уреазоположительные. На агаризованных питательных средах *Agrobacterium* образуют выпуклые, круглые, гладкие колонии непигментированного или слабо-бежевого цвета. Многие виды *Agrobacterium* являются фитопатогенными и вызывают бактериальные заболевания различных двудольных и голосеменных растений. Они проникают через поврежденные покровные ткани верхушек, корней и стеблей, приводя к превращению клеток растений в опухоли. Болезни, вызываемые этими штаммами, известны как бактериальный корончатый галл, корень волосистой, рак стеблей бактериальный. [7]. Отмечен рост колоний на питательной среде YMA у сортов картофеля Импала и Гала.

На питательной среде Кинг В выделены 2 бактериальных штамма. Первый штамм по морфологическим

свойствам имеет следующие признаки: колонии желтого цвета выпуклые $d=0,2$ см; Gr– палочки, длина 1,42 мкм, ширина 1,1 мкм; по физиолого-биохимическим свойствам — Gr–, подвижные и каталазоположительные бактерии, фитопатогены (способны мацерировать растительную ткань картофеля). Второй бактериальный штамм по морфологическим свойствам — колонии кремового цвета неправильной формы $d=0,5$ см; по культуральным свойствам — Gr+ палочки, короткие изогнутые длина 1,42 мкм; по физиолого-биохимическим свойствам: Gr+, не подвижные и каталазоположительные бактерии, фитопатогены (способны мацерировать растительную ткань картофеля).

Выделенные на среде Кинг В изоляты бактерий по совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, согласно Определителю бактерий Берджи (1997), можно отнести: 1-й изолят — неспорообразующие грамположительные палочки неправильной формы (группа 20), тип *Firmicutes*, предположительно род *Clavibacter*; 2-й изолят — грамотрицательные палочки — 4 группа, тип *Gracilicutes*, предположительно род *Erwinia*.

Род *Clavibacter* относится к коринеформным бактериям и представляет собой группу грамположительных неспорообразующих палочковидных бактерий необычной формы. Представители этого рода представлены прямыми или слегка изогнутыми тонкими палочками неопределенной формы, часто имеющими клиновидную или булавовидную форму. Они обычно располагаются индивидуально или парами в форме буквы V. Иногда в старых культурах можно обнаружить кокковидные клетки, хотя цикл палочек и коков не характерен для бактерий рода *Clavibacter*. Виды этого рода каталазоположительные, не образуют индол, не восстанавливают нитраты. Оптимальная температура для их роста составляет от 20 до 29 градусов Цельсия, и они редко развиваются при температурах выше 35 градусов Цельсия. Их рост медленный, и для успешного развития им требуются питательные среды. Некоторые штаммы способны синтезировать голубой и желтый пигменты. Род *Clavibacter* объединяет различные виды бактерий, которые являются облигатными паразитами и вызывают бактериозы у различных цветущих растений. В основном бактерии рода *Clavibacter* являются хемоорганотрофами, но встречаются также хемолитоавтотрофы. Их метаболизм является строго дыхательным, оксидазная реакция у них положительная. Некоторые виды этого рода способны к денитрификации. [7]. Отмечен рост на среде Кинг В только у сорта картофеля Импала.

Род *Erwinia* относится к семейству *Enterobacteriaceae* и включает в себя паразитические, сапрофитные и эпифитные виды бактерий, которые обитают на растениях. В этом роде насчитывается 17 видов. Бактерии рода

Erwinia представляют собой грамотрицательные палочки, которые могут быть обнаружены в одиночном виде, парами или в коротких цепочках. Они обладают подвижностью благодаря перитрихальным жгутикам, за исключением *Erwinia stewartii*. Оптимальная температура для роста бактерий рода *Erwinia* составляет от 27°C до 30°C. Эти фитопатогенные бактерии могут вызывать различные заболевания растений, такие как некрозы, ожоги, увядание, а также формирование «мокрых» или «мягких» гнилей. Последние заболевания связаны с поражением паренхимы, сосудов или гиперплазией растений. [7]. Выявлен рост на питательной среде Кинг В только у сорта картофеля Гала.

На питательной среде YDC выделен один штамм, по морфологическим свойствам имеет следующие признаки: колонии белого цвета круглые $d = 0,1$ см; по культуральным свойствам — Гр– палочки одиночные, длина 2,84 мкм, ширина 1,42 мкм; по физиолого-биохимическим свойствам — Гр–, подвижные и каталазоположительные бактерии, фитопатогены (способны мацерировать растительную ткань картофеля).

По совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенный изолят на среде YDC можно отнести к 4 группе, тип *Gracilicutes*, предположительно, род *Pseudomonas*.

