

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.02 – МКР. 2188 “С” 2023.11.29. 11 ПЗ

КОШМАН ЮРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

2024 р.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 632.3:632.93:633.16

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології

_____ **Коломієць Ю.В.**

«___» _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

ентомології, інтегрованого захисту та

карантину рослин

_____ **Доля М.М.**

«___» _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: Біологічні особливості збудника базального бактеріозу ячменю
Pseudomonas syringae pv. *atropaciens* та контроль його поширення**

Спеціальність 202 Захист і карантин рослин

Освітня програма Карантин рослин

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Гарант освітньої програми,

к.с.-г.н., доцент

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи,

доктор філософії

Виконав

Сикало О.О.

Статкевич О.І.

Кошман Ю.В.

КИЇВ – 2024

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
ентомології, інтегрованого захисту та
карантину рослин

_____ Доля М.М.
« ____ » _____ 2024 р.

ЗАВДАННЯ

**ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
СТУДЕНТУ**

Кошману Юрію Володимировичу

Спеціальність 202 Захист і карантин рослин

Освітня програма Карантин рослин

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: Біологічні особливості збудника базального бактеріозу ячменю *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* та контроль його поширення

затверджена наказом ректора НУБіП України від 29 листопада 2023 р. №2188 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру: 15 листопада 2024 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: збудник базального бактеріозу ячменю, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, контроль

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Виявлення збудника базального бактеріозу ячменю
2. Вивчення біологічних властивостей *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*
3. Дослідження впливу пестицидів на *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Дата видачі завдання “10” вересня 2023 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

О.І. Статкевич

Завдання прийняв до виконання

Ю.В. Кошман

РЕФЕРАТ

Робота виконана на 49 сторінках, містить 3 розділи, 4 рисунки, 5 таблиць, 43 джерела використаної літератури.

Метою роботи був моніторинг посівів ячменю в Київській області України на предмет виявлення бактеріальних хвороб; виділення збудників і вивчення їх основних біологічних властивостей.

В Україні ячмінь є однією з найважливіших зернових культур. Базальний бактеріоз ячменю, викликаний збудником *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* є однією з найбільш шкідливих хвороб ячменю в регіонах його вирощування та призводить до значних втрат урожаю. У цьому дослідженні було проведено комплексний аналіз збудника. Для цього було використано 17 бактеріальних ізолятів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, були охарактеризовані за допомогою біохімічних тестів, таких як LOPAT-тест, і з використанням тест системи API 20 NE.

Фітопатогенні бактерії демонструють полівалентну чутливість до пестицидів. Інсектициди та гербіциди, дозволені до використання в Україні, не проявляють вираженої антибактеріальної активності щодо збудників бактеріозів ячменю за внесення їх у агаризоване поживне середовище.

Серед фунгіцидів антибактеріальний ефект показали препарати "Делан", "Полірам" та "Ридоміл Голд" у стандартній та зменшеній у 10 разів дозі. Препарати "Карамба", "Шавіт" і "Альєт" демонстрували антибактеріальну активність лише за значного підвищення дозування. Інші фунгіциди виявили слабку або відсутню дію на збудників бактеріозів ячменю.

ЗМІСТ

Вступ	6
Розділ 1. Огляд літератури	8
1.1. Ячмінь – біологічні властивості та вимоги до вирощування	8
1.2. Бактеріальні хвороби ячменю	16
1.3. Роль технологій захисту рослин у стійкій сільськогосподарській продуктивності зернових культур	20
Розділ 2. Матеріали та методи	27
2.1. Виділення бактерій із уражених рослин	27
2.2. Визначення патогенних властивостей ізолятів	28
2.3. Вивчення властивостей та ідентифікація збудників бактеріальних хвороб	30
Розділ 3. Результати дослідження	33
3.1. Ідентифікація та характеристика штамів бактерій	33
3.2. Тести на патогенність ізолятів	37
3.3. Вивчення дії препаратів для захисту посівів ячменю	39
Висновки	43
Список використаних джерел	44

ВСТУП

Бактеріальні патогени викликають кілька типів захворювань у широкому діапазоні видів рослин. Багато економічно важливих зернових культур сильно уражені бактеріальними патогенами [1]. Рід *Pseudomonas* складається з кількох економічно деструктивних патогенів [2]. Він включає численні фітопатогенні бактерії, такі як *Pseudomonas syringae* (який є грамнегативним), паличкоподібні аеробні бактерії, що належать до родини *Pseudomonadaceae* [3]. Захворюваність, спричинена *Pseudomonas*, входить до десятки найпоширеніших бактеріальних хвороб рослин. Він може заразити бобові, хрестоцвіті, пасльонові, розоцвіті та понад триста культур. *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* викликає бактеріальний бактеріоз, який є широко поширеним захворюванням. Цей збудник уражає ячмінь, пшеницю [4], просо [5], суданську траву [6]. Це завдає величезних збитків сільськогосподарському виробництву.

Ячмінь є важливою продовольчою культурою. Із зерна скловидного крупнозерного дворядного ячменю виробляють перлову та ячмінну крупу, у складі якої міститься 9 — 11% білка, 82 — 85% крохмалю. У крайніх північних і гірських районах СНД із зерна ячменю виробляють борошно, яке використовують, як домішку до пшеничного або житнього борошна при випіканні хліба. Через низьку якість клейковини хліб з чистого ячмінного борошна виходить малооб'ємним, слабопористим, швидко черствіє. Зерно дворядного ячменю є найкращою сировиною для пивоваріння. Пивоварне зерно повинно бути крупним, вирівняним з невисоким вмістом білка (9-12,5%) і з підвищеним вмістом крохмалю (63-65%). Використовують зерно ячменю також для виготовлення заміників кави і солодових екстрактів [16, 32]. Бактеріальний бактеріоз ячменю, спричинений *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* є однією з поширених хвороб ячменю. Симптоми захворювання проявляються у вигляді коричневих водянистих плям із жовтими краями

ореолу на ранній стадії та веретеноподібних, довгастих або неправильних уражень, сірих у центрі, на пізній стадії. У важких випадках відмирають частково листя.

Молекулярні інструменти, такі як секвенування, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), опосередкована петлею ізотермічна ампліфікація та мультилокусний аналіз послідовності (MLSA), були життєво важливими для ідентифікації видів [12,13]. Молекулярна характеристика та генетичне різноманіття популяцій патогенів мають вирішальне значення для розуміння динаміки популяцій патогенів для розробки ефективних стратегій проти спалахів захворювань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ячмінь – біологічні властивості та вимоги до вирощування

Ячмінь посівний (*Hordeum sativum* Jessen) належить до родини тонконогових. Залежно від кількості розвинених плодоносних колосків на членику стрижня колоса, його поділяють на три підвиди: ячмінь дворядний (*H. distichum* L.), багаторядний (*H. vulgare* L.) і проміжний (*H. intermedium* Vav et. Ort.). У дворядного він один, багаторядного — три, проміжного — від одного до трьох на різних уступах стрижня. У виробництві використовують тільки дворядний та багаторядний ячмені, які представлені трьома біотипами: ярими, озимими та дворучками [1].

У процесі життєвого циклу рослини ячменю проходять кілька фаз росту і розвитку: проростання насіння, сходи, кущіння, вихід у трубку, колосіння, цвітіння, формування, і дозрівання зерна.

Проростання насіння. Воно включає три етапи розвитку: поглинання води, наклёвування насіння і початкова стадія росту проростка з формуванням на поверхні ґрунту першого асиміляційного листка. Для проростання потрібно 48–70% води від маси сухого насіння. У сприятливих умовах фаза проростання триває 2–5 днів. Під час проростання ячмінь дуже чутливий до несприятливих факторів середовища — нестачі вологи, низьких температур, надмірного зволоження, щільності ґрунту та ін. Дружність проростання насіння залежить від якості посівного матеріалу. Забезпечення оптимальних умов для дружньої появи сходів є важливим прийомом агротехніки [2].

Сходи. Час від посіву до появи сходів залежить від вологості і температури ґрунту, глибини загортання насіння. Тривалість фази може коливатися від 5 днів до 2–3 тижнів. При проростанні спочатку з'являються зародкові корені, а потім перший зародковий лист, який розгортається над

поверхнею ґрунту. Вирівняне, добре виповнене насіння має високу енергію проростання і дає дружні сходи.

Кущіння. Поява нових пагонів із вузла кущіння означає нову фазу росту рослин — кущіння. Головний вузол кущіння розташований у ґрунті на глибині 2–3 см, залежно від його типу і вологості. Початок кущіння у ячмені зазвичай збігається із появою третього листка. Надалі частина стебел нормально розвивається (особливо перші пагони), інша частина через нестачу вологи, поживних речовин та інших факторів залишається безплідною, формуючи підгони та підсіди. У зв'язку з цим розрізняють продуктивне кущіння, тобто кількість пагонів на рослині з плодоносними суцвіттями, і загальне — кількість усіх пагонів на рослині. Продуктивна кущистість у нормально загущених посівах ячменю ярого у середньому становить 1,5–3. Вищою вона буває у ячмені озимому, у якого кущіння відбувається протягом тривалішого часу — восени і навесні [3].



