СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІ НАУКИ

УДК 579.262:579.64

ВЗАЄМОВІДНОСИНИ МІЖ BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM І ЗБУДНИКАМИ БАКТЕРІОЗІВ СОЇ ТА ЇХ ЧУТЛИВІСТЬ ДО ПЕСТИЦИДІВ

Алєксєєв О.О.
Вінницький національний аграрний університет
Патика В.П., Гнатюк Т.Т.
Інститут мікробіології і вірусології
Національної академії наук України імені Д.К. Заболотного

Визначено, що характер взаємовідносин між Bradyrhizobium japonicum та фітопатогенними бактеріями носить характер нейтралізму. Наведено результати скринінгу пестицидів, які не виявляють токсичної дії до бульбочкових бактерій. Виявлено можливість поєднання обробки насіння сої інокулянтами та пестицидами. Вивчено чутливість представників основних родів фітопатогенних бактерій до препаратів хімічного походження. Визначено препарати, які при використанні в польових умовах не знищать інокулянти бульбочкових бактерій.
Ключові слова: пестициди, соя, ризобії, фітопатогенні бактерії, інокулянти.

Постановка проблеми. Беззаперечною складовою сучасних технологій вирощування зернобобових культур є бактеризація (інокуляція) насіння, яка є ефективним агротехнічним прийомом і сприяє підсиленню азотфіксуючої здатності рослини, що в свою чергу, підвищує врожайність і поліпшує фітосанітарний стан посівів. Інокуляція за допомогою високоактивних штамів бульбочкових бактерій сприяє інтенсивному росту та розвитку бобових культур.

Симбіотичні відносини з мікроорганізмами відіграють важливу роль в житті рослин. Мікроорганізми, асоційовані з рослиною, дедалі частіше розглядаються як агенти стимулювання росту та імунітету. Яскравим прикладом прямого впливу бактерій на процеси росту й розвитку рослин є фіксація атмосферного азоту. При цьому включаються саморегулюючі процеси, в основі яких лежить взаємодія організмів, є відповідальними за стан динамічної рівноваги із зовнішнім середовищем [1, 2].

До факторів, які традиційно впливають на якість формування бобово-ризобіального симбіозу (нодулювальна активність, стимуляція імунітету, ріст-стимуляція) додаються і постійно кількісно збільшуються препарати хімічного та біологічного походження спрямовані на захист рослин, що призводить до серйозних негативних наслідків, в разі їх токсичної дії на інокулянти.

Мікроорганізми, асоційовані з рослиною та колонізуючи її постійно супроводжують культурні і дикі види рослин. Поряд із сапрофітною та симбіотичною мікробіотою активно функціонують фітопатогенні мікроорганізми. Широко розповсюджені фітопатогенні бактерії спричинюють значні втрати у рослинництві, а їх прямі та опосередковані природні зв'язки із всіма біотичними складовими агрофітоценозу регулюються такими видами взаємовідносин, як пригнічення видового різноманіття (нейтралізм, паразитизм, алелопатія, конкуренція і антагонізм), або симбіотичні (мутуалізм, коменсалізм), навпаки, дають поштовх для потенційного розвитку організму [3, 4].

Мета статті. Головною метою цієї роботи є скринінг пестицидів, які не виявляють токсичної дії до бульбочкових бактерій та визначення характеру взаємовідносин між *Bradyrhizobium japonicum* штам М-8 та фітопатогенними бактеріями.

Матеріали та методи. В роботі були використані бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium japonicum* штами М-8 і 634б, а також представники найбільш шкодочинних та поширених бактеріальних фітопатогенів сої та інших сільськогосподарських рослин. В якості тест культур використано представників найбільш поширених і агресивних бактеріальних фітопатогенів сої та інших сільськогосподарських рослин із колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАНУ: *Xanthomonas axonopodis pv. glycines* 10 штамів – збудника пустульного бактеріозу сої, *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea* 13 штамів – збудника кутастої плямистості сої, *Pseudomonas syringae pv. tabaci* 2 штами – бактеріального опіку, *Pantoea agglomerans* 5 штамів – збудника смугастості стебла сільськогосподарських рослин; представники збудників бактеріозів сільськогосподарських та деревних рослин *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027 – збудник плямистостей с/г рослин, *Pseudomonas fluorescens* 8573 – збудник плямистостей плодових, *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095 – збудник м'яких гнилей с/г рослин, *Xanthomonas campestris pv. campestris* УКМ В-1049 – збудник судинного бактеріозу капусти, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* 10 – збудник бактеріального раку томатів, *Agrobacterium tumefaciens* 8628 збудник бактеріального раку с/г рослин.

Для визначення характеру взаємовідносин між дослідними мікроорганізмами використано метод відстроченого штриха за Єгоровим Н. [5].

© Алєксєєв О.О., Патика В.П., Гнатюк Т.Т., 2016

Для скринінгу найбільш придатних препаратів, хімічного походження при одночасній обробці рослин разом із інокулянтами використано: Харнес (досходовий ґрунтовий гербіцид), Прометрин (ґрунтовий гербіцид), Ранкона (протруйник фунгіцид), Максим XL (фунгіцид), а також широковживані в сільськомугосподарстві України: Ридоміл, Пропульс, Фалькона, Замір (фунгіциди) [6].

Дію зазначених препаратів оцінювали за їх впливом на ріст бактеріальних штамів у дозі, рекомендованій до використання. Для цього застосовували крапельний метод, за яким 0,1 мл бактеріальної суспензії наносили у вигляді краплі у центр картопляної пластинки з бактеріальною тест-культурою. Відсутність затримки росту вказувало на резистентність мікроорганізмів до даної концентрації препарату. Зона, діаметр яких не перевищує 15 мм, свідчить про слабку чутливість до препарату. Зона затримки росту від 15 до 25 мм фіксується у чутливих мікроорганізмів, зона, що характеризується високою чутливістю до препарату формується з діаметром більш ніж 25 мм [7].

Виклад основного матеріалу. Біотичні фактори які є основою природних зв'язків, досить чітко регулюють взаємовідносини між складовими мікробіоти агроценозу (нейтралізм, паразитизм, алелопатія, конкуренція і антагонізм), зумовлюючи пригнічення видового різноманіття. В свою чергу симбіотичні (мутуалізм, коменсалізм), навпаки, дають поштовх для потенційного розвитку організму [1]. Бульбочкові бактерії функціонують в такому агроценозі поряд з ґрунтовими мікроорганізмами, епіфітами та фітопатогенами.

Сукупність відносин, які складаються у біотичній спільноті, дуже складні, різноманітні і відповідають вище переліченим варіаціям залежно від того, стимулюється чи обмежується життєдіяльність кожного з них, і часто до кінця не вивчені. Це стосується перш за все відносин між ризобіями та фітопатогенними бактеріями. З літературних джерел відомо поодинокі випадки про можливість інфікування сої агресивним штамом *Bradyrhizobium japonicum* [8], тому можливо було б передбачити наявність певного антагонізму або конкуренції між бульбочковими бактеріями та бактеріальними фітопатогенами. В той же час за данними Кириленко Л. [9] штучна інокуляція рослин сої високоефективними штамами *Bradyrhizobium* опосередковано зменшує чутливість рослин до зараження бактеріальними фітопатогенами, підвищує їх загальну стійкість до біотичних та абіотичних факторів. Проведене нами штучне моделювання взаємовідносин в лабораторних умовах між бульбочковими бактеріями та представниками найбільш поширених та агресивних збудників бактеріозів сої показали відсутність будь-якого впливу усіх бактеріальних агентів на ріст одне одного. Стабільний потужний ріст кожної культури не нівелювався ростом іншої (табл. 1, 2).

Отримані результати свідчать про те, що взаємодія між бульбочковими бактеріями та збудниками бактеріозів сої та іншими патогенами сільськогосподарських рослин носить характер нейтралізму який уособлює взаємовідносини, за яких організми, що розвиваються у складі одного ценозу, безпосередньо не впливають одне на одного. Тому опосередкована взаємозалежність організмів при цьому неминуча, оскільки вони є елементами однієї спільноти.

Таблиця 1

Визначення характеру взаємодії Bradyrhizobium japonicum з представниками основних збудників бактеріальних захворювань сої

Використані в дослідженні тест-культури		діаметр зони пригнічення росту тест-культури в мм. в якості можливого антагоніста *Bradyrhizobium japonicum*	
		штам М-8	штам 634б
Збудник пустульного бактеріозу сої *Xanthomonas axonopodis pv.glycines*	штам 3	0	0
	штам 8562	0	0
	штам 8835	0	0
	штам 8609	0	0
	штам 9075	0	0
	штам 8	0	0
Збудник кутастої плямистості сої *Pseudomonas savastanoi pv.glycinea*	штам 8541	0	0
	штам 9072	0	0
	штам 9074	0	0
Бактеріальний опік *Pseudomonas syringae pv.tabaci*	штам 225	0	0
Solanacearum formae sojae	штам 8543	0	0
Збудник смугастості стебла с/х рослин *Pantoea agglomerans* штам	8490	0	0
Збудник іржаво-бурої плямистості квасолі *Curtobacterium flaccumfaciens*	штам 6566	0	0

Примітка: 0 – відсутність антагонізму

Таблиця 2

Визначення характеру взаємодії Bradyrhizobium japonicum з представниками основних збудників бактеріальних захворювань с.-г. рослин

Використані в дослідженні тест-культури	Діаметр зони пригнічення росту тест-культури в мм в якості можливого антагоніста *Bradyrhizobium japonicum*	
	штам М-8	штам 634б
Pseudomonas syringae УКМ В-10277	0	0
Pseudomonas fluorescens	0	0
Pectobacteriumcarotovorum УКМ В-1095т	0	0
Xanthomonas campestris pv. campestris – УКМ В-1049	0	0
Clavibacter michiganensis	0	0
Agrobacterium tumefaciens 8628	0	0

Таблиця 3

Визначення чутливості представників основних родів фітопатогенних бактерій до препаратів хімічного походження

Дослідний штам	Хімічні засоби захисту рослин							
	Фунгіциди						Гербіциди	
	Максим XL	Ридоміл	Пропульс	Ранкона	Фалькон	Замір	Харнес	Прометрин
	Діюча речовина							
	Метал-аксил-М, флуди-оксонил	манкоцеб, метал-аксил-М	Проти-око-назол, флуопи-рам	іпкона-зол	Тебуко-на-зол, триа-ди-менол, спірокса-мін	Прохло-раз, тебукона-зол	ацетон-хлорид	прометрин
	Діаметр зони пригнічення (мм)							
Xanthomonas axonopodis pv. glycines 10 штамів	20-35	35-40	0	30-35	0	0	0	0
Pseudomonas savastanoi pv. glycinea 13 штамів	0-15	15-25	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas syringae pv. tabaci 2 штами	0	15	0	0	0	0	0	0
Pantoea agglomerans 5 штамів	0	10-15	0	0	0	0	0	0

Примітка: «цифрові позначки» – позитивна реакція, наявність зони пригнічення росту, «0» – відсутність зони пригнічення росту, активний ріст тест-культури

В останні часи в зв'язку з широким використанням зарубіжних та вітчизняних фунгіцидів та гербіцидів гомеостаз між поширенням і функціонуванням патогенних грибів і бактерій значно порушено, адже дієвих препаратів хімічного походження проти фітопатогенних бактерій практично не існує, а доля біопрепаратів їх використання не перевершує. Фітопатогенні бактерії займають місце грибної мікрофлори, все частіше констатується їх поширення наприкінці вегетативного сезону або сумісний паразитизм на сходах [10, 11]. Проведене нами визначення можливої токсичної дії на фітопатогенні збудники бактеріозів сої ряду пестицидів (табл. 3) показало, що переважна кількість дослідних препаратів не виявляють токсичної дії до представників основних родів та видів фітопатогенних бактерій (табл. 3), за виключенням препарату – фунгіциду Ридоміл, який токсичний до фітопатогенів, а фунгіциди Ранкона та Максим XL – вибірково до збудників пустульного бактеріозу сої *axonopodis pv. glysines*. Що узгоджується із попередніми нашими дослідженням де визначено можливу токсичну дію хімічних речовин манкоцебу та металаксилу на фітопатогенні бактерії [4].

В подальших дослідженнях встановлено, що ряд дослідних пестицидів різного призначення (гербіциди, фунгіциди) не виявляють токсичної дії до штамів М-8 та 634б у лабораторних умовах. До таких пестицидів можна віднести Харнес, Прометрин, Ранкона, Максим XL (табл. 4). Їх можна рекомендувати для сумісного або паралельного застосування інокуляції насіння сої вказаним штамом і препаратів на його основі. При цьому застосування препаратів Ранкона та Максим XL, які не мають токсичної дії до досліджених штамів *Bradyrhizobium japonicum*, можливе як бактреріоцидів до низки фітобактерій.

Однак, такі широковживані фунгіциди як Ридоміл, Замір, Фалькона виявляють значну токсичну дію до дослідних штамів *Bradyrhizobium japonicum*. Відмічається також, що фунгіцид Пропульс та інсектицид Пончо виявились токсичними до штамів бульбочкових бактерій, проте в дещо меншому ступені. Тому за потреби використання цих препаратів при інокуляції бульбочковими бактеріями потрібно додержуватись почерговості їх використання. Отримані результати вказують на необхідність постійного визначення сумісності препаратів хімічного та біологічного походження при їх застосуванні в сільському господарстві.

Таблиця 4

Визначення чутливості Bradyrhizobium japonicum, штамів М-8 та 634б до препаратів хімічного походження

Дослідний препарат	Діаметр зон пригнічення росту (мм), *Bradyrhizobium japonicum*	
	штаму М-8	штам 634б
Ридоміл	45	55
Пропульс	25	20
Ранкона	0	0
Максим XL	0	0
Харнес	0	0
Прометрин	0	0
Пончо	15	22
Замір	35	30
Фалькон	38	35

Примітка: «цифрові позначки» – позитивна реакція, наявність зони пригнічення росту, «0» – відсутність зони пригнічення росту, активний ріст тест-культури

Висновки та пропозиції. Таким чином визначено, що передпосівну обробку насіння сої та інокулюванні насіння сої бульбочковими бактеріями можливо поєднувати тільки в разі відсутності токсичної дії на них застосованих пестицидів. Такими препаратами можуть бути Ранкона, Прометрин, Максим XL. Гербіциди Харнес і Прометрин при використанні в польових умовах не знищать інокулянти бульбочкових бактерій. Використання фунгіцидів Ранкона або Максим XL не тільки пригнічує патогенну грибну мікробіоту насіння, а і бактеріальну.

Список літератури:

1. Патика В.П., Омельянець Т.Г., Гриник І.В., Петриченко В.Ф. Екологія мікроорганізмів. – Київ: Основа, 2007. – 192 с.
2. Кириченко О.В. Комплексна оцінка модуляційної здатності бульбочкових бактерій та особливості формування симбіотичних систем сої за інокуляції насіння мікробними композиціями // Мікробіол. журн. – 2016. – Т. 78, № 4. – С. 90–101.
3. Вознюк С.В., Титова Л.В., Ратушинська О.В., Іутинська Г.О. Формування та функціонування симбіотичних систем та мікробіоценозу ризосфери сої за використання різних фунгіцидів // Мікробіол.журн. – 2016. – Т. 78, № 4. – С. 90–101.
4. Бактеріальні хвороби сільськогосподарських рослин і пестицидів / Петриченко В.Ф., Корнійчук О.В., Пасічник Л.А. та ін. // Вісник Аграрної Науки. – № 4. – 2013. – С. 21-26.
5. Єгоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд. МНУ, 1994. – 512 с.
6. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні –Арт-Прес. – 2008, додаток від 1.01.12.
7. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»/ Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 р.
8. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яовлева Л.М., Мороз С..М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гриник І.В., Патика В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин. – Монографія. – Київ: ТОВ «НВП Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
9. Кириленко Л.В. Формування високоефективної симбіотичної системи Rhizobium galegae – козлятник / Кириленко Л.В., Шкатула Ю.М., Коць С.Я., Маменко П.М., Патика В.П. // Науково–теоретичний журнал Вісник аграрної науки. – 2014. – № 1 (731). – С. 22–25.
10. Патика В.П. Збудники бактеріальних хвороб сої та їх моніторинг/ В.П. Патика, Т.Т. Гнатюк, Житкевич Н.В. // Вісник аграрної науки. – 2015. – 6, № 15. – С. 15–19.
11. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз: монография в 4-х т. / Том 1 / С.Я. Коць, В.В. Моргун, В.Ф. Патика, В.К. Даценко, Е.Д. Кругова, Е.В. Кириченко, Н.Н. Мельникова, Л.М. Михалкиев. – К.: Логос, 2010. – 508 с.

Алексеев А.А.
Винницкий национальный аграрный университет
Патыка В.Ф., Гнатюк Т.Т.
Институт микробиологии и вирусологии
Национальной академии наук Украины имени Д.К. Заболотного

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM И ВОЗБУДИТЕЛЯМИ БАКТЕРИОЗОВ СОИ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПЕСТИЦИДАМ

Аннотация
Определено, что характер взаимоотношений между Bradyrhizobium japonicum и фитопатогенными бактериями носит характер нейтрализма. Приведены результаты скрининга пестицидов, которые не проявляют токсического действия к клубеньковым бактериям. Выявлена возможность сочетания обработки семян сои инокулянтами и пестицидами. Изучено чувствительность представителей основных родов фитопатогенных бактерий к препаратам химического происхождения. Определены препараты, которые при использовании в полевых условиях не погубят инокулянты клубеньковых бактерий.

Ключевые слова: пестициди, соя, ризобии, фитопатогенные бактерии, инокулянты.

Alieksieiev O.O.
Vinnytsia National Agrarian University
Patyka V.P., Hnatiyk T.T.
D.K. Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology
of the National Academy of Sciences of Ukraine

THE RELATIONSHIP BETWEEN BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM AND SOYBEAN BAKTERIOSIS PATHOGENS AND THEIR SENSITIVITY TO PESTICIDES

Summary
It is determined that the nature of the relationship between Bradyrhizobium japonicum and phytopathogenic bacteria is neutralizm. The results of screening of pesticides that show no toxic effect to the rhizobia are shown. The possibility of combining the soybean seed treatment with inoculants and pesticides is brought to the front. The sensitivity of representatives of major genus of phytopathogenic bacteria to chemical drugs is studied. Specimens that won't destroy the inoculums of legume bacterium while using in the field are determined.

Keywords: pesticides, soybean, rhizobia, phytopathogenic bacteria, inoculums.