Представители рода *Pseudomonas* представляют собой грамотрицательные подвижные бактерии. Размеры их клеток составляют 0,5–1х1,5–4 мкм. Они могут иметь полярное, амфитрихальное или лофотрихальное жгутование. Бактерии рода *Pseudomonas* являются как сапрофитами, так и патогенами. Фитопатогенные виды этого рода вызывают гнили, раки, ожоги и другие заболевания сельскохозяйственных культур. Оптимальная температура для их роста составляет 30–37 °C. [7]. На питательной среде YDC отмечено наличие круглых колоний белого цвета только для клубней картофеля сорта Импала.

На питательной среде TZCA выделен один бактериальный штамм, по морфологическим свойствам имеет следующие признаки: колонии бежевого цвета неправильной формы $d = 0,4$ см; по культуральным свойствам — Гр+ палочки со спорами, длина 2,84 мкм, ширина 1,42 мкм; по физиолого-биохимическим свойствам — Гр+, подвижные и каталазоположительные бактерии, фитопатогены (способны мацерировать растительную ткань картофеля).

На питательной среде TZCA выделенный изолят бактерий по совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойствам, согласно Определителю бактерий Берджи (1997), можно отнести к грамположительным спорообразующим палочкам (группа 18; предположительно относящиеся к р. *Bacillus*). Отмечен рост колоний на среде TZCA бежевого цвета неправильной формы у сортов картофеля Гала и Импала.

Таким образом, выделенные бактериальные колонии, относящиеся к роду *Bacillus*, изолированные на средах TZCA и YMA, отмечены у сортов картофеля Импала и Гала. При сравнении культуральных свойств бактериальных колоний отмечается сходство — колонии имеют неправильную форму, бежевый цвет [7]. Отличие на среде YMA — колонии имели слизистую консистенцию.

Первичный скрининг наличия фитопатогенных свойств проводили по способности выделенных изолятов мацерировать растительную ткань корнеплодов (свекла, морковь, картофель) [5]. На 3-и сутки инкубации визуально на дисках выявлен рост бактериальных культур (наличие слизи на корнеплодах), растительная ткань стала более размягченной, что предполагает разрушение ткани корнеплодов. Это позволяет предположить способность изолятов выделять внеклеточные деструктивные ферменты (пектолитические, целлюлолитические, протеолитические и др.), играющие важную роль в качестве фактора вирулентности [1], что позволяет предположить у выделенных бактериальных изолятов наличие фитопатогенных свойств.

Заключение

В результате данной работы из клубней семенного картофеля сортов Импала и Гала выделено 9 штаммов бактериальных изолятов. Из клубней картофеля сорта Импала выделены 5 штаммов, предположительно идентифицированы как представители родов *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*. Из клубней картофеля сорта Гала выделены 4 штамма, предварительно идентифицированные как представители родов *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Erwinia*. Данные штаммы бактерий на основании результатов по способности мацерации тканей корнеплодов (моркови, свеклы, картофеля) можно отнести к фитопатогенам. В связи с этим, данные изоляты бактерий можно применять как объекты для исследований по разработке мер и стратегий по борьбе с заболеваниями сельскохозяйственных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабозорги С., Евтушенко А.Н. Мацерация тканей картофеля и корнеплодов моркови мутантами бактерий *Erwinia atroseptica* — // Вестник БГУ, 2008. — №2. — 62 с.
2. Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Б., Мешков Ю.И., Джалилов Ф.С., Чижов В.Н., Игнатов А.Н., Полищук В.П., Шевченко Т.П., Борисов Б.А., Стройков Ю.М., Белошапкина О.О. Болезни и вредители овощных культур и картофеля. М: Товарищество научных изданий КМК, 2013. — 463 с.
3. Главный сайт для агрономов России ООО «ГлавАграрРус» Текст: электронный // ТОП грибных и бактериальных болезней картофеля: официальный сайт. — 2024. — URL: <https://glavagronom.ru/articles/ТОП-грибных-и-бактериальных-болезней-картофеля> (дата обращения: 18.04.2024).
4. Жевора С.В. Передовые методы диагностики патогенов картофеля: науч. анализ. обзор. М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019. — 96 с.
5. Желдакова Р.А. Фитопатогенные микроорганизмы: Учебно-метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. Г — 31 01 01 «Биология». — Минск: БГУ, 2006. — 89 с.
6. Определитель бактерий Берджи [Текст]. В 2-х т. — Т. 2 / под ред. акад. РАН Г. А. Заварзина. — М.: Мир, 1997.
7. Сельскохозяйственный онлайн справочник «Пестициды.ru». — Текст: электронный // интернет-магазин: официальный сайт. — 2024. — URL: https://www.pesticide.ru/infopages/conditions_use#item_content_h4_2 (дата обращения: 25.03.2024).

© Сопрунова Ольга Борисовна (soprunova@mail.ru); Чернухина Олеся Сергеевна (olesya.melnikova.92@bk.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»