Рис. 1.1. Зовнішній вигляд [3]

Процес кущіння залежить від факторів навколишнього середовища і регулюється факторами технології культури. Кущистість ячменю залежить від строків сівби, норми висіву насіння, від глибини залягання вузла кущіння,

наявності світла, вологи і поживних речовин в ґрунті. На малородючих землях ячмінь майже не кущиться. Різні сорти ячменю характеризуються неоднаковою кущистістю. З ярих форм більшою кущистістю відрізняється дворядний. Занадто висока кущистість рослин не бажана для пивоварного ячменю. Кушіння у нього необмежене стадійно, і пагоноутворення при надмірному зволоженні ґрунту може продовжуватися до настання повної стиглості перших пагонів. Це призводить до заростання достиглого стеблостою пагонами пізнього кушіння, що ускладнює збирання врожаю [4].

У посушливих районах при нестачі вологи в ґрунті, якщо ячмінь дає багато стебел, значна частина їх буває безплідною. У цих умовах рослини непродуктивно витрачають вологу і поживні речовини, в результаті чого погіршується розвиток головного стебла.

Вихід у трубку. Фаза виходу в трубку настає приблизно через 3–4 тижні після появи повних сходів і розпочинається з росту стебла в довжину, інтенсивного видовження його міжвузлів. Біля основи головного стебла прощупується невелика випуклість — горбик першого стеблового вузла. У цей період закінчується формування колоса, колосків і квіток, рослина найбільш чутлива до нестачі вологи, дефіциту елементів мінерального живлення, світла, що призводить до часткової стерильності і зменшення числа зерен у колосі. Сонячна погода у період виходу в трубку-колосіння сприяє утворенню міцних нагонів і виключає полягання рослин, а також формуванню зерна з нижчою плівчастістю.

Цвітіння. Ячмінь — самозапильна рослина, проте в окремих випадків запилюється і перехресно. Цвітіння ячменю настає раніше, ніж фаза колосіння. Колос цвіте в піхві листка. На ньому повністю сформовані генеративні органи — пиляки і приймочки. Цвітіння починається із середніх колосків і одночасно поширюється на верхні і нижні частини колоса. Найбільш інтенсивне цвітіння і запилення спостерігається у ранкові години. Весь процес запилення триває

6–8 годин. Завершується цвітіння, коли основна маса пиляків, за винятком поодиноких, вже засохла. Цвітіння — важливий період у житті рослини, оскільки до кінця його припиняється ріст вегетативних органів, а в більшості випадків і ріст кореневої системи. В ячмені озимому, на відміну від ярого, цвітіння відбувається після виходу колоса з листкової трубки [5].

Колосіння. Настання фази співпадає із появою остюків із піхви прапорцевого листка. У посушливі роки колос може не виходити, і початок колосіння відзначають при появі остюків колоса. Фаза колосіння у рослин настає через 35–40 днів після початку трубкування. Під час формування колоса умови зовнішнього середовища дуже впливають на довжину колоса, число колосків і продуктивність.

Формування і дозрівання зерна. У процесі дозрівання зерна у ячмені розрізняють три фази стиглості: молочну, воскову і повну. Молочна стиглість настає через 10–15 днів після цвітіння і триває 10–12 днів. До кінця її зерно досягає максимальних розмірів, вологість знаходиться у межах 40–60%. Рослина і зерно мають зелений колір. У цій фазі відмирають нижні листки, а на інших починають з'являтися жовті смуги і плями. При здавлюванні зерна в молочній стиглості виділяється біла рідина. Надалі зерно поступово висихає, і до початку воскової стиглості вологість його знижується майже вдвічі.

У воскової стиглості рослини набувають жовтого кольору, зеленуватий відтінок зберігається тільки у верхніх двох-трьох стеблових вузлах. Вологість зерна знижується до 20–25%. Воно за консистенцією нагадує кульку з воску, легко мнеться і ріжеться нігтем [6].

Після воскової стиглості листя і стебла поступово відмирають, зерно зменшується у розмірі. Вологість зерна становить менше 20%, воно не ріжеться нігтем. У плівчастих форм ячменю зерно міцно склеюється із квітковими лусками, а у голозерних, навпаки, відокремлюється від плівки.

За сухої і жаркої погоди перехід від воскової до повної стиглості відбувається за 3–4 дні. При повній стиглості вологість зерна коливається у межах 14–16%.

Вегетаційний період. Ячмінь ярий є найбільш скоростиглою ярою зерновою культурою. Ранньостиглі сорти ярого ячменю дозрівають протягом 53–60 днів, пізньостиглі — 100–120. Слід пам'ятати, чим триваліший вегетаційний період у ячмені, тим вища урожайність і його пивоварні якості. Після сівби сходи з'являються на 6–9 день. Через 12–15 днів після сходів починається кущіння, а через 30–40 днів — стеблуння рослин. У посівах продуктивна кущистість становить 2–3. Висока кущистість не бажана для пивоварного ячменю. У нього кущіння необмежене стадійно, і пагоноутворення за інтенсивного зволоження може продовжуватися тоді, коли перші пагони досягли повної стиглості. Внаслідок цього в дощову погоду достиглий стеблостій зростає пагонами пізнього кущіння [7].

Колосіння настає на 45–65 день після сходів. Від виколошування до воскової стиглості 30–45 днів триває налив, та досягання зерна займає 20–25 днів.

В індивідуальному розвитку озимий ячмінь проходить такі самі технологічні фази й етапи органогенезу, як і інші хлібні озимі культури. Тривалість фенологічних фаз у нього коротша. Тому і загальний період вегетації коротший. Озимий ячмінь на 9–10 днів досягає раніше озимої пшениці і на 12–14 раніше ячменю ярого. Після сівби сходи ячменю озимого, залежно від погодних умов осені, з'являються на 7–9 день. Після сходів через 13–15 днів розпочинається кущіння рослин, тривалість якого в осінній період вегетації становить близько 30–35 днів. Озимий ячмінь рано навесні швидко йде в ріст і, як наслідок, у нього скорочується вегетаційний період. Весняне відновлення вегетації відбувається, залежно від зони вирощування, у другій декаді березня-першій декаді квітня. Через 10–14 днів розпочинається у

рослин фаза виходу в трубку, тобто переходу рослин із вегетативного до генеративного стану розвитку [8].

Ячмінь озимий швидше розвивається в умовах довгого світлового дня. Він на 6–9 днів швидше досягає, ніж озима пшениця, і на 12–16 днів раніше, ніж ячмінь ярий. У результаті цього в нього ще до настання літньої спеки формується більш виповнене зерно. Вегетаційний період в озимому ячмені, залежно від умов вирощування, становить 230–290 днів.

Швидкість розвитку і характер росту багато в чому визначаються типом і родючістю ґрунту, а також чинниками зовнішнього середовища, основні з яких — світло, температура, волога.

Вимоги до світла. Ячмінь належить до групи культур довгого дня, і для свого розвитку потребує порівняно тривалого освітлення. Тривале проходження вегетативного періоду призводить до активізації кущіння і формування більшої кількості колосків у колосі. Світловий день у південних районах є довшим, ніж у північних, тому на півдні складаються більш сприятливі умови для продуктивності ячменю ярого [9].

Вимоги до температури. Ячмінь ярий є невибагливим до тепла. На різних етапах росту і розвитку рослин вимоги до температури неоднакові. Насіння ячменю проростає за температури 1–3°C, сходи в польових умовах з'являються при 4–5°C і можуть витримувати короточасні заморозки до –6°C, при –6–8°C спостерігається пожовтіння листків. Тривале похолодання та зволоження викликають затримку росту і пригнічення рослин. Активне кущіння і коренеутворення у рослин відбувається за невисокої температури.

Ячмінь озимий є найменш морозо- і зимостійкий серед хлібних озимих культур. Загибель рослин, залежно від сорту, відбувається за низької температури (12–17°C). Ячмінь може гинути навіть за температури мінус 12–13°C, за умов тривалого похолодання, особливо на перезволожених полях. Морозо- і зимостійкість рослин різко падає за умов ранніх строків сівби, коли

восени рослини переростають, фаза кущіння в яких завершується, і рослини починають виходити в трубку.



Рис. 1.2. Зовнішній вигляд [10]

Слабка зимостійкість рослин пояснюється завершенням стадії яровизації до зими, яка триває не більше 30–40 днів. Тому при вирощуванні ячменю озимого, щоб уникнути вимерзання рослин, слід суворо дотримуватися оптимальних строків сівби, щоб фаза кущіння рослин завершувалась не восени, а навесні [10].

