

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

06.01 – МКР. 2188 “С” 2023.11.29. 01 ПЗ

**АНДРОЩУК ЯРОСЛАВ ПЕТРОВИЧ**

2024 р.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультету захисту рослин, біотехнологій та екології**

**УДК 632.3:632.93:633.1.324**

**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: Збудник бактеріального опіку пшениці *Pseudomonas syringae* pv.  
*syringae* та контроль його поширення в агрофітоценозах**

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.**

**Андрощук Я.П.**

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.

**З А В Д А Н Н Я**

**ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ  
СТУДЕНТУ**

Андрощуку Ярославу Петровичу

Спеціальність 202 Захист і карантин рослин

Освітня програма Карантин рослин

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: Збудник бактеріального опіку пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та контроль його поширення в агрофітоценозах

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 бактеріального опіку пшениці, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, контроль

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Виявлення збудника бактеріального опіку пшениці
2. Вивчення біологічних властивостей *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
3. Дослідження впливу пестицидів на *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Дата видачі завдання “10” вересня 2023 р.

**Керівник магістерської кваліфікаційної роботи**

**О.І. Статкевич**

**Завдання прийняв до виконання**

**Я.П. Андрощук**

## РЕФЕРАТ

Робота виконана на 51 сторінці, містить 3 розділи, 3 рисунки, 5 таблиць, 48 використаних джерел.

Метою нашої роботи був моніторинг фітопатогенних бактерій в агроценозі пшениці та виділення збудників із симптоматичних рослин, виявлення присутності *P. syringae* на зернових культурах та перевірку їх патогенності.

Патогенні штами *Pseudomonas syringae* викликають бактеріальні захворювання зернових культур у більшості помірних і південних регіонів вирощування. Хоча цей патоген має менше значення порівняно з грибними хворобами, *P. syringae* залишався маловивченим у контексті зернових культур в Україні. Водночас на полях досить часто спостерігалися пошкодження листя та зміни кольору луски, які не характерні для грибних захворювань. З огляду на це, дослідження було спрямоване на визначення присутності *P. syringae* у зернових культурах, вирощених в Україні.

Протягом 2023–2024 років було зібрано 38 зразків рослин, що мали симптоми ураження, зокрема з озимої пшениці та ярої пшениці. Найчастіше ознаки опіку листя та базальної плямистості зерна спостерігалися у посівах ярої та озимої пшениці порівняно з озимим тритикале та ярим ячменем. З листя та зерна, з ознаками ураження фітопатогенами, ізолювали 11 штамів *P. syringae* (6 зі зразків листя та 5 із зерна). Однак лише 5 штамів виявилися патогенними для рослин-господарів під час тестування методом розпилення (SM).

## ЗМІСТ

Вступ .....	5
Розділ 1. Огляд літератури .....	8
1.1. Світове значення пшениці .....	8
1.2. Втрати врожаю зерна в результаті захворювання пшениці, спричинених <i>Pseudomonas syringae</i> .....	11
1.3. Вивчення закономірностей колонізації колосків і насіння ..	15
1.4. Таксономія та характеристика патогенних <i>Pseudomonas</i> .....	16
Розділ 2. Матеріали та методи .....	24
2.1. Виділення бактерій з уражених органів рослин .....	24
2.2. Посів із розтертого матеріалу .....	25
2.3. Метод накопичення .....	25
2.4. Визначення зараженості насіння .....	26
2.5. Перевірка патогенності бактерій .....	26
2.6. Дослідження морфології бактеріальних клітин .....	28
2.7. Тести на патогенність .....	32
Розділ 3. Результати дослідження .....	35
3.1. Виділення фітопатогенних бактерій із уражених рослин зернових культур .....	35
3.2. Визначення патогенності ізолятів, виділених із уражених частин зернових культур .....	37
3.3. Вплив пестицидів на збудника бактеріального опіку пшениці <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	42
Висновки .....	45
Список використаних джерел .....	46

## ВСТУП

Пшениця відноситься до найбільш цінних та високоврожайних зернових культур. Зерно пшениці є найважливішим стратегічним продуктом, що визначає стабільне функціонування аграрного ринку та продовольчу безпеку країни. По посівних площах вона посідає перше місце у світі серед зернових культур. Але в окремі роки велику шкоду посівам пшениці завдають збудники бактеріальних хвороб, які зменшують кількість вирощеної продукції та знижують її якість. Останні п'ять років відзначається прогресуюча тенденція захворювання пшениці бактеріальними хворобами [5]. Використання інтенсивних технологій вирощування зернових культур потребує застосування високоякісних органічних та мінеральних добрив, вміст та співвідношення елементів живлення у яких мають максимально відповідати біологічним потребам культур та агрохімічним властивостям ґрунтів. Пшениця висуває високі вимоги до родючості ґрунту, дає стійкі врожаї в основних зонах її вирощування та відрізняється високою чутливістю до внесення добрив. Це тим, що її коренева система має невисоку здатність засвоювати поживні речовини з важкодоступних сполук ґрунту. Відомо, що для цієї культури особливо важливі азот та фосфор, що визначають кількість урожаю та його якість. Але як впливають агротехнічні прийоми на ураженість пшениці фітопатогенними бактеріями, не досліджено.

Зернові рослини відіграють важливу роль у сільському господарстві України та всього світу. Патогенні бактерії можуть знизити врожайність зерна, особливо коли умови навколишнього середовища сприятливі для розвитку епідемії, а рослини-господарі чутливі до збудника.

*Pseudomonas syringae* van Hall 1902 є гетерогенним широко поширеним бактеріальним фітопатогеном, який підрозділяється на понад 60 патоварів на основі патогенних характеристик, 9 геномовидів, визначених гібридизацією ДНК-ДНК, і 13 філогенетичних груп, визначених аналізом мультилокусної послідовності (Baltrus et al., 2017). Опіки листя та прикоренева луска зернових культур викликаються *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atrofaciens* [10].

*P. syringae* pv. *syringae* може інфікувати широкий спектр господарів однодольних і дводольних рослин (Pićić et al., 2016; Choi et al., 2017). *P. syringae* pv. *atrofaciens* вражає переважно однодольні рослини та вважається одним із основних бактеріальних збудників зернових культур у Європі (Пасічник, Буценко, 2018); однак він також може спричиняти плямистість листя дводольних бур'янів, таких як *Sonchus arvensis* і *Papaver argemone* (Буценко та ін., 2021). Симптоми на листі, викликані *P. syringae* pv. *syringae* з'являються при посадці до раннього колосіння. На прапорцевому листі та двох листках під ним утворюються численні дрібні плями, просочені водою. Протягом двох-трьох днів плями розширюються і часто зливаються у великі, сірувато-зелені та висихлі ділянки, які протягом тижня стають некротичними та стають світло-коричневими або білими (Valencia-Botín, Cisneros-López, 2012). Листя, уражені *P. syringae* pv. *atrofaciens* показують невеликі, темні та просочені водою плями, які мають тенденцію до збільшення та стають жовтими та, нарешті, коричневими, коли вони некротичні. Луски пшениці, уражені *P. syringae* pv. *atrofaciens* мають тьмяну, коричнево-чорну область (плями або смуги) біля основи кожної луски, що покриває ядро. Плями з'являються біля основи луски, тоді як смуги можуть простягатися більше ніж на половину луски (Kazempour et al., 2010). Хворе насіння на базальному кінці має темно-коричневі ураження і є найважливішим резервуаром патогенів. Симптоми також можуть виникати у верхній частині стебла, значно вище вузлів (Duveiller et al., 1997).

Діагностика бактеріальних захворювань за вираженими симптомами складна, оскільки їх можна сплутати з тими, що спричинені деякими грибами чи іншими біотичними та абіотичними факторами (Morris et al., 2013; Xin et al., 2018). Тому цілком імовірно, що ці захворювання можуть бути більш поширеними та важливішими, ніж прийнято вважати. Загалом, порівняно з іншими рослинними патогенними бактеріями, патовари *P. syringae* відзначаються як найбільш поширені та добре вивчені (Tripathi, 2017; Xin et al., 2018). Проте тих, що спричиняють опіки листя та плямистість базальної

луски пшениці та інших зернових, обмежено, і доступна лише мізерна інформація, особливо про втрати врожаю та епідеміологію захворювання (Valencia-Botín, Cisneros-López, 2012; Butsenko et al., 2021). *P. syringae* pv. *atrofaciens* більш ретельно вивчався з 80-х років 20-го століття в Європі та був відзначений як важливий збудник базальної лускоподібної плямистості пшениці в Росії, Україні, Болгарії, Італії, Німеччині, Новій Зеландії та Ірані (Matveeva et al., 2008; Kazempour) та ін., 2010; Буценко та ін., 2021). У Німеччині цей збудник регулярно виділяють з 1986 р., а епіфітні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* часто виявляли на насінні та рослинах пшениці та ячменю (Kietzel, Rudolph, 1997). Популяції епіфітів є первинним інокулятом для зараження рослин і можуть завдати значної шкоди рослинам за сприятливих погодних умов (Xin та ін., 2018; Буценко та ін., 2021). За таких умов втрати врожаю можуть сягати до 50% (Valencia-Botín, Cisneros-López, 2012).

В Україні грибним захворюванням зернових приділялося багато уваги, а дослідження бактеріальних захворювань, викликаних *P. syringae*, охоплювали лише деякі бобові, кісточкові та горіхи (Vasinauskiene, 1997; Vasinauskienė et al., 2008; Konavko et al. ін., 2014). Як збудник злаків *P. syringae* не досліджувався не тільки в Україні, а й у сусідніх країнах. Імовірно бактеріальні захворювання зернових не досліджені досконально, оскільки вони виникають спорадично і лише за надзвичайно вологих умов навесні чи влітку (Glinushkin et al., 2016; Xin et al., 2018). Останнім часом на вирощених в Україні зернових рослинах часто виявляють нетипові для грибкових уражень, опіки листя та зміну кольору луски, що свідчить про зараження *P. syringae*.

Тому метою нашої роботи був моніторинг фітопатогенних бактерій в агроценозі пшениці та виділення збудників із симптоматичних рослин, виявлення присутності *P. syringae* на зернових культурах та перевірку його патогенності.



## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Світове значення пшениці

Пшениця (*Triticum spp.*) є одним із чотирьох основних продуктів харчування для споживання людиною, поряд із рисом (*Oryza sativa*), кукурудзою (*Zea mays*) та картоплею (*Solanum tuberosum*) [1, 2], займаючи перше місце за площею оброблюваної землі та врожайністю, а також забезпечуючи найвищий відсоток білка та вуглеводів [3-5]. Зерно пшениці використовується для виробництва борошна, хліба, макаронних виробів, кондитерських виробів, а також інших продуктів, що становлять основу раціону багатьох культур.

Завдяки високому вмісту вуглеводів, пшениця забезпечує організм енергією, а її білок, глютен, сприяє формуванню еластичної структури тіста, що робить її незамінною в кулінарії. Крім того, пшениця багата на вітаміни групи В (особливо тіамін і ніацин), мінерали (залізо, магній, фосфор) та клітковину, що сприяє здоров'ю травної системи.

Завдяки здатності адаптуватися до різних кліматичних умов, пшениця вирощується майже на всіх континентах, крім Антарктиди. Вона є основною сільськогосподарською культурою в країнах із помірним кліматом, таких як Україна, США, Канада та Франція. За даними ФАО, пшениця займає провідне місце серед культур за обсягом виробництва та торгівлі на світовому ринку.

Окрім харчового використання, пшениця також застосовується у виробництві кормів для тварин, біопалива та промислових матеріалів, таких як крохмаль. Ця універсальність робить пшеницю важливим елементом глобальної продовольчої безпеки та економіки.

Хоча пшениця вважається в першу чергу їжею для людей і високо цінується за її хлібопекарські властивості, вона також вирощується на корм тваринам і для промислової обробки [4].

У багатьох країнах значна частина урожаю пшениці, особливо фуражних сортів, використовується для виробництва кормів для великої рогатої худоби,

свиней, птахів та інших тварин. Пшениця є висококалорійним кормовим продуктом, багатим на вуглеводи та білки, які сприяють швидкому росту та підвищенню продуктивності тварин.

Фуражна пшениця, яка не відповідає стандартам харчової якості, зокрема через пошкодження шкідниками або невідповідний хімічний склад, зазвичай використовується у виробництві комбікормів. Під час обробки зерно змішується з іншими компонентами, такими як кукурудза, соєвий шрот і вітамінні добавки, для створення збалансованого раціону.

У промисловій сфері пшениця є цінною сировиною для виробництва:

1. Крохмалю – який використовується у харчовій, текстильній, паперовій та фармацевтичній промисловості.

2. Етанолу – зерно пшениці служить сировиною для виробництва біопалива, яке використовується як екологічно чиста альтернатива викопному паливу.

3. Глютену – важливого компонента у виробництві харчових продуктів, наприклад, у створенні безглютенових замінників м'яса.

4. Висівок – побічного продукту переробки зерна, який використовується як корм для тварин або добавка до продуктів із високим вмістом клітковини.

У деяких випадках пшениця використовується для виготовлення біорозкладних матеріалів, таких як пакувальні матеріали або екологічні пластики. Її універсальність робить її не лише основною продовольчою культурою, але й важливим ресурсом у сільськогосподарській та промисловій економіці.

За оцінками, міжнародний попит на пшеницю зростає приблизно на 2% на рік [4, 6]. Світове виробництво перевищує 689 млн тонн із 25 країн-виробників [4, 7].

## 1.2. Втрати врожаю зерна в результаті захворювання пшениці, спричинених *Pseudomonas syringae*

Існує близько 50 патоварів, описаних для *P. syringae* і принаймні дев'яти різних видів або геномовидів на основі гомології ДНК [9, 10].

Штами *Pseudomonas*, що спричинюють хворобу пшениці «базальна плямистість луски», класифікуються як *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch) [11], тоді як ті, що викликають опіки листя, згруповані під *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902.

У багатьох країнах, включаючи Аргентину, Австралію, Нову Зеландію, Італію, США, Канаду, Південну Африку та Пакистан, поява *P. syringae* pv. *atrofaciens* та/або pv. *syringae* повідомлялося лише один раз [12, 13].

Захворювання, спричинені *P. syringae* pv. *syringae* на пшениці відомі як відмирання або опіки листя. Ця бактерія викликає плями, просочені водою, на розростаються листках, які стають некротичними та змінюють колір із сіро-зеленого на жовто-білий. Некротичними можуть бути всі листя. У періоди з великою кількістю опадів білі краплі, що містять клітини *P. syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch) може бути видимим, спричиняючи плямистість базальної луски [13].

*P. syringae* pv. *japonica* (McCulloch) може спричинити тьмяні, коричнево-чорні знебарвлені ділянки біля основи кожної луски, що покриває ядро, а також плями або смугасті ділянки на вузлах.

Нарешті, *Pseudomonas cichorii* викликає меланоз стебла або гомілки, а *Pseudomonas fuscovaginae* викликає чорну гниль у оболонці пшениці.

У пшениці, незважаючи на те, що основна увага приділяється вивченню захворювань, викликаних грибками, дослідження бактеріальних захворювань, таких як *P. syringae* pv. *syringae* мало.

Це затримало розробку конкретної інформації про вплив цієї групи збудників. Ці бактерії вважаються важливими для зернових через їх широкий діапазон носіїв і тому, що деякі з них передаються через насіння.

Захворюваність *P. syringae* pv. *syringae*, як правило, є спорадичним, а їхнє географічне поширення обмежене [14-16].

Досліджень бактеріальних захворювань пшениці мало, тому доступна лише обмежена кількісна інформація про, наприклад, втрату врожаю та епідеміологію захворювань, особливо в польових умовах. *P. syringae* subsp. *syringae* вважається унікальним серед *P. syringae* патоварів за його здатність викликати захворювання принаймні 180 видів рослин із кількох неспоріднених родів [17].

Захворювання, спричинені цією бактерією, хоча й класифікуються як малозначущі [15], зменшили врожайність більш ніж на 50% у Німеччині [18]. Максимальна шкода зазвичай пов'язана з умовами високої вологості та низької температури [15]. Бактерії спочатку інфікує луску, листок, палею та зернівку, а потім вторгається та розмножується в міжклітинних просторах тканин насіння [19].



Рис. 1.1. Симптоми бактеріального опіку листя озимої пшениці [20].

Після прикріплення бактерії виділяють ферменти та токсини, які пошкоджують клітинні стінки та дозволяють патогену проникати глибше в тканини рослини. Вони використовують природні отвори (наприклад,

продихи) або механічно пошкоджені ділянки для проникнення. Потрапивши всередину рослини, *Pseudomonas syringae* колонізує міжклітинні простори, де умови сприятливі для їх розмноження. У цих просторах бактерії активно споживають поживні речовини, які виділяються з рослинних клітин, що піддаються руйнуванню під дією бактеріальних екзоферментів, таких як пектинази та целюлози.

Розмноження бактерій у міжклітинних просторах супроводжується:

1. Утворенням бактеріальних біоплівок, які захищають патоген від дії імунної системи рослини та несприятливих умов навколишнього середовища.
2. Виділенням фітотоксинів (наприклад, сирингіна), які викликають некротичні ураження та сприяють подальшому поширенню інфекції.
3. Порушенням водного балансу рослини через закупорку судинних тканин, що призводить до в'янення та передчасного відмирання заражених органів.

В тканинах насіння бактерії залишаються життєздатними навіть після дозрівання зерна, що дозволяє патогену зберігатися і передаватися наступним поколінням рослин через заражений посівний матеріал. Це є однією з основних проблем у боротьбі з базальним бактеріозом, оскільки інфіковане насіння стає джерелом інокулюму в новому сезоні.

Для ефективного контролю захворювання рекомендується:

- Використання здорового посівного матеріалу.
- Протруєння насіння антибактеріальними препаратами.
- Впровадження сівозміни та агротехнічних заходів, які знижують ризик накопичення інфекції.

Розуміння процесу інфекції *Pseudomonas syringae* є ключовим для розробки стратегій інтегрованого захисту рослин.

У полі втрати врожаю зерна, спричинені *Pseudomonas syringae*, залежать від багатьох факторів, включаючи поширеність і тяжкість захворювання, агресивність збудника, умови навколишнього середовища (особливо

температуру та вологість), стійкість або чутливість хазяїна та фенологічна стадія, на якій відбувається зараження.

*P. syringae* pv. популяції *syringae* майже завжди присутні епіфітно на поверхнях рослин пшениці та інших господарів, що вказує на те, що погодні умови мають більше значення для спалахів хвороби, ніж наявність інокулята [13]. На міжнародному рівні втрати врожаю коливаються від 5 до 50% [15, 20], а в Мексиці — від 5 до 20% [21]. Крім того, було показано, що зараження насіння є дуже важливим в епідеміології захворювання [12, 22].

Наприклад, насіння, інокульоване *P. syringae* pv. *atrofaciens* і *P. syringae* pv. *syringae* були висіяні, і ці бактерії згодом були знайдені в листових пластинках отриманих саджанців, що свідчить про передачу через насіння [23].

Це демонструє необхідність гарантувати, що насіння пшениці не містить патогенних для рослин бактерій, тому що, незважаючи на те, що всі умови, необхідні для виникнення надзвичайної шкоди в полі, є незвичайними, відправлення зараженого насіння може поширити хворобу в регіони, де вона не була поширена. Було оцінено багато методів інокуляції розсади та розроблено кілька показників для оцінки агресивності штамів *P. syringae* pv. *syringae*.

Виробництво повітряної біомаси (суха вага) через 34 дні після появи сходів є найкращим показником для виявлення відмінностей між штамми *Pseudomonas*, методами інокуляції та їх взаємодією [22], тому це, здається, альтернативний метод оцінки агресивності, коли насіння обприскують або просочують бактерією вакуумом.

Загалом *P. syringae* pv. *syringae* знижує висоту рослин пшениці, урожай насіння та компоненти врожаю, а також ріст більшості органів у сортів пшениці Seri M82 та Rebeca F2000. Коли ці бактерії уражують, стебла є переважаючими органами поглинання, а листові пластинки та волоті є переважаючими органами-джерелами. На закінчення було висловлено припущення, що дані про хвороби пшениці, викликані цією бактерією,

повинні доповнювати фізіологічні змінні культури для оцінки та пояснення впливу бактеріальних захворювань [24].

### 1.3. Вивчення закономірностей колонізації колосків і насіння

Дослідження, проведені Fukuda et al. [19] щодо гістології інвазії насіння пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* вказують на те, що бактерії спочатку колонізують лемму і палею, потім продовжують вторгнення в funiculus caryopsis, а потім розмножуються в міжклітинних просторах. Послідовність і терміни зараження тканин насіння детально не пояснені. Репортерні гени можна використовувати для виявлення змін у тканинах рослин. Принцип їх використання полягає в тому, що кількісно визначена кількість білка є мірою експресії генів. Репортерний ген для ферменту  $\beta$ -глюкуронідази (GUS) використовувався в різних видах рослин, але не повідомлялося про його використання для визначення моделей колонізації насіння патогенними бактеріями [25]. Експерименти з геном GUS вимагають деструктивного відбору зразків, що унеможливує проведення кількох аналізів на одному і тому ж шматку тканини [26]. Використання зеленого флуоресцентного білка (GFP) усуває деякі недоліки виявлення генів GUS. GFP вперше був виявлений у 1962 році [27] і був виділений у своїй природній формі з медуз (*Aequorea victoria*). Він характеризується як поліпептид 27 кДа, який перетворює синю хемілюмінесценцію  $\text{Ca}^{2+}$  плюс екворин (природно люмінесцентний білок) у синє світло [28]. Основна перевага використання GFP перед GUS полягає в тому, що його можна виявити недеструктивним шляхом у живих тканинах і навіть в окремих клітинах, тоді як активність ферменту GUS часто виражається у вигляді плям навколо тканини, що знаходиться під спостереженням, а також у трансформованих клітинах [29]. У рослинній патології використання гена *gfp* зростає. Наприклад, Sexton and Howlett [30] визначили, що гриб *Leptosphaeria maculans* може колонізувати та викликати симптоми саме в сім'ядолях і стеблах *Brassica* spp., а Du et al. [31]

з змогли ідентифікувати та кількісно визначити накопичення афлатоксинів у кукурудзі, викликане *Aspergillus flavus*.

У насінні пшениці, інокульованому *Streptomyces* sp. трансформований за допомогою гена *gfp*, Кумбс і Франко [32] визначили, що патоген викликає інфекцію в тканині ембріона, ендосперму і корінця. Подібним чином дослідження з патогенами, позначеними геном *gfp* у дріжджах, дозволили візуалізувати експресію та підтвердити корисність гена *gfp* як репортера у вивченні захворювань рослин [33, 34]. Ми використовували репортерні гени *gfp* для виявлення мікроорганізмів і вивчення біологічних властивостей [23]. Схема колонізації *P. syringae* pv. *syringae* у пшениці було нещодавно з'ясовано [23]. Один штам цієї бактерії був трансформований для експресії GFP у пшениці. GFP-мічені бактерії показали сильну експресію GFP при візуалізації під зеленим світлом. Через 6 год він виявлявся в алейроновому шарі, а через 24 год – у клітинах ендосперму. Через 36 годин він був близький до складки, а через 48 годин він виглядав у вигляді плям у деяких клітинах тканини ембріона.

#### **1.4. Таксономія та характеристика патогенних *Pseudomonas***

Рід *Pseudomonas sensu lato* було поділено на основі гібридизації рРНК-ДНК, порівняння послідовності 16S рРНК і мультилокусного типування послідовності [35-38]. Фітопатогенні флуоресцентні представники *Pseudomonas* згруповані в рід *Pseudomonas sensu stricto*, в межах групи подібності рРНК I для підкласу  $\gamma$ -*Proteobacteria* [39]. Більшість представників цієї групи є сапрофітами *Pseudomonas* і є метаболічно та фізіологічно універсальними [40]. Ревізії диференціації роду *Pseudomonas* детально представлені Kersters et al., Silva-Rojas і Anzai et al. які повідомили про п'ять груп гомології рРНК, підкресливши їх важливість у фітопатогенних групах I, II, III та V [35, 41, 42]. *Pseudomonas syringae* генетично різноманітний і поділяється приблизно на 50 патоварів і принаймні дев'ять геномовидів на основі патогенності та діапазону хазяїв і гомології ДНК [10, 43, 44]. Це



бацилярна бактерія, негативна, рухлива з полярними джгутіками і строго аеробна. У твердому середовищі King B він виробляє зелений флуоресцентний пігмент під УФ-опроміненням, що призводить до попереднього випадку групування [45]. Характеристику та ідентифікацію цього виду, на додаток до біохімічних тестів, можна здійснити за допомогою комерційних систем, таких як API-50CH, 50AO та 50AA, BIOLOG (Biolog Inc., Hayward, США) та Biotype 100 (bioMérieux, La Balme). Les Grottes, France) використовувався для визначення здатності ізолятів асимілювати або окислювати широкий спектр органічних сполук у присутності солі тетразолію. Однак із застосуванням таких засобів досі не вдалося відрізнити *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *japonica*, через що необхідно покладатися на результати молекулярних тестів.

У цьому сенсі для ідентифікації патогенних бактерій, зокрема роду *Xanthomonas* і, техніка повторних послідовностей (REP-PCR) була успішно використана для ідентифікації *X. translucens* [46] та інших видів цього роду [37, 38]. Аналіз метилового ефіру жирної кислоти (FAME) був застосований для розрізнення *Pseudomonas syringae*, але він не був остаточним для цього роду [45]. На даний момент жодне дослідження з використанням повторюваних послідовностей, таких як аналіз ERIC і REP або FAME, не використовувалося для розрізнення патогенів *Pseudomonas syringae*, що впливають на пшеницю в усьому світі. Інші молекулярні інструменти, такі як аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів генома (RFLP) ДНК за допомогою гель-електрофорезу в імпульсному полі та ELISA-PCR, також використовувалися для геномної характеристики бактерій на пшениці [15]. Пряме секвенування продукту ампліфікації малої субодиниці рибосомної 16S рРНК є дискримінаційним методом, який швидко ідентифікує штами прокаріотів [39, 40]. Ця субодиниця є характеристикою, універсально поширеною серед усіх прокаріотичних видів [41]. Відповідна послідовність порівнюється з базою даних GenBank (Національний центр біотехнологічної інформації, NCBI), яка встановлює філогенетичні зв'язки та призводить до

швидкої ідентифікації. Наше розуміння еволюції патогенезу рослин у штамів *Pseudomonas syringae* ще більше покращилося завдяки секвенуванню геному наступного покоління [42]. Можна ідентифікувати *P. syringae* pv. *syringae* на основі ампліфікації та секвенування малої субодиниці 16 рРНК. Однак результати недоступні для застосування молекулярних маркерів, таких як RAPD-PCR, для характеристики та ідентифікації патогенних для рослин штамів бактерій у пшениці [43].

*Pseudomonas syringae* — паличкоподібна грамнегативна бактерія з полярними джгутіками. Як патоген рослин, він може інфікувати широкий спектр видів і існує як понад 50 різних патоварів, усі з яких доступні дослідникам із міжнародних колекцій культур, таких як NCPPB, ICMP та інші. *Pseudomonas syringae* є членом роду *Pseudomonas*, і на основі аналізу 16S рРНК його віднесено до групи *P. syringae*. Він названий на честь дерева бузку (*Syringa vulgaris*), з якого вперше був виділений. Філогеномічний аналіз 494 повних геномів усього роду *Pseudomonas* показав, що *P. syringae* не утворює монофілетичний вид у строгому сенсі, а більш широку еволюційну групу, яка також включала інші види, такі як *P. avellanae*, *P. savastanoi*, *P. amygdali* та *P. cerasi*. Тести *Pseudomonas syringae* негативні на активність аргінін-дигідролази та оксидази та утворюють полімерний леван на поживному агарі з сахарозою. Багато, але не всі, штами виділяють ліподепсинапептидний рослинний токсин сирингоміцин, і він завдячує своїм жовтим флуоресцентним виглядом при культивуванні *in vitro* на середовищі Кінга В продукції сидерофора піовердину. *Pseudomonas syringae* також виробляє білки, активні до зародження льоду (INA), які викликають замерзання води (в рослинах) при досить високих температурах (від -1,8 до), що призводить до пошкодження. З 1970-х років *P. syringae* вважали атмосферним «зароджувачем біологічного льоду», а повітряні бактерії виступали в якості ядер конденсації хмар. Останні дані свідчать про те, що цей вид відіграє більшу роль, ніж вважалося раніше, у створенні дощу та снігу. Вони також були знайдені в ядрах градин, що сприяє біоосадженню. Ці білки INA також використовуються для

виготовлення штучного снігу. Патогенез *Pseudomonas syringae* залежить від ефекторних білків, що виділяються в рослинну клітину системою секреції III типу бактерій. У *P. syringae* виявлено майже 60 різних родин ефекторів III типу, кодованих генами хмелю. Ефектори типу III сприяють патогенезу головним чином через їх роль у придушенні захисту рослин. Завдяки ранній доступності послідовності генома для трьох штамів *P. syringae* та здатності вибраних штамів викликати захворювання добре охарактеризованих рослин-господарів, включаючи *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* та помідори, *P. syringae* став представляти важливу модельну систему для експериментальної характеристики молекулярної динаміки взаємодії рослин і патогенів. