

ВПЛИВ РИЗОБАКТЕРІЙ НА РОЗВИТОК ІНФЕКЦІЇ, ВИКЛИКАНОЇ ВІРУСОМ ЗЕЛЕНОЇ КРАПЧАСТОЇ МОЗАЇКИ ОГІРКА НА РОСЛИНАХ *CUCUMIS SATIVUS*

**¹Харіна А.В., ¹Скрипов В.Г., ¹Будзанівська І.Г.,
²Ковальчук М. В., ²Козирівська Н.О., ¹Поліщук В.П.**

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна

²Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна

Представлені результати дослідження впливу деяких ризобактерій на розвиток інфекції, спричиненої вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка на рослинах огірка. Обробка насіння трьома штамами ризобактерій приводить до затримки появи симптомів вірусної інфекції та зниження кількості вірусу в рослинах, стимулювання росту рослин. Отже, рістстимулювальні ризобактерії можуть відігравати важливу роль у боротьбі з вірусними інфекціями рослин та підвищенні врожайності сільськогосподарських культур.

Ключові слова: *ризобактерії, вірус, захист рослин*

Обробка рослин авірулентними формами фітопатогенів може індукувати резистентність рослин до інфекційних захворювань. Системна стійкість (ІСС) рослин спостерігається також при інокуляції їхніх коренів певними штамами ризобактерій [1, 2], серед яких найактивнішими є представники роду *Pseudomonas*. Колонізуючи кореневу систему, вони спричиняють ІСС у багатьох рослин, проте позитивний результат цілком залежить від комбінації бактерія-рослина-хазяїн [3].

Відомо, що бактерії, навіть всередині виду, мають різну здатність спричиняти ІСС рослин [4]. Деякі бактерії (*Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) активують захисну систему рослини [5]. Обробка коренів певними штамами ризобактерій робить рослину стійкою до широкого кола патогенів, наприклад, *P. fluorescens* WCS417r індукують стійкість рослини до кореневого патогену *Fusarium oxysporum*, листових патогенів *P. parasitica*, *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* та *P. syringae* pv. *tomato* [6]. Останнім часом показано можливість застосування ризобактерій для боротьби з

фітовірусними інфекціями. *P. fluorescens* СНАО викликає стійкість рослин тютюну до вірусу некрозу тютюну [7], а *P. fluorescens* CoT-1 індукуює стійкість томатів до вірусу плямистого в'янення томатів [8]. Бактерії *Bacillus pumilis* та *Serratia marcescens* зумовлюють пригнічення розвитку вірусу мозаїки огірка в рослинах *Arabidopsis thaliana* [9].

Потенціал використання ризобактерій для боротьби з фітовірусними інфекціями ще не досить вивчений. Важливою перевагою даного підходу є екологічна безпечність, оскільки ризобактерії стимулюють природні захисні механізми рослини. З огляду на це, метою даної роботи було дослідження впливу деяких ризобактерій на розвиток інфекції, викликані вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО), який належить до РНК-вмісних вірусів (рід *Tobamovirus*) [10].

Матеріали й методи. В роботі використовували український ізолят ВЗКМО, попередньо накопичений та очищений за загально прийнятою методикою [11].

Для передпосівної обробки насіння огірків використовували культури бактерій *Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia* ІМБГ147, *Pseudomonas* sp. ІМБГ126, *Pseudomonas* sp. ІМБГ162, *Pseudomonas* sp. ІМБГ163, *Pseudomonas aureofaciens* ІМБГ97, *P. aureofaciens* ІМБГ164, *Pantoea agglomerans* ІМБГ82 (люб'язно надані проф. Р.І. Гвоздяком). Бактерії вирощували у рідкому середовищі LB протягом 18-24 годин. Титр бактерій у препаратах становив 10^6 КУО/мл.

Для проведення дослідів використовували рослини огірка (*Cucumis sativus*) сорту Фенікс-640, чутливого до ВЗКМО.

Перед обробкою ризобактеріями поверхню насіння огірків стерилізували, використовуючи 70 %-ний спирт (60 сек.), 30 %-ний розчин пероксиду водню (3 хв) та комерційний хлорвмісний препарат (15 хв). Після кожного дезінфектанту насіння промивали в стерильній дистильованій воді протягом 1 хв. Після обробки комерційним хлорвмісним препаратом насіння промивали двічі по 10 хв. Простерилізоване насіння пророщували в чашках Петрі. Одразу після проростання (на третю добу) проводили інкубацію насіння з ризобактеріями протягом 1 год. Перед висадкою в ґрунт додавали 1 мл бактеріальної суспензії в лунку для насіння.

Як контроль були висаджені рослини без бактеріальної обробки насіння.

На 21-у добу після висадження рослини інокулювали вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка способом механічної інокуляції. Концентрація вірусу в інокулюмі становила 700 мкг/мл.

Для визначення концентрації вірусу в досліджуваних зразках проводили непрямий ІФА [12].

Результати та їх обговорення. Для дослідження можливого стимулювального впливу ризобактерій на захисні механізми рослин огірків насіння обробляли бактеріальною суспензією з наступною інокуляцією рослин вірусом. Вплив ризобактерій на розвиток стійкості рослин до патогену оцінювали за фенотиповими ознаками (час появи та ступінь прояву симптомів) та рівнем накопичення рослинами вірусного антигену. Слід відмітити, що прояв симптомів та рівень накопиченого вірусу є різними критеріями оцінки розвитку інфекційного процесу. Між цими параметрами кореляції може не бути.

При проведенні експериментів ми спостерігали появу симптомів вірусної інфекції через два тижні після інокуляції ВЗКМО. На молодих верхівкових листках рослин, оброблених ризобактеріями *Pseudomonas* sp. ІМБГ162, *Pseudomonas* sp. ІМБГ163 та контрольних рослинах симптоми проявлялись у вигляді темно-зеленої плямистості, складчастості листової пластинки вздовж центральної жилки. Впродовж наступних 10 днів з'явилися симптоми на рослинах у всіх варіантах інокуляції ВЗКМО. На листках рослин, оброблених препаратами *P. aureofaciens* ІМБГ97, *P. aureofaciens* ІМБГ164 та *P. agglomerans* ІМБГ82, спостерігали слабо виражені хлороз і крапчастість. Таким чином, штами *P. aureofaciens* ІМБГ97, *P. aureofaciens* ІМБГ164 та *P. agglomerans* ІМБГ82 зумовлювали затримку появи симптомів до 10 днів, порівняно з контролем. Крім того, симптоми дещо відрізнялися за фенотиповим проявом.

Через чотири тижні після інокуляції вірусом рослини тестували на присутність вірусного антигену за допомогою ІФА. Встановлено, що штам *X. maltophilia* ІМБГ147 найефективніше знижує концентрацію вірусного антигену в рослині (на 66,3 %) (рис. 1), але фізіологічний стан рослин, оброблених цією бактеріальною суспензією, є гіршим (затримка росту, наявність чітко виражених симптомів) в порівнянні з рослинами, обробленими штамами *P. aureofaciens* ІМБГ97, *P. aureofaciens* ІМБГ164 та *P. agglomerans* ІМБГ82.

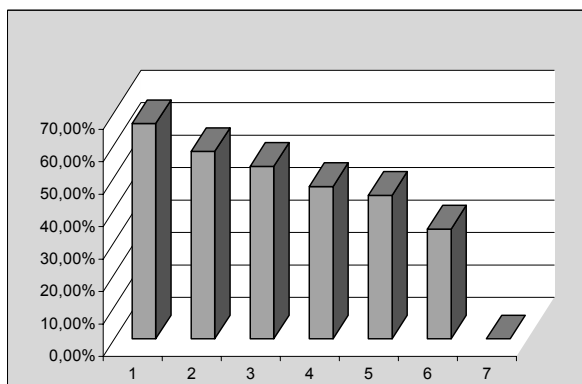


Рис. 1. Зниження рівня вірусного антигену в рослинах під впливом ризобактерій

1 – *Xanthomonas maltophilia* ІМБГ147; 2 – *Pseudomonas sp.* ІМБГ126; 3 – *Pantoea agglomerans* ІМБГ82; 4 – *Pseudomonas aureofaciens* ІМБГ97; 5 – *Pseudomonas aureofaciens* ІМБГ164; 6 – *Pseudomonas sp.* ІМБГ162; 7 – *Pseudomonas sp.* ІМБГ163

Рослини, оброблені препаратом *Pseudomonas sp.* ІМБГ126, містили на 57,7 % менше вірусу в порівнянні з контролем, проте їхній фізіологічний стан був незадовільним. У той же час рослини, оброблені *Pantoea agglomerans* ІМБГ82, *Pseudomonas aureofaciens* ІМБГ97 та *Pseudomonas aureofaciens* ІМБГ164, мали набагато кращий фізіологічний стан (розміри значно перевищували показники контрольних рослин, слабкі симптоми) та знижений вміст вірусного антигену на 53,1 %, 46,9 % та 44,2 %, відповідно (рис. 1, 2).

Рослини, оброблені препаратом *Pseudomonas sp.* ІМБГ162, за фізіологічними показниками були схожі з тими рослинами, які оброблялися суспензією *X. maltophilia* ІМБГ147, але, за даними ІФА, вміст вірусу в них знижувався всього на 33,8 %. Найгірші показники мали рослини, оброблені *Pseudomonas sp.* ІМБГ163 (рис. 3). В даному випадку рослини мали менші, ніж у контролі, розміри та яскраво виражені симптоми вірусної інфекції. Крім того, спостерігалася затримка розвитку рослин, оброблених препаратом *Pseudomonas sp.* ІМБГ163, а концентрація вірусного антигену у рослинах, за даними ІФА, перевищувала дані контролю.



Рис. 2. Порівняння рослин, оброблених препаратом ризобактерій та інокульованих вірусом, з рослинами, інокульованими вірусом без обробки ризобактеріями (вірусний контроль)

- 1 – *Pseudomonas aureofaciens* ІМБГ164 + інокуляція ВЗКМО;
- 2 – *Pantoea agglomerans* ІМБГ82 + інокуляція ВЗКМО;
- 3 – контроль (інокуляція ВЗКМО).



Рис. 3. Порівняння рослин, оброблених препаратом ризобактерій та інокульованих вірусом, з рослинами, інокульованими вірусом без обробки ризобактеріями (вірусний контроль)

- 1 – *Pseudomonas sp.* ІМБГ163 + інокуляція ВЗКМО;
- 2 – *Pseudomonas sp.* ІМБГ162 + інокуляція ВЗКМО;
- 3 – контроль (інокуляція ВЗКМО).

Окрім значного зменшення концентрації вірусу в рослинах, *P. aureofaciens* ІМБГ97, *P. aureofaciens* ІМБГ164 та *P. agglomerans* ІМБГ82 зумовлювали стимулювання росту оброблених відповідними препаратами рослин, спостерігалось збільшення кількості квітів

та загальної біомаси порівняно з необробленими контрольними рослинами. Відомо, що непатогенні ризобактерії синтезують регулятори росту рослин, зокрема, цитокініни та ІОК [13]. Останні в свою чергу прямо чи опосередковано стимулюють ріст та розвиток рослин. Слід зазначити, що здатність стимулювати ці процеси та захисні відповіді рослини на ураження патогеном значною мірою залежать від виду рослини та штаму бактерії. Залежність від штаму бактерії ми спостерігали у проведених дослідях: серед семи досліджених штамів бактерій таку здатність проявили тільки три, тоді як інші виявилися або менш ефективними, або зовсім неактивними.

Отже, досліджувані нами штами ризобактерій значно відрізняються між собою за здатністю стимулювати ріст рослин огірка та індукувати системну резистентність до вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка. Подальші дослідження будуть спрямовані на встановлення механізмів дії перспективних штамів ризобактерій та на вивчення ефективності застосування комбінації декількох штамів бактерій для стимулювання росту рослин та пригнічення розвитку вірусної інфекції. Перспективним також є встановлення ефективності досліджених штамів бактерій проти інших фітовірусів.

1. Peer R. van, Niemann G.J., Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control in *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r // *Phytopathol.* – 1991. – Vol. 81. – P. 728-734.

2. Wei G., Klopper J.W., Tuzun S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growthpromoting rhizobacteria // *Phytopathol.* – 1991. – Vol. 81. – P. 1508-1512.

3. Bloembergen G.V., Lugterberg B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2001. – Vol. 4. – P. 343-350.

4. Wees S.C. van, Pieterse C.M., Trijssenaar A. et al. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 1997. – Vol. 10. – P. 710-716.

5. Choong-Min Ryu, Mohamed A.Farag, Chia-Hui et al. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – Vol. 134. – P. 1017-1026.

6. Loon L.C. van, Bakker P.A., Pieterse C.M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1998. – Vol. 36.

– P. 453-483.

7. Maurhofer M., Reimann C., Schmidli-Sacherer P. et al. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against *tobacco necrosis virus* // *Phytopathol.* – 1998. – Vol. 88. – P. 678-684.

8. Kandan A., Ramiah M., Vasanthi V.J. et al. Use of *Pseudomonas fluorescens*-based formulations for management of *tomato spotted wilt virus* (TSWV) and enhanced yield in tomato // *Biocontrol sci. and technol.* – 2005. – Vol. 15(6). – P. 553-569.

9. Ryu C.M, Murphy J.F, Mysore K.S, Kloepper J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway // *Plant J.* – 2004. – Vol. 39(3). – P. 381-92.

10. Fukuda M., Meshi T., Okada Y. et al. Correlation between particle multiplicity and location on virion RNA of the assembly initiation site for viruses of the *tobacco mosaic virus* group // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – Vol. 78. – P. 4231-4235.

11. Практикум по общей вирусологии / Под ред. Атабекова И.Г. – М.: Изд. Моск. ун-та, 1981. – 192 с.

12. Crowther J. ELISA. Theory and practice. – N.Y: Humana Press, 1995.

13. Loper J.E., Schroth M.N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet // *Phytopathol.* – 1986. – Vol. 76. – P. 386-389.

**ВЛИЯНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ НА РАЗВИТИЕ
ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ЗЕЛеноЙ
КРАПЧАТОЙ МОЗАИКИ ОГУРЦА НА РАСТЕНИЯХ
*CUCUMIS SATIVUS***

¹Харина А.В., ¹Скрипов В.Г., ¹Будзанивская И.Г.,
²Ковальчук М. В., ²Козыровская Н.О., ¹Полищук В.П.

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка,
г. Киев

²Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, г. Киев

Представлены результаты исследований влияния некоторых ризобактерий на развитие инфекции, вызванной вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца на растениях огурца. Обработка семян тремя штаммами ризобактерий обуславливает задержку появления симптомов вирусной инфекции и снижение количества вируса в растениях, стимулирование роста растений. Таким образом, ростстимулирующие ризобактерии могут играть важную роль в борьбе с вирусными инфекциями растений и увеличении урожайности сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: *ризобактерии, вирус, защита растений*

**THE INFLUENCE OF RHIZOBACTERIA ON THE
INFECTION OF *CUCUMIS SATIVUS* CAUSED BY
*CUCUMBER GREEN MOTTLE MOSAIC VIRUS***

¹Charina A.V., ¹Skripov V.G., ¹Budzanivska I.G.,
²Kovalchuk M. V., ²Kozirovska N.O., ¹Polischuk V.P.

¹Taras Shevchenko Kyiv National University

²Institute of Molecular Biology and Genetic, NAS of Ukraine, Kyiv

Some strains of rhizobacteria were investigated for biocontrol efficiency against cucumber green mottle virus (CGMV) in cucumber. Treatment of seeds with three strains of rhizobacteria caused delay in symptom appearance, reduced development of CGMV significantly and enhanced plant growth. Hence, plant growth promoting rhizobacteria could play a major role in reducing of plant virus infections and increasing crop yields.

Key words: *rhizobacteria, virus, plant protection.*