Дуже шкодить озимому ячменю різка зміна температур у зимовий і ранньовесняний періоди (глибокі зимові відлиги і ранньовесняні похолодання). Добре витримує високі літні температури (понад 35°C).

Ячмінь досить посухостійкий. Однак через слаборозвинену кореневу систему він гірше переносить весняну посуху. Сприятливою для росту і розвитку рослин у період вегетації є температура 17–18°C. У той же час, ярий ячмінь є жаростійкою культурою. Він негативно реагує на швидке настання високої температури у фазі виходу в трубку, коли формується продуктивність колоса. В період виходу в трубку-колосіння найбільш сприятлива середньодобова температура 20–22°C, дозрівання — 23–24°C. За температури нижче 13–14°C налив і дозрівання зерна затримуються.

Озимий ячмінь відзначається високою посухостійкістю протягом усього періоду вегетації. Транспіраційний коефіцієнт рідко перевищує 400. При нестачі вологи в ґрунті і суховіях більш стійкий проти запалу, ніж інші злакові культури.

Сума ефективних температур, необхідна рослинам ячменю, як і іншим хлібним злакам для реалізації біологічного потенціалу при наливі зерна в період від цвітіння до воскової стиглості становить 700°C [12].

Різкі коливання, а також висока температура в поєднанні з низькою вологістю повітря у період наливання зерна негативно позначаються на виповненості зернівки, при цьому знижується маса 1000 зерен і погіршуються пивоварні властивості ячменю.

Вимоги до вологи. Ячмінь менш вимогливий до води і більш економно витрачає її, ніж пшениця, жито й овес. Транспіраційний коефіцієнт ячменю яркого становить 350–450. Дефіцит вологи під час кушіння знижує продуктивну кущистість, викликає значну асинхронність розвитку пагонів. У результаті слаборозвиненої кореневої системи ячмінь гірше переносить весняну посуху. Багато вологи витрачає він у перші фази росту: кушіння і особливо виходу в трубку-колосіння. У посушливих умовах ячмінь ярий дає вищі врожаї, ніж в умовах підвищеної вологості [13].

Слід пам'ятати, що дефіцит вологи в останні 2–3 тижні вегетації ячменю, окрім втрати врожайності, призводить до суттєвого зниження якості зерна, ячмінь переходить у категорію кормового.

Головна перевага ячменю озимого над ярим полягає у тому, що він має можливість уникнути дефіциту вологи наприкінці літа, що часто спостерігається в основних зонах його вирощування. Завдяки кращому розвитку рослин він легше переносить посуху.

Вимоги до ґрунтів. Ячмінь порівняно з іншими зерновими культурами є найвибагливішою щодо родючості ґрунту культурою. Це зумовлюється

інтенсивним нагромадженням органічної речовини за порівняно короткий час та відносно слаборозвиненою кореневою системою, яка має підвищену чутливість до концентрації солей і у ґрунтовому розчині, особливо в перший період росту та розвитку. Швидкість розвитку і характер росту ячменю багато в чому визначаються типом і родючістю ґрунту [14].

Ячмінь як озимий, так і ярий відзначається високою пластичністю і добре росте на різних ґрунтах. Але кращими є структурні родючі чорноземи типові та опідзолені, каштанові і темно-сірі суглинкові ґрунти з глибоким гумусовим шаром та рН 6,0–7,5.

Супіщані і піщані ґрунти без поліпшення їх (внесення добрив) для обробітку ячменю малоприсадибні. Погано росте ячмінь на кислих ґрунтах, на яких його біологічний потенціал слабо реалізується, урожайність зерна дуже низька. Тому на кислих ґрунтах слід проводити вапнування та гіпсування, що сприяє покращенню їх родючості [15].

1.2. Бактеріальні хвороби ячменю

Базальний бактеріоз (бактеріальна плямистість)

Хвороба поширена в південних та східних областях України. Уражуються листки, стебла, колоски і зерно. На листкових пластинках і піхвах листків утворюються водянисті із часом темні плями. На стеблах загниває їх основа, рослини відстають у рості й розвитку. Найбільш інтенсивний розвиток хвороби спостерігається у період наливання зерна. Колосові лусочки починають буріти або чорніти біля основи з внутрішнього боку, утворюючи темно-коричневі, пізніше чорні плями. На зерні чорніє зародок [16, 17].

Збудником хвороби є бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* Young et al., які, окрім ячменю, уражують пшеницю, суданську траву, просо та інші культурні й дикорослі злаки.

Бактеріоз ячменю спричиняється патоваром *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens*, який є грамнегативною аеробною бактерією, що належить до родини *Pseudomonadaceae*. Цей патоген уражає ячмінь, пшеницю та інші злакові культури, завдаючи значної шкоди врожаю через зниження якості зерна та зменшення врожайності [18].

Симптоми захворювання:

1. На листках:

- Некротичні плями різного розміру та форми, оточені хлорозною облямівкою.
- Ознаки водянистих опіків у вигляді розмитих світло-зелених ділянок.

2. На зерні:

- Ураження базальної частини колоса з появою темно-бурих плям.
- Зміна кольору луски, що стає сіро-коричневою з металевим блиском.
- Деформація зерна, втрата його ваги та погіршення якості.

3. Загальні ознаки:

- Передчасне в'янення рослин.
- Ураження основи стебла, що може призводити до ламкості та вилягання.

Механізм інфекції:

Pseudomonas syringae pv. atrofaciens проникає через природні отвори (продихи) або пошкоджені тканини рослин, колонізуючи міжклітинні простори. Виділяючи ферменти (пектинази, целюлози) та токсини, бактерія руйнує клітинні стінки, порушує метаболізм рослини та викликає розвиток характерних симптомів [19].

Поширення:

Патоген передається через:

- Інфіковане насіння, яке є основним джерелом інокулюму.

- Дощові краплі, вітер і комах, що сприяють поширенню бактерій у полі.
- Залишки уражених рослин, які зберігають патоген у ґрунті до наступного сезону.

Інфекція під час вегетації рослин поширюється механічним шляхом. Основне джерело інфекції — заражене насіння. Збудник зберігається у зараженому насінні до трьох років, додатково може зберігатися в неперегнилих рештках.

При висіві зараженого насіння в ґрунт інфекція дифузно виноситься на колеоптиле і молоді листки рослин.

Сприяють розвитку хвороби — м'яка зима, висока температура повітря повесні, висока вологість у фазу колосіння — молочної зрілості зерна [20, 21].

Плямистий, або чорний бактеріоз

Хвороба проявляється на листках, листових піхвах і колосових лусочках у вигляді темно-коричневих, а пізніше чорних округлих плям, які розкидані по всьому ураженому органі.

У разі розвитку хвороби на колосках часто спостерігається почорніння зерна у вигляді окремих плям. В місцях плям оболонка розм'якшується, а в середині зерна виявляється блідо-рожева рідина. Таке ураження часто називають бактеріозом ендосперму ячменю. Уражені зернівки в колосочках оголюються, вздовж борозенки утворюються тріщинки. Уражене зерно деформується, воно забарвлене в червонувато-коричневий або цегляно-червоний колір. На поперечному зрізі таке забарвлення спостерігається під епідермісом в алейроновому шарі. У вологому середовищі в тріщинках ураженого зерна формується червона бактеріальна маса [22].

За сівби ураженого насіння в ґрунт із них формуються червоні або коричневі проростки, які згодом відмирають. Із слабо інфікованого насіння формуються проростки у вигляді окремих невеличких коричнюватих або

червоно-коричневих плям в основі. У більш пізні фази розвитку рослин часто уражуються нижні листки, на яких виявляються подібні плями, в той час верхні листки передчасно жовтіють, засихають і відмирають. Інколи хвороба проявляється у вигляді загнивання і відмирання як стебла, так і бокових пагонів у місці вузла кущіння [23].

У більшості уражених рослин формуються стерильні колоски, в окремих колосках формується щупле насіння. В уражених листках рослин судини і міжклітинні простори заповнені бактеріями, вони руйнують їх оболонки, в результаті чого клітини відділяються одна від одної. При ураженні насіння набухають серединні пластинки оболонок. Бактерії розчиняють алейроновий шар і гідролізують крохмальні зерна. Інколи відбувається оголення зерна, і вздовж борозенки утворюється тріщина [24].

Збудником хвороби є бактерії *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* Vauterin et al. Окрім ячменю бактерії уражують сорго, суданку, стоколос безостий, різні види пирію. Оптимальна температура для розвитку бактерій знаходиться в межах 20-25°C. Вони стійкі до сонячного проміння. Хвороба інтенсивніше розвивається на рослинах у засушливі роки.

Джерело інфекції — заражене насіння і уражені післяжнивні неперегнилі рештки.

Шкідливість хвороби виявляється в тому, що за сильного її розвитку формуються стерильні колоски або утворюється недорозвинуте щупле насіння, у якого енергія проростання і схожість дуже низькі. Недобір урожаю може досягати до 50% і більше. Стійких до хвороби сортів ячменю поки що не виявлено [25].

