

# ЛІСОЗНАВСТВО ТА ЛІСІВНИЦТВО

УДК 630\*232.315.1:630\*443:582.475.4

**А. Ф. ГОЙЧУК<sup>1</sup>, Р. І. ГВОЗДЯК<sup>2</sup>, В. В. РОЗЕНФЕЛЬД<sup>3</sup>**

## **МІКРОБІОТА НАСІННЯ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ ТА НАПРЯМКИ СТИМУЛЯЦІЇ ЇЇ САПРОТРОФНОГО СКЛАДНИКА**

*Наведено результати досліджень аутомікрофлори здорового насіння сосни звичайної. Мікробна асоціація представлена дійсними фітопатогенними (*Pseudomonas syringae*, *Ervinia carotovora*, *Enterobacter nimipressuralis*), умовними фітопатогенними (*Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Panthoea agglomerans*) і сапротрофними (*Bacillus subtilis*, *B. pumilus*) бактеріями, а також грибами з родів *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Torula*. Між компонентами мікробіоти насіння не виявлені чітко виражені антагоністичні взаємовідносини як у межах виду, так і між видами та функціональними групами аутомікрофлори. Це потрібно враховувати під час заготівлі, зберігання та підготування насіння до посіву.*

**Ключові слова:** насіння, властивості насіння, мікрофлора, бактерії, гриби.

---

<sup>1</sup> **Анатолій Федорович ГОЙЧУК** – дійсний член ЛАН України, доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри біології лісу та мисливствознавства, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ. Україна. Тел.: 044-527-82-38. E-mail: Ogouchuk@rambler.ru

<sup>2</sup> **Ростислав Ілліч ГВОЗДЯК** – доктор біологічних наук, професор, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ. Україна. Тел.: 044-526-55-78

<sup>3</sup> **Вікторія Володимирівна РОЗЕНФЕЛЬД** – кандидат біологічних наук, головний спеціаліст Департаменту аграрної освіти, науки та дорадництва, Міністерство аграрної політики України, м. Київ. Україна. Тел.: 044-279-32-14

Взаємодія мікроорганізмів у рослинних асоціаціях становить підвищений науковий і практичний інтерес як у плані розуміння загальнобіологічних проблем імунітету, етиології і динаміки патологічного процесу тощо, так і з погляду обґрунтування й опрацювання прийомів і методів захисту рослин від збудників хвороб. Це дуже важливо, оскільки на всіх етапах онтогенезу рослин мікроорганізми різних таксономічних груп як у складі епіфітної та ендofітної мікрофлори, так і мікрофлори ризосфери формують не лише характерний компонент філосфери, а й надають можливість впливати на неї біологічними методами [6].

Кожна насінина характеризується певними біологічними властивостями і вони навіть для насіння, що росте на одному дереві або в одній шишці, мають певні морфолого-анатомічні і фізіолого-біохімічні відмінності. Це пов'язано з багатьма абіотичними і біотичними чинниками, одним з яких є кількість і видовий склад мікроорганізмів (бактерій і грибів), що заселяють насіння незалежно від його походження і посівних якостей, і є невід'ємною компонентою здорових органів рослини. Сапротрофна і патогенна мікрофлора різного ступеня агресивності і вірулентності, яка знаходиться всередині або на поверхні насіння, представлена різними як у систематичному аспекті, так і за функціональними властивостями мікроорганізмами, що беруть безпосередню участь у метаболічних процесах рослин. Експерименти з рослинами агрокультуроценозу свідчать про важливість цієї мікрофлори для рослини. Епіфітні і ендofітні мікроорганізми, що знаходяться на поверхні або в середині органів рослини і не викликають в них явних ознак інфекційного процесу, формують динамічну рівновагу в системі "сапротроф – патоген", стимулюють ріст рослин, здійснюючи біоконтролюючу функцію через прямий антагонізм до патогенів або індуючи систему резистентності до хвороботворного організму, обмежуючи таким чином активність останнього. Деякі бактеріальні ендofіти захищають рослини навіть від нематод і шкідливих комах, підвищують їх стійкість до абіотичних і інших чинників [2, 5]. Захисна роль фітопатогенних бактерій – епіфітів і ендofітів – виявляється навіть щодо рослини-господаря, адже слабоагресивний або авірулентний штам підвищує його стійкість до високоагресивного штаму (клону) на тлі зниження агресивності популяції [3].

Механізм такого захисту багатогранний, складний і відбувається не тільки внаслідок антагоністичних властивостей епіфітів і ендofітів до патогенів, а також через конкуренцію між ними за поживні речовини. Зазвичай патогенні мікроорганізми знаходяться в рослинах, у т.ч. і в насінні, в пригніченому стані. В тканинах здорових органів рослин їх на декілька порядків менше, ніж сапротрофів, причому їх кількість завжди менша від порогової концентрації, потрібної для початку інфекційного процесу. І це не пов'язано з нестачею поживних речовин, а, очевидно, обумовлено іншими чинниками, можливо речовинами сигнального типу, які регулюють (обмежують) розмноження бактерій. Але для бактерій взагалі і фітопатогенних зокрема важлива не стільки їх кількість, скільки наявність загалом, адже у сприятливих умовах фітопатогенні мікроорганізми можуть дуже швидко заповнити екологічну нішу до порогової і спричинити цим самим навіть епіфітотії.

У процесі дослідження цих процесів ми зі здорового насіння (схожість 85-98 %, енергія проростання 83-98 %, чистота 94-100 %, клас якості I – II) ізолювали дійсні фітопатогенні (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *Enterobacter nimipressuralis*), умовні фітопатогенні (*Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pantoea agglomerans*) і сапротрофні (*Bacillus subtilis*, *B. pumilus*) бактерії, а також гриби родів *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Torula*.

Як показують результати досліджень, серед функціональних груп мікроорганізмів на поверхні здорового насіння переважають амоніфікатори (залежно від партії кількість колонієтворних одиниць (КУО) амоніфікаторів варіює в межах 412-462 тисяч в 1 г насіння. Всередині насіння кількість КУО амоніфікаторів значно менша і варіює в межах від 39,8 до 105,6 тис./г. Загальне співвідношення спороносних бактерій – епіфітів до ендofітів залежить від партії насіння і становить від 17,9 до 56,3. Загалом амоніфікаторів-епіфітів у 3,2-4,7, а ендofітів – у 1,2-2,3 рази більше, ніж загалом усіх інших мікроорганізмів аутомікрофлори здорового насіння, яке ми вивчали. При цьому гриби в загальній кількості мікроорганізмів становлять 0,03 % – серед епіфітів і 1,0-1,3 % – серед ендofітів.

Ізольовані зі здорового насіння сосни звичайної штамми *Ps. syringae* спричиняли в експерименті на листках тютюну чітку реакцію надчутливості, що є ознакою їх патогенності [7]. У штамів *E. carotovora*, *E. nimipressuralis* ця реакція була слабкішою. Бактерії родів *Bacillus*, *Pantoea* та виду *Ps. fluorescens* не зумовлювали утворення некрозів чи хлоротичних зон у місцях введення їх під епідерміс листка тютюну. Ми [4] виявили, що виділені зі здорового насіння сосни звичайної бактерії спричиняють захворювання хвої двохрічних сіянців внаслідок штучного зараження. Якщо інфікувати верхівку хвої, зрізану на 1-2 мм, інфекційний процес відбувається значно повільніше, ніж у разі зараження середини хвої. Серед виділених з насіння сосни штамів найагресивнішими були представники виду *Ps. syringae*. За штучного зараження ними хвої некротична зона сягала 19 мм або хвоїнка повністю засихала. Штами видів *E. carotovora*, *E. nimipressuralis*, *Ps. fluorescens* уражували хвою дуже слабо. Симптоми захворювання, у разі штучного зараження, однотипні. Перші ознаки інфекційного процесу спостерігаються через 5-7 днів у вигляді обводненої тканини, яка набуває згодом світло-коричневого забарвлення. Незначне поширення некрозу до основи хвої супроводжується потемнінням, особливо на межі зі здоровою тканиною. Верхня частина ураженої тканини світліша і нечітко відрізняється за кольором від здорової.

У зв'язку з цим варто звернути увагу на те, що наявність як нормальної мікрофлори патогенних мікроорганізмів у здорових органах рослин, зокрема в насінні, змінює розуміння такого поняття як патоген. У численних літературних джерелах (як паперових, так і електронних) термін "патоген" (*pathos* – хвороба, страждання, *geneo* – народжувати) переважно трактують як організм (мікроорганізм), що спричиняє хворобу у рослини або як збудник хвороби рослини. До того ж, такі поняття як збудник хвороби, паразит, інфекція, інфекційний агент, фітопатоген тощо

ототожнюються з терміном "патоген" і розглядаються як його синоніми. На наш погляд, під патогеном слід розуміти мікроорганізм, біологічною особливістю якого є спроможність спричиняти інфекційне захворювання (патологічний процес). Якщо такий мікроорганізм спроможний спричинити захворювання лише у рослин, його слід називати фітопатогеном (звичайно, в цьому випадку поняття "фітопатоген" є вужчим у плані можливостей уражувати різні організми як рослинного, так і тваринного походження). Якщо патоген (фітопатоген) спричинив захворювання, то він має називатися збудником хвороби, тобто збудник хвороби – це патоген, що спричинив конкретне захворювання. Іншими словами, якщо під терміном "патоген" (фітопатоген) розуміємо біологічну особливість мікроорганізму, під терміном "збудник хвороби" – видову ознаку патогена, що характеризується його патогенністю, тобто здатністю спричиняти притаманний лише для нього патологічний процес (захворювання). Далеко не кожен патоген може бути збудником хвороби в системній єдності складників мікробіоти здорових органів рослин, у т.ч. і насіння, адже для фітопатогенних бактерій сапротрофний спосіб існування на рослинах у вигляді епіфітної і ендofітної мікрофлори спостерігається, мабуть, частіше, ніж паразитарний [1]. Природно, що термін "патоген" (фітопатоген) стосується виключно інфекційних хвороб, оскільки саме їх спричиняють абіотичні, антропогенні чи біотичні чинники, але не збудники.

Практично всі виділені із аутомікрофлори насіння сосни звичайної мікроорганізми були токсичними стосовно проростків. На картопляному агарі у проростаючого насіння засихають кінчики проростків. Деякі з них (5-10 %) виростають до невеликих розмірів (7-8 мм), покриваються коричневими поздовжніми смужками, кінчик на 1-2 мм некротизується, ріст припиняється. Такого перебігу проростання насіння на фільтрувальному папері з ватною підстилкою ми не спостерігали. Але в цих умовах не розвивались бактерії та мікроміцети. Отже, за нормальних умов росту як на насінні, так і на проростках, розвиток мікробіоти повністю контролює рослина. Під час проростання насіння на картопляному агарі (КА) бактерії виходять із-під контролю рослини, мають змогу швидко розмножуватись і своїми продуктами життєдіяльності впливають на її проростання. Тобто, у системі насіння – бактерії – КА регулятивна, домінуюча функція переходить до бактерій (мікроорганізмів), тоді як у системі насіння – мікроорганізми (бактерії) – фільтрувальний папір (грунт, пісок) вся мікробіота підпорядкована рослині.

Вивчення антагоністичних (бактерицидних і бактериостатичних) взаємин як усередині видів, так і між видами бактерій і грибів свідчить про те, що між компонентами мікробіоти насіння сосни не має чітко виражених антагоністичних властивостей. Так, фітопатогенні бактерії насіння практично не пригнічують сапротрофні бактерії: тільки у 2,3 % випадків відзначено слабку антагоністичну активність патогенів відносно сапротрофів. Сапротрофи виявилися активнішими до патогенів – у 5,3 % випадків відзначені мікроорганізми-антагоністи із зоною пригнічення патогенів 3-5 мм. Незначні зони взаємного впливу не вважають антагоністичними, проте вони свідчать про

наявність в популяції потенційного антагонізму, який може змінитися (посилитися або ослабнути) у разі зміни умов зростання бактерій, зокрема, під час проростання насіння.

Серед бактерій найчутливіші до ізолятів мікробної популяції насіння представники патогенів – *Ps. syringae* – збудник бактеріозів багатьох рослин, у т.ч. і лісових, *E. carotovora* – збудник м'якої гнилизни органів рослин та *E. nimipressuralis* – збудник "водянки". Стійкішими до антагоністичних проявів у мікробній асоціації насіння сосни виявилися сапротрофи і опортуністичні патогени, зокрема штами *Ps. fluorescens*. Жоден із вивчених штамів грибів і бактерій, зокрема і колекційних, не пригнічував штами *P. polytuxa*. Водночас ці штами проявляють найбільший антагонізм до патогенів: 22,4 % вивчених взаємин цієї бактерії мали антагоністичний характер. Аналогічно поводяться і штами *B. subtilis*. Не виявлено впливу неспороносних бактерій на спороносні. При цьому спороносні бактерії тією чи іншою мірою пригнічують ріст неспороносних штамів, тобто антагоністична активність більш виражена у спороносних бактерій порівняно з неспороносними.

На відміну від бактерій, мікроміцети, ізольовані з насіння сосни звичайної, проявляли значну антагоністичну активність відносно фітопатогенних бактерій. Найактивнішими були представники роду *Penicillium*. Активність грибів родів *Aspergillus* і *Acremonium* була вибірковою: вони не затримували ріст *E. carotovora* і дещо пригнічували *Agrobacterium tumefaciens* (колекційний штам, з насіння сосни не ізольований) і *Ps. fluorescens*. До всіх видів грибів найчутливішими були *Ps. syringae* і колекційні штами *Xantomonas campestris* і *Clavibacter michiganensis* (на сосні їх не виявлено). Ми не встановили антигрибної активності фітопатогенних бактерій. Можна припустити, що у природі фітопатогенні бактерії поза патологічним процесом не впливають на ріст мікроміцетів.

Таким чином, мікробіота насіння – складна саморегульована система, в основі якої лежить міграція речовин і енергії. Будь-які зміни в організмі рослини-господаря під впливом тих або інших чинників неминуче позначаються на його взаєминах з аутомікрофлорою, обумовлюючи порушення динамічної рівноваги між окремими групами мікроорганізмів, що може призвести, а часто і призводить, до патологічних проявів на рослинах загалом в процесі їх онтогенезу. Такі зміни спричиняє хімічне (та й біологічне) протруювання насіння, без якого сьогодні не обходяться технології його зберігання та підготовки до посіву, і яке спрямоване на пригнічення (знищення) патогенів. Проте потрібно враховувати, що хімічні і біологічні пестициди пригнічують не тільки розвиток патогенів, але і сапротрофів (грибів і бактерій), які є обмежувальним чинником для патогенів.

Для регулювання патогенних і сапротрофних мікроорганізмів у мікробіоті рослин (насіння) доцільно обробляти їх нетоксичними речовинами, які легко засвоюються сапротрофами, але не патогенами. Такими є сапротрофні представники родів *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella* тощо. Ці бактерії використовують ширший спектр органічних сполук, ніж патогени. Так, деякі фітопатогенні бактерії і

гриби не використовують саліцин, лактозу, деякі спирти, які легко засвоюються сапротрофами-антагоністами. Оброблення насіння такими речовинами стимулюватиме ріст лише сапротрофів. Обробляти можна як окремо, так і в суміші з пробіотиками і пестицидами, що сприятиме швидшому нагромадженню сапротрофів-антагоністів порівняно з патогенами. Такі роботи розпочато в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і вони, на наш погляд, досить перспективні.

## ЛІТЕРАТУРА

**1. Гвоздяк Р.І.** Перспективні напрями дослідження фітопатогенних бактерій // Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія : зб. статей учасників Міжнар. наук. конф. (4-6 жовтня 2005 р., м. Київ). – Житомир : Вид-во "Державний агроекологічний університет", 2005. – С. 3-8.

**2. Овчаренко Л.П.** Метагеномний аналіз мікроорганізмів довкілля / Л.П. Овчаренко, Н.О. Козирівська. – К. : Вид-во "Спринт-принт", 2008. – 256 с.

**3. Пасічник Л.А.** Фітопатогенні і сапротрофні бактерії агроекосистем пшениці і вівса : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук. – К., 2009. – 44 с.

**4. Розенфельд В.В.** Епіфітна і ендofітна мікрофлора насіння сосни звичайної Київського Полісся : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. – К., 2008. – 21 с.

**5. Шерстобосва О.В.** Проблеми бактеріальних ендofітів у рослинно-мікробній взаємодії // Агроекологічний журнал. – 2006. – № 1. – С. 15-18.

**6. Andrews J.H.** The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol* / J.H. Andrews, R.F. Harris. – 2000. – Vol. 38. – P. 145-185.

**7. Klement Z.** Methods in phytobacteriology / Z. Klement, K. Rudolf, D.S. Sands. – Budapest : Academiai Kiado, 1990. – 568 p.

**A. F. Goychuk, R. I. Gvozdyak, V. V. Rozenfeld**

## MICROBIOTA OF SEED OF SCOTS PINE-TREE AND DIRECTIONS OF STIMULATION IT SAPROTROPH CONSTITUENT

*The research results of Scots pine-tree healthy seeds auto-microflora are presented. A microbial association is represented by actual phytopathogenic (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *E. nimipressuralis*), opportunistic phytopathogenic (*Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*) and saprotrophic (*Bacillus subtilis*, *B. rumilus*, *Paenibacillus polymyxa*) bacteria, as well as by mushrooms from species *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Torula*. Clearly expressed antagonistic properties of seeds microbiota are not identified between the components as well as within and between the species and functional groups of auto-microflora. This should be taken into consideration during the harvesting, preservation and preparing of seeds for sowing.*

**Key words:** seeds, properties of seeds, microflora, bacteria, mushrooms.