1.3. Роль технологій захисту рослин у стійкій сільськогосподарській продуктивності зернових культур

Для захисту посівів від бур'янів, шкідників, вірусів, хвороб рослин та інших небажаних елементів використовуються різноманітні інструменти, товари та тактики [26]. Вони можуть мати катастрофічні наслідки, значно зменшуючи або навіть припиняючи наступні врожаї. Пестициди, також відомі як засоби захисту рослин (СРР), є або природними, або синтетичними сполуками, виробленими людьми, які допомагають фермерам, зменшуючи втрати врожаю від шкідників і хвороб і збільшуючи врожайність з гектара [27].

Відповідно до Majrashi [28], як абіотичні, так і біотичні фактори можуть сприяти зниженню сільськогосподарського виробництва. Температура, забруднення нітратами, доступність води, світла та поживних речовин є прикладами абіотичних факторів [29]. Інші приклади включають ерозію ґрунту [30], зростання засолення ґрунту [31], значне зниження горизонту водоносного горизонту [32] та видалення дерев у результаті збільшення забруднення навколишнього середовища [33]. Три основні групи, на які можна розділити біологічні агенти, це патогенні організми (віруси, гриби та бактерії), паразити тварин (комахи, кліщі, нематоди, равлики, гризуни, птахи та ссавці) та бур'яни (однодольні та дводольні) [34]. Виклики, спричинені зміною клімату, тепер приєдналися до тих, з якими кожен раніше стикався рік за роком [35]. Оскільки зміна клімату та деградація навколишнього середовища в цілому зараз займають важливе місце в глобальному порядку денному, вплив сільського господарства та управління сільським господарством на навколишнє середовище постійно досліджується та вивчається [36], а мета зменшення впливу на навколишнє середовище та клімат продовольчої системи Європейського Союзу (ЄС) стала частиною Зеленої угоди (GD) [37].

Технології захисту сталої продуктивності та управління сільським господарством поділяються на три великі групи, які фактично не мають чітких меж між собою:

- (1) хімічні методи захисту рослин,
- (2) біологічні методи захисту рослин
- (3) механічні методи захисту рослин. техніки захисту

Серед сфер досліджень, які привернули найбільшу увагу, є все більш інтенсивне використання хімічних пестицидів для боротьби зі шкідниками, які, на жаль, можуть залишатися в ґрунті десятиліттями після застосування та становити серйозну небезпеку для здоров'я [38]. Інтегрована боротьба зі шкідниками (ІРМ) і використання рішень біоконтролю зазнають все більшого визнання громадянами та інвестиціями в дослідження як нові альтернативні способи досягнення стійких рішень боротьби [39].

Хімічний контроль є невід'ємною частиною ІСМ, інтегрованої сільськогосподарської системи, заснованої на здоровій комбінації всіх доступних методів боротьби зі шкідниками [40]. Зазнає змін і захист посівів, який нині здійснюється здебільшого за допомогою хімічних засобів. Однак, оскільки шкідники часто атакують посіви, фермери повинні продовжувати боротьбу з ними нижче рівня, за якого активний компонент препарату починає шкодити культурі [41].

Крім того, потреба в постійному зростанні виробництва сприяє поширенню певних хвороб, що вимагає використання додаткових пестицидів. Хімічні речовини накопичуються в екосистемі, а використання пестицидів збільшує шкоду навколишньому середовищу. З практичної точки зору, інші варіанти, такі як прийняття генетично модифікованих видів, забезпечують захоплюючі стратегії контролю, але не без ризику появи генів резистентності патогенів. Ще одна стратегія зменшення забруднення та роздратування, спричинених використанням синтетичних хімічних речовин, — це

використання біологічного контролю за допомогою мікроорганізмів. З метою створення стійкого сільського господарства з меншими екологічними витратами поняття біоконтролю викликало значну наукову, економічну та політичну дискусію [42].

Методи контролю:

1. Агротехнічні заходи:

- Використання сівозміни для зменшення накопичення патогену в ґрунті.
- Своєчасне видалення та утилізація рослинних залишків.
- Уникнення механічного пошкодження рослин під час обробітку ґрунту.

2. Селекція та насінництво:

- Використання стійких до хвороби сортів ячменю.
- Протруєння насіння біопрепаратами або хімічними засобами, наприклад, на основі мідьвмісних препаратів чи бактеріоцидів.

3. Хімічний контроль:

- Обробка посівів бактерицидними препаратами, зокрема на основі стрептоміцину чи оксихлориду міді.
- Використання фунгіцидів з антибактеріальною активністю для комплексного захисту.

4. Біологічні методи:

- Застосування біопрепаратів, що містять антагоністичні бактерії (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*), які пригнічують розвиток *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Проти бактеріальних хвороб ячменю ефективними заходами є дотримання сівозміни, зменшення насичення сівозміни зерновими злаковими культурами, використання здорового насінневого матеріалу, обов'язкове протруєння насіння, збалансоване живлення рослин, своєчасне знищення

злакових бур'янів — резерваторів бактеріальної інфекції, ретельне загортання в ґрунт уражених рослинних решток, вирощування стійких сортів [43].

Проти бактеріальних хвороб ячменю, зокрема базального бактеріозу (*Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*), одним із найефективніших заходів є дотримання сівозміни. Цей агротехнічний прийом передбачає чергування культур на полях, що допомагає знизити накопичення патогену в ґрунті та рослинних рештках [44].

Роль сівозміни в боротьбі з бактеріальними хворобами:

1. **Зменшення інокулюму збудника:** Зміна ячменю чи пшениці на менш сприйнятливі культури (наприклад, кукурудзу, соняшник чи бобові) перериває життєвий цикл бактерій і обмежує їхнє розмноження.

2. **Зниження ризику повторного зараження:** Сівозміна зменшує кількість інфікованих рослинних решток, які залишаються в полі після збору врожаю, що є основним джерелом інфекції для наступних посівів.

3. **Покращення структури ґрунту:** Вирощування різних культур сприяє оздоровленню ґрунту, зменшуючи патогенне навантаження і покращуючи умови для розвитку корисної мікрофлори, яка може пригнічувати збудників хвороб.

4. **Профілактика одночасного ураження кількома патогенами:** Чергування культур з різними хворобами дозволяє уникнути масового накопичення збудників, як бактеріальних, так і грибних [45].

Рекомендації щодо сівозміни:

- Уникати висівання ячменю або інших злакових (пшениці, тритикале, вівса) на одному полі протягом 2–3 років.
- Чергувати злакові культури з бобовими (горох, люпин, соя), олійними (рапс, соняшник) чи коренеплодами (цукрові буряки).

- Забезпечувати оптимальний обробіток ґрунту після збору врожаю для швидшого розкладання рослинних залишків, які можуть містити збудників.

Додаткові заходи:

- Застосування здорового насіння та його обробка антибактеріальними препаратами.

- Внесення органічних і мінеральних добрив для покращення загального стану рослин.

- Використання стійких сортів ячменю, які менш схильні до бактеріальних інфекцій.

Дотримання сівозміни разом із іншими методами інтегрованого захисту рослин є ефективним способом контролю бактеріальних хвороб і збереження врожайності [46].

Проти бактеріальних хвороб ячменю, таких як базальний бактеріоз (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*), обов'язкове протруєння насіння є одним із найефективніших профілактичних заходів. Протруєння дозволяє знищити патогени, що можуть перебувати на поверхні або всередині насіння, і значно знижує ризик зараження рослин на початкових етапах розвитку.

Переваги протруєння насіння:

1. **Знищення патогенів:** Протруйники ефективно знищують бактерії, які знаходяться на поверхні насіння або в його міжтканинних просторах.

2. **Профілактика первинного зараження:** Захищає проростки на стадії, коли вони найбільш уразливі до бактеріальних і грибкових інфекцій.

3. **Зниження поширення інфекції:** Протруєння знижує кількість первинного інокулюму, що запобігає масовому зараженню рослин на полі.

4. **Підвищення схожості насіння:** Протруйники сприяють здоровому проростанню насіння, що покращує його польову схожість і загальну продуктивність [47].

Види протруйників:

1. Хімічні протруйники:

- Препарати на основі міді (*оксихлорид міді, сульфат міді*).
- Антибіотики (*стрептоміцин, тетрациклін*) або засоби на їх основі.
- Синтетичні бактерициди, наприклад, *флуоніколід, тіабендазол*.

2. Біологічні протруйники:

- Препарати на основі корисних бактерій (*Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens*), які пригнічують розвиток патогенів.
- Біофунгіциди, що мають також антибактеріальні властивості.

3. Комплексні протруйники:

- Засоби, які діють як протигрибкові та антибактеріальні препарати, забезпечуючи широкий спектр захисту.

Технологія протруєння насіння:

1. Підготовка насіння: Очистити насіння від домішок і пошкоджених зерен для рівномірного нанесення препарату.

2. Вибір препарату: Вибрати протруйник, рекомендований для боротьби з *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens*.

3. Спосіб нанесення:

- Використання спеціальних машин для протруєння (забезпечують рівномірне покриття).

- Дотримання рекомендованих доз і техніки безпеки.

4. Зберігання протруєного насіння: Зберігати насіння в сухих, добре вентильованих приміщеннях для запобігання втраті ефективності препарату.

Рекомендації щодо використання:

- Протруєння слід проводити лише препаратами, дозволеними в аграрній практиці вашого регіону.

- Застосовувати інтегрований підхід: поєднувати протруєння з іншими методами боротьби (сівозміна, біопрепарати, агротехнічні заходи).

- Регулярно перевіряти ефективність протруйників і чергувати препарати для запобігання розвитку стійкості у патогенів.

Протруєння насіння є основою профілактики бактеріальних хвороб і забезпечує здоровий старт для майбутніх посівів [48].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Виділення бактерій із уражених рослин

Посів з розтертого матеріалу. Для аналізу з досліджуваного зразка на межі ураженої і здорової тканини ячменю попередньо фламбованим і остудженим скальпелем вирізують невеликі шматочки або відбирають насіння із ознаками ураження [34-36].

Зразки промивають впродовж 15 хв проточною водогінною водою. Потім декілька разів ретельно промивають стерильною водогінною водою і переносять у стерильну чашку Петрі.

Шматочок рослинної тканини гомогенізують в стерильній ступці і одну краплю суспензії, що утворилася, переносять в чашку Петрі на поверхню твердого поживного середовища.

Внесений матеріал рівномірно розтирають шпателем по всій поверхні середовища або краплю суспензії петлею засівають густими штрихами від одного краю чашки Петрі до іншого та ставлять в термостат (26- 28°C). Через 4-5 діб відбирають колонії бактерій та визначають їх патогенні властивості щодо рослин.

Метод накопичення. Ретельно промивають листя ячменю стерильно переносять у пробірку з рідким поживним середовищем (м'ясо-пептонний бульйон, середовище Омелянського тощо) і витримують у термостаті до появи ознак росту (частіше 1-3 доби).

Потім попередньо прокаленою на полум'ї пальника петлею беруть одну краплю помутнілого поживного середовища і переносять на поверхню твердого поживного середовища в чашку Петрі, де засівають густими штрихами або розтирають шпателем.

Після вирощування в термостаті відбирають колонії бактерій та визначають патогенні властивості.

Метод вологої камери. Для створення вологої камери використовують чашки Петрі, Коха або порцелянові кювети, на дно яких кладуть шар гігроскопічної вати та покривають двома шарами фільтрувального паперу.

Перед розкладанням насіння підстилки з вати і фільтрувального паперу зволожують стерильною водою. Чашки Петрі, Коха або порцелянові кювети з розкладеними на них насінням в кількості не менше 100 штук поміщають в термостат з температурою, оптимальною для проростання насіння досліджуваної культури (від 20 до 30°C).

Облік результатів здійснюють за ДСТУ 4138-2002. Починаючи з другого-третього дня, систематично ведуть спостереження за проявом ознак бактеріального ураження насіння і паростків.

При цьому звертають увагу на появу крапельок каламутної рідини (ексудату) різного забарвлення, а також на загнивання, ослизнення і непроросле насіння, що може бути наслідком сильного ураження їх бактеріями 14-15.

2.2. Визначення патогенних властивостей ізолятів

На початку ідентифікації збудника потрібно довести патогенність виділених ізолятів, а вже потім вивчати їхні культуральні, фізіологічні і біохімічні властивості, необхідні для визначення видової приналежності.

Патогенні властивості ізольованих бактерій встановлюють **за штучної інокуляції** виду рослин, з якого дану бактерію виділено. Для штучного зараження використовують одно-дводобові культури бактерій, вирощені на твердому поживному середовищі, з яких готують суспензії.

Для визначення здатності бактерій уражувати ячменю рослини інокують бактеріальною суспензією клітин щільністю $10^7 - 10^9$ КУО/мл.

У фазі сходів краплю суспензії наносять на нижню поверхню листової пластинки ячменю стерильною піпеткою, потім крізь краплю роблять легкі

уколи тонкою стерильною голкою, оскільки більшість фітопатогенних бактерій проникають в рослини крізь поранення.

Таблиця 2.1

Шкала визначення агресивності фітопатогенних бактерій за штучної інокуляції ячменю

Агресивність, бали	Симптоми ураження
1 бал	У місці інокулювання утворюється облямівка 1–2 мм бежевого або коричневого кольору
2 бали	На стеблі утворюється бура, білувата або бежева поздовжня пляма, яка розтікається (до 1 см завдовжки). Часто на колоскових лусочках і остюках з'являються бежеві плями-штрихи, іноді остюки повністю білуваті
3 бали	На стеблі розвивається бура, білувата або бежева поздовжня пляма завдовжки понад 1,5 см. На листі утворюються поодинокі коричневі плями-смуги. На колоскових лусочках – дрібні коричневі плями-смуги. Іноді розвивається деформований колос
4 бали	Утворюються поздовжні коричневі чи бурі плями на стеблі у місці інокулювання, розміром декілька сантиметрів і більше. На листках з'являються білуваті водянисті, бурі або бежеві плями, які згодом зливаються. Колос деформується, численні квітки стерильні, на колоскових лусочках розвиваються бурі й коричневі плями. Іноді рослини відстають у рості і не виколошуються. Якщо колос розвивається, то в ньому утворюється плюскле, недорозвинене зерно з темним кінчиком

У фазі виходу в трубку, коли колос в 3–4 міжвузлі, інокуюють уколом шприца у стебло. Результати штучного зараження обліковують після 10-14 діб за 4-х бальною шкалою (табл. 2.1) [34-36].

Для швидкого встановлення патогенних властивостей виділених ізолятів бактерій використовують **реакцію надчутливості (РНЧ)** в листках тютюну [14, 15], яка за введення бактерій в неспецифічні рослини дає змогу відокремити патогенні бактерії від сапротрофних роду *Pseudomonas*.

Для цього добре розвинені листки тютюну (*Nicotiana tabacum L.*) сортів Гавана або Самсун вводять бактеріальну суспензію в стерильній воді, що містить 1×10^7 КУО в 1 мл.

Інокують шприцом з тонкою голкою під епідерміс з нижньої сторони листка в міжклітинний простір. За 1–2 доби після інокулювання патогенними культурами бактерій роду *Pseudomonas* тканина починає відмирати і стає некротизованою.

2.3. Вивчення властивостей та ідентифікація збудників бактеріальних хвороб

Довівши, що ізольовані бактерії здатні спричинювати ураження рослин ячменю і вивчивши їх морфологічні і культурально-біохімічні властивості, приступають до визначення видової належності збудника бактеріозів.

Для цього отримані результати про властивості досліджених бактерій порівнюють з властивостями бактерій, уже описаних в оригінальних статтях як збудники бактеріозів даної рослини та Визначником бактерій Бергі [42, 43].

Діагностика фітопатогенних бактерій роду Pseudomonas – ЛОПАТ-тест. Цей підхід базується на визначенні п'яти ознак: здатності до утворення левану; наявності оксидази; здатності мацерувати рослинні тканини; наявності аргініндегідролази; індукції реакції надчутливості в листках тютюну [34-36].

Здатність до утворення левану. Здатність до утворення левану вивчають за вирощування ізольованих культур на МПА, який містить 5% сахарози.

Синтез левану встановлюють за утворенням на цьому середовищі слизових, круглих та припіднятих у вигляді краплі мукоїдних колоній.

Визначення оксидазної активності. Бактеріальну масу платиновою петлею наносять на фільтрувальний папір, попередньо просочений 1% розчином NN-диметил-п-фенілен-діамін сульфату.

Позитивна оксидазна реакція у вигляді темно-червоного забарвлення бактеріальної маси з'являється за 5–10 с.

Фітопатогенні бактерії роду *Pseudomonas* мають негативну оксидазну активність, чим різняться від сапротрофних бактерій роду *Pseudomonas*, які оксидазоопозитивні [34].

Здатність мацерувати рослинні тканини. Для цього використовують бульби картоплі, промиті у проточній і стерильній воді, а потім поверхнево простерилізовані 96% етиловим спиртом.

Після очищення бульби стерильним скальпелем нарізають скибочки розміром 15×15×10 мм і поміщають їх в чашку Петрі, на дно якої покладений шар вати, покритий фільтрувальним папером і рясно змочений стерильною водою.

В центр кожної скибочки вносять петлею досліджувану культуру бактерій. Через 24–48 год про мацерацію судять за дотиком до скибочки петлею.

Визначення аргініндегідролазної активності. Мікроорганізми, що володіють аргініндегідролазою, утворюють з аргініну NH_3 в анаеробних умовах. Основне середовище (г/л): пептон ферментативний – 1 г; NaCl – 5 г; K_2HPO_4 – 0,3 г; L (+) аргінін HCl – 10 г; феноловий червоний – 0,01 г; агар-агар 15 г; pH = 6,9 – 7,0.

Середовище розливають по 5 мл в стерильні пробірки і засівають уколом культури досліджуваних бактерій. Культурою засівають по дві пробірки, одна з яких покривається стерильною вазеліною олією

Інкубують в термостаті за температури 37°C, результати враховують через 24–48 год. У разі позитивної реакції у бактерій, вирощених в анаеробних умовах, колір середовища змінюється з жовтого на червоний. Визначення аргініндегідролазної активності може бути здійснено також за використання комерційних тест-систем для ідентифікації бактерій.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Ідентифікація та характеристика штамів бактерій

Рослини ячменю були зібрані з кількох полів із підозрілими симптомами бактеріального захворювання з господарств Київської області.

Збудник був виділений з тканин рослин, які мали типові симптоми захворювання.

Виділені ізоляти бактерій культивували на середовищі НА.

Усі штами були відібрані для біохімічної характеристики (табл. 3.1).

Їх результати показали, що морфологічні характеристики 17 штамів були однаковими.

Ці штами вирощували при 27 °С протягом 48 годин, і бактерії утворювали білі круглі колонії діаметром 2–3 мм.

Аналіз біохімічної характеристики 17 штамів були послідовними.

Для характеристики бактерій проводили різні біохімічні тести.

Результати цих тестів такі: утворення левану, гіперчутливість до тютюну та каталаза виявляють позитивні реакції, але м'яка гниль картоплі, оксидаза та гідроліз желатину та ріст при 41 °С мають негативну реакцію (табл. 3.1).

Деякі інші біохімічні тести, такі як аргінін-дигідролаза, глюкоза, маніт та інозит, також показали позитивні реакції, які вказують на те, що штам має класичні характеристики *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*.

Вірулентні ізоляти нами виділено із уражених листків та лусочок ячменю з буро-коричневими, іржаво-бурими, коричнево-бурими, жовто-бурими, бурими, бежевими, бежевими з коричневою облямівкою плямами (рис. 3.1).

Іноді навколо плям поширювався хлороз. Характер розвитку некрозів був різний – від окремих плям різного розміру до ураження всієї листової пластинки.

Некрози були круглі або видовжені, поширювалися вздовж листової пластинки. За морфологією колоній виділені патогенні ізоляти бактерій були сірими, прозорими чи напівпрозорими, плоскими чи з злегка випуклим центром, іноді з концентричними кругами, краї хвилясті.

Таблиця 3.1

Основні біохімічні характеристики ізолятів

Pseudomonas syringae pv. *atrofaciens*

Характеристика		Реакція
Ріст при 41 °С		-
Фарбування за Грамом		-
Гідроліз желатину		-
Нітратредуктаза		-
Утворення левану		+
Оксидаза		-
LORAT- тест	Мацерація картоплі	-
	аргінін-дигідролаза	+
	Реакція надчутливості	+
Утилізація цукрів	Глюкоза	+
	Маноза	+
	Лактоза	+
	Мальтоза	-
	Сахароза	+
	Трегалоза	-

Примітки: Символ «+» означає позитивну відповідь для тестованого штаму, а символ «-» означає негативну відповідь для тестованого штаму.

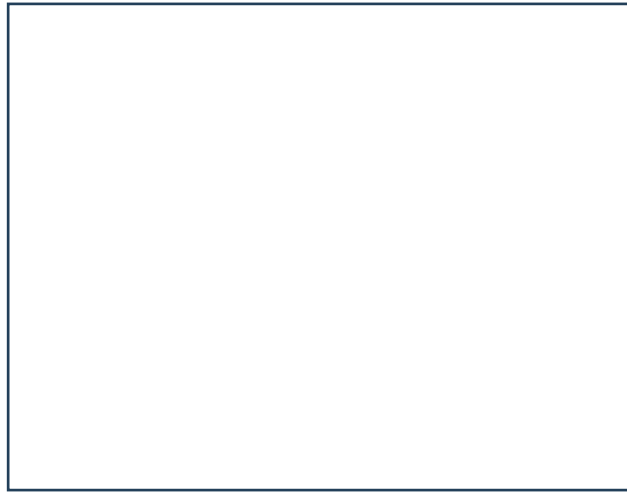


Рис. 3.1. Симптоми базального бактеріозу.

Для прискорення проведення рутинних мікробіологічних аналізів багато фірм пропонують вже готові набори відомих мікробіологічних тестів – так звані тест-системи [15-16]. Одними з найчастіше вживаних тест-систем є API набори фірми Biomerieux та набори MIKRO-LA-TEST® фірми Erba Lachema. Обидві фірми пропонують набори для ідентифікації різних фізіологічних груп бактерій, для ідентифікації фітопатогенних бактерій доцільно використовувати такі набори: API 20 NE (Biomerieux) або НЕФЕРМтест 24 (Erba Lachema) – для неферментуючих грамнегативних бактерій та API 20 E (Biomerieux) або ЭНТЕРО-Рапид 24 (Erba Lachema) – для факультативно анаеробних грамнегативних бактерій. Тест-система API20NE (BioMerieux, Франція) містить 8 загально- прийнятих і 12 асиміляційних тестів, які можна використати для ідентифікації фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*. Стріпи API 20 NE складаються з 20 мікролунок, що містять дегідровані субстрати. За умови внесення в лунки бактеріальної суспензії накопичуються продукти метаболізму, зумовлюючи зміну забарвлення середовища. Результати враховують згідно таблиці обліку результатів.

Результати аналізу біохімічних властивостей штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* на стріпах API20NE (табл. 3.2) співпадають із даними, отриманими класичними методами мікробіології.

Властивості збудника базального бактеріозу ячменю *P.syringae* pv.
atrofaciens за використання API20NE

Умовне позначення	Тест	Штами ізольовані із ячменю
NO ₃	Редукція нітратів	-
TRP	Виділення індолу	-
GLU	Зброджування	-
ADH	Аргініндигідролаза	-
URE	Уреаза	+
ESC	β-глюкозидаза	+
GEL	Желатиназа	+
PNPG	β-галактозидаза	-
Асиміляція		
GLU	D-глюкоза	+
ARA	L-арабіноза	+
MNE	D-маноза	+
MAN	D-манітол	+
NAG	N-ацетил-глюкозамін	-
MAL	D-мальтоза	-
GNT	Глюконат калію	+
CAP	Капріонова кислота	+
ADI	Адипінова кислота	-
MLT	Яблучна кислота	+
CIT	Натрію цитрат трьохзаміщений	+
PAC	Фенілоцтова кислота	-

Примітки: Символ «+» означає позитивну відповідь для тестованого штаму, а символ «-» означає негативну відповідь для тестованого штаму.

При вивченні фізіолого-біохімічних властивостей ізолятів бактерій встановлено, що вони не редукують нітрати, на лакмусовій сироватці утворюють луг, не утворюють сірководню і індолу, варіабельно розріджують желатину.

Всі ізоляти використовують як єдине джерело вуглецевого живлення глюкозу, арабінозу, фруктозу, галактозу, сорбітол, манітол, інозитол, і не використовують лактозу, мальтозу, рамнозу, інουλін, саліцин і дульцитол (табл. 3.2).

Ізоляти бактерій варіабельно використовують сахарозу і рафінозу. Гетерогенність в споживанні деяких джерел вуглецевого живлення патоварів та окремих штамів *P. syringae* відзначають і інші дослідники

3.2. Тести на патогенність ізолятів

Для проведення тестів на патогенність всі інокульовані рослини ячменю показали симптоми захворювання через 10–14 днів після бактеріальної інокуляції.

Спочатку вони показали просочені водою ураження, які з часом поступово перетворилися на хлоротичні плями (рис. 3.2).

Контрольні рослини залишалися здоровими і не мали симптомів захворювання. Крім того, було зазначено, що всі перевірені штами були чутливі до всіх концентрацій стрептоміцину та нечутливі до сульфату міді в концентрації 100 мг/л.

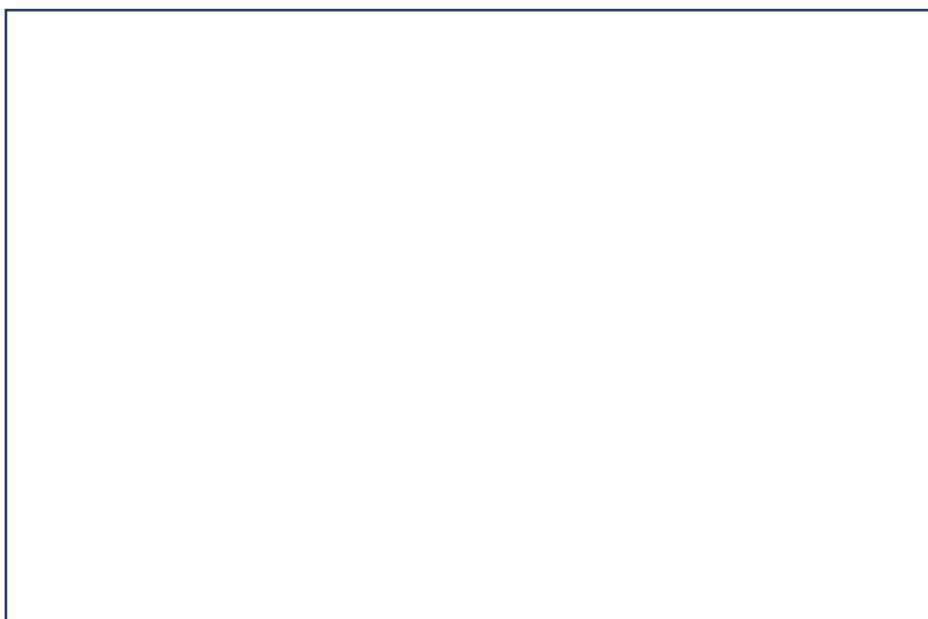


Рис. 3.2. Симптоми за штучного ураження

Необхідно зауважити, що виділені із рослин ячменю із ознаками базального бактеріозу ізоляти мали різну агресивність за штучної інокуляції рослини-хазяїна (табл. 3.3). Більшість ізолятів *P. syringae* характеризувалися високою (15,5% ізолятів) та середньою (62% ізолятів) агресивністю. Низька агресивність щодо ячменю за штучної інокуляції була притаманна 20% виділених ізолятів бактерій.

Таблиця 3.3.

Патогенність ізолятів бактерій, виділених із ячменю

Агресивність ізолятів, в балах	Кількість ізолятів, %
0	4
1	18,5
2	34,5
3	27,5
4	15,5

3.3. Вивчення дії препаратів для захисту посівів ячменю

Досліджували 23 пестициди різного спрямування, дозволені до використання в Україні [12]: альфа супер, альст, віктор, галера, гранстар, грін форт, делан, експрес, енжіо, зенкор 600 SC, карамба, максим, полірам, ридоміл голд МЦ, скор 250 Е, стробі, твікс, топаз, топсін, фалькон, фолікур 250 Еw, фундазол, шавіт. Вплив пестицидів на ріст бактерій визначали їх культивуванням на картопляному агарі (КА) з досліджуваними препаратами в рекомендованих виробниками дозах упродовж 3-х діб за температури 28°C. Відзначали наявність росту колоній на середовищі з відповідними препаратами.

Для перевірки чутливості фітопатогенних бактерій до фунгіцидів використовували препарати в рекомендованій виробником, збільшеній і зменшеній у 10 разів нормі, оскільки в літературі попередніх років є відомості про їх антибактеріальну активність [3, 4].

Також вивчали показники росту бактерій у рідкому поживному середовищі (картопляний бульйон – КБ) з пестицидами, які застосовують для захисту зернових: фалькон, фолікур, альфа супер, твікс, гранстар. По 2 мл суспензії бактерій вносили в 10 мл КБ з препаратами, культивували за температури 28°C.

Через 24 год 0,1 мл нативної та приготовленої методом 10-разових розведень суспензії висівали на чашки Петрі з КА. Контролем була суспензія клітин бактерій, культивованих у КБ без пестициду. Враховували характер росту для нерозведеної суспензії та кількість колоній у розведеній 10 – 6 суспензії.

Після 3-добового культивування на середовищі з препаратами спостерігали ріст культури ізолятів *P. syringae* pv. *atrofaciens* (табл. 3.4). Досліджувані пестициди не виявляли чіткої антибактеріальної дії до цих ізолятів.

Вплив пестицидів на ріст ізолятів *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Група	Назва	Штами ізольовані із ячменю
Інсектицид	Альфа супер	±
Інсектицид	Енжіо	+
Інсектицид	Твікс	±
Гербіцид	Віктор	+
Гербіцид	Галера	±
Гербіцид	Гранстар	+
Гербіцид	Експрес	+
Гербіцид	Зенкор	±
Десикант	Грінфорт	+
Без препарату	Контроль	+

Примітка. + — наявність росту; ± — слабкий ріст

Менш активний ріст ізолятів *P. syringae* pv. *atrofaciens* спостерігався на картопляному агарі (КА) за використання десиканту "Грінфорт". Цей препарат, а також інсектицид "Твікс", виявили лише незначне пригнічення росту ізолятів. Загалом ріст ізолятів був помірно чутливим до пестицидів, таких як "Віктор", "Грінфорт", "Гранстар", "Зенкор", "Експрес", і "Твікс".

Дослідження впливу фунгіцидів показало, що чітку антибактеріальну активність до всіх ізолятів проявляє препарат "Ридоміл Голд" (металаксил М 40 г/кг + манкоцеб 640 г/кг) у рекомендованій, зменшеній і збільшеній у 10 разів дозах. Антибактеріальний ефект також показали "Делан" (дитіанон 700 г/кг) і "Полірам" (метирам 700 г/кг), що пояснюється високим умістом діючих речовин і підкисленням середовища.

Фунгіциди "Шавіт" (тріадименол 15 г/кг, фолпет 700 г/кг), "Карамба" (метконазол 60 г/л) і "Альєт" (фосетил алюмінію 800 г/кг) повністю пригнічували ріст бактерій лише за дози, у 10 разів вищої за рекомендовану. У той же час "Альєт" у стандартній дозі також проявляв високу ефективність проти ізолятів.

Таблиця 3.5

Інгібуюча дія фунгіцидів на ріст ізолятів *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Препарат	Концентрація	Штами ізольовані із ячменю
Делан, полірам, ридоміл голд	0,1*РД	-
	РД	-
	10*РД	-
Максим, стробі	0,1*РД	+
	РД	+
	10*РД	+
Карамба, шавіт	0,1*РД	+
	РД	±
	10*РД	-
Альєт	0,1*РД	+
	РД	±
	10*РД	-
Топаз, топсін М	0,1*РД	+
	РД	+
	10*РД	+
Фалькон	0,1*РД	+
	РД	+
	10*РД	-

Фолікур, скор	0,1*РД	+
	РД	+
	10*РД	±
Фундазол	0,1*РД	+
	РД	+
	10*РД	±

Примітка. РД — рекомендована доза; – — відсутність росту.

Ізоляти *P. syringae* pv. *atrofaciens* були чутливі до трикомпонентного фунгіциду "Фалькон" (тебуконазол 167 г/л, тріадименол 43 г/л, спіроксамін 250 г/л) у рекомендованій дозі, тоді як збільшення концентрації в 10 разів впливало на всі досліджувані ізоляти. Аналогічно діяли препарати "Фолікур" (тебуконазол 250 г/л) та "Скор" (дифеноконазол 250 г/л), які лише затримували ріст бактерій у стандартній і збільшеній дозах.

"Фундазол" (беноміл 500 г/кг) у рекомендованій концентрації слабо пригнічував ріст ізолятів, а підвищення дози спричиняло вплив на всі ізоляти, але не забезпечувало їх повного знешкодження. Тільки збільшені дози "Топазу" (пенконазол 100 г/л) і "Топсіну" (тіофанат метил 700 г/кг) викликали часткове пригнічення росту бактерій.

Фунгіцид "Стробі" (крезоксим-метил 500 г/л) і протруйник "Максим" (флудиоксоніл 25 г/л) не мали впливу на ріст фітопатогенів навіть за 10-разового підвищення концентрації. Це може сприяти зміщенню балансу мікробіоти зерна в бік бактерій.

Речовини з класу триазолів, такі як тебуконазол ("Фолікур", "Фалькон"), тріадименол ("Шавіт"), метконазол ("Карамба"), дифеноконазол ("Скор") і пенконазол ("Топаз"), виявили здатність пригнічувати ріст фітопатогенних бактерій лише за концентрації понад 0,5–1% у поживному середовищі.

ВИСНОВКИ

1. З уражених рослин ячменю виділені ізоляти бактерій, які за морфологічними та біохімічними властивостями ідентифіковані як *P. syringae* pv. *coronafaciens*.

2. Фітопатогенні бактерії демонструють полівалентну чутливість до пестицидів.

3. Інсектициди та гербіциди, дозволені до використання в Україні, не проявляють вираженої антибактеріальної активності щодо збудників бактеріозів ячменю за внесення їх у агаризоване поживне середовище.

4. Серед фунгіцидів антибактеріальний ефект показали препарати "Делан", "Полірам" та "Ридоміл Голд" у стандартній та зменшеній у 10 разів дозі. Препарати "Карамба", "Шавіт" і "Альєт" демонстрували антибактеріальну активність лише за значного підвищення дозування. Інші фунгіциди виявили слабку або відсутню дію на збудників бактеріозів ячменю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Arabi MIE, Jawhar M (2004) Identification of *Cochliobolus sativus* (Spot Blotch) isolates expressing differential virulence on barley genotypes in Syria. *J Phytopathol* 152:461–464
2. Arnst BJ, Martens JW, Wright GM, Burnett PA, Sanderson FR (1979) Incidence, importance and virulence of *Puccinia hordei* on barley in New Zealand. *Ann Appl Biol* 92:185–190
3. Aubert MK, Coventry S, Shirley NJ et al (2018) Differences in hydrolytic enzyme activity accompany natural variation in mature aleurone morphology in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sci Rep* 8:11025
4. Backes A, Guerriero G, Ait Barka E, Jacquard C (2021) *Pyrenophora teres*: taxonomy, morphology, interaction with barley, and mode of control. *Front Plant Sci* 12:614951. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.614951>
5. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* 35:1044–1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>
6. Bhardwaj SC, Gangwar OP, Prasad P, Khan H, Kumar S (2017) Understanding wheat rusts and managing them strategically. In: Gautam HR, Gupta SK (eds) *Diseases of commercial crops in India*. Neoti Book Agency Pvt. Ltd., New Delhi, pp 9–29
7. Cazorla FM, Romero D, Pérez-García A, Lugtenberg BJJ, De Vicente A, Bloemberg G (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *J Appl Microbiol* 103:1950–1959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>

8. Dreiseitl A (2020) Specific resistance of barley to powdery mildew, its use and beyond. A concise critical review. *Genes (Basel)* 11(9):971. <https://doi.org/10.3390/genes11090971>
9. Esmaeel Q, Miotto L, Rondeau M, Leclère V, Clément C, Jacquard C et al (2018) Paraburkholderia phytofirmans PsJN-plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Front Microbiol* 9:2093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02093>
10. Fayez KA, El-Deeb BA, Mostafa N (2017) Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiol Plant* 39: 155. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2452-3>
11. Feichtmeier NS, Walther P, Leopold K (2015) Uptake, effects, and regeneration of barley plants exposed to gold nanoparticles. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:8549–8558
12. Gangwar OP, Bhardwaj S, Singh GP, Prasad P, Kumar S (2018) Barley diseases and their management: an Indian perspective. *Wheat Barley Res* 10(138–150):2018
13. Giraldo P, Benavente E, Manzano-Agugliaro F, Gimenez E (2019) Worldwide research trends on wheat and barley: a bibliometric comparative analysis. *Agronomy* 9:352
14. Gozukirmizi N, Karlik E (2017) Barley (*Hordeum vulgare* L.) improvement past, present and future. In: *Brewing technology*. IntechOpen, London Gray S, Gildow FE (2003) Luteovirus-aphid interactions. *Annu Rev Phytopathol* 41:539–566
15. Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR (2011) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environ Pollut* 159:1551–1559
16. Hawkins NJ, Cools HJ, Sierotzki H, Shaw MW, Knogge W, Kelly SL, Kelly DE, Fraaije BA (2014) Paralog re-emergence: a novel, historically

contingent mechanism in the evolution of antimicrobial resistance. *Mol Biol Evol* 31:1793–1802

17. Hayles J, Johnson L, Worthley, Losic D (2017) Nanopesticides: a review of current research and perspectives. *New Pestic, Soil Sens*, pp 193–225

18. Jiang H-S, Qiu X-N, Li G-B, Li W, Yin L-Y (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *spirodela polyrhiza*. *Environ Toxicol Chem* 33:1398–1405

19. Kah M, Hofmann T (2014) Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environ Int* 63:224–235 Kashyap PL, Kumar S, Srivastava AK (2017) Nanodiagnostics for plant pathogens. *Environ Chem Lett* 15:7–13. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0580-4>

20. Kaur A, Sharma VK, Sharma S (2021) Management of spot blotch of barley: an eco-friendly approach. *Aust Plant Pathol* 50:389–401. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00785-1>

21. Khandelwal N, Barbole RS, Banerjee SS, Chate GP et al (2016) Budding trends in integrated pest management using advanced micro-and nano-materials: challenges and perspectives. *J Environ Manag* 184:157–169

22. Khiyami MA, Almoammar H, Awad YM et al (2014) Plant pathogen nanodiagnostic techniques: forthcoming changes? *Biotechnol Biotechnol Equip* 28:775–785

23. Kim DY, Kadam A, Shinde S, Saratale RG, Patra J, Ghodake G (2018) Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities. *J Sci Food Agric* 298:849–864

24. Kokina I, Plaksenkova I, Galek R, Jermalonoka M, Kirilova E, Gerbreders V, Krasovska M, Sledevskis E (2021) Genotoxic evaluation of Fe₃O₄ nanoparticles in different three barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes

to explore the stress resistant molecules. *Molecules* 26:6710.
<https://doi.org/10.3390/molecules26216710>

25. Konate M, Wilkinson MJ, Mayne BT, Pederson SM, Scott ES, Berger B, et al (2018) Salt stress induces non-cg methylation in coding regions of barley seedlings (*Hordeum vulgare*). *Epigenomes* 2:12.
<https://doi.org/10.3390/epigenomes2020012>

26. Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012a) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on bacopa monnieri (Linn.) wettst. *Plant growth metabolism. Process Biochem* 47:651–658

27. Krishnaraj C, Ramachandran R, Mohan K, Kalaichelvan P (2012b) Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochim. Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 93:95–99

28. Linares M, Jia Y, Sunahara GI, Whalen JK (2020) Barley (*Hordeum vulgare*) seedling growth declines with increasing exposure to silver nanoparticles in biosolid-amended soils. *Can J Soil Sci* 100(3):189–197.
<https://doi.org/10.1139/cjss-2019-0135>

29. Marchal E (1902) *Compo rend. Acad Sci Paris* 135:210 Martens JW, Seaman WL, Atkinson TG (1984) *Diseases of field crops in Canada*. Canadian Phytopathological Society, p 160. ISBN 0-9691627-0-7

30. Maslobrod SN, Mirgorod YA, Borodina VG, Borsch NA (2014) Influence of water dispersed systems with silver and copper nanoparticles on seed germination. *Elect Process Mater* 50(4): 103–112

31. Mathre DE (1997) *Compendium of barley diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN Mathre DE (1982) *Compendium of barley diseases*. American Phytopathological Society, pp 32–34

32. McDonald BA, Linde C (2002a) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124:163–180
33. McDonald BA, Linde C (2002b) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349–379
34. Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Калініченко А.В., Патики В.П. Діагностика і контроль збудників бактеріальних хвороб пшениці. Методичні рекомендації. Київ: ЦП Компринт, 2019. 37 с.
35. Патики ВП, Пасічник ЛА, Гвоздяк РІ, Петриченко ВФ, Корнійчук ОВ, Калініченко АВ, та ін. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень: за ред. Патики ВП. Монографія: в 3-х т. Вінниця: ТОВ Віндрук; 2017. Т.2. 432 с.
36. Експрес діагностика фітопатогенних бактерій і фітоплазм в агроєкосистемах. Методичні рекомендації. В.П. Патики, Л.А. Пасічник, Л.М. Буценко, В.Ф. Петриченко, С.Р. Зубачов, Л.А. Данкевич, та ін: За ред. Патики ВП. Вінниця: «Віндрук»; 2019. 86 с.
37. Singh J, Kaur A, Sharma VK (2020) Evaluation of barley genotypes for resistance against covered smut disease. *Indian Phytopathol* 73:359–360. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00231-0>
38. Sinha K, Ghosh J, Sil PC (2017) 2-New pesticides: a cutting-edge view of contributions from nanotechnology for the development of sustainable agricultural pest control A2—Grumezescu, Alexandru Mihai. In: *New pesticides and soil sensors*. Academic Press, Cambridge, MA
39. Thomas PL (1984a) An albino strain of *Ustilago nuda* from Canada (PDF). *CJPP* 6(2):98–100. <https://doi.org/10.1080/07060668409501567>. Archived from the original (PDF) on 2007-09-29. Retrieved 2007-03-03

40. Thomas PL (1984b) Recombination of virulence genes following hybridization between isolates of *Ustilago nuda* infecting barley under natural conditions (PDF). *CJPP* 6(2):101–104. <https://doi.org/10.1080/07060668409501568>

41. Tombuloglu H, Slimani Y, Tombuloglu G, Almessiere M, Baykal A (2019a) Uptake and translocation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and its impact on photosynthetic genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chemosphere* 226:110–122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.075>

42. Fatmi MB, Collmer A, Iacobellis NS, Mansfield JW, Murillo J, Schaad NW, et al. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens – identification, epidemiology, and genomics. Dordrecht: Springer 978-1-4020-6900-0; 2008.

43. Bergey's manual of systematic bacteriology. Eds Boore DR, Castenholz RW, Editor-in-chief Garrity GM. 2th ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer; 2005. 2, Part B. 1106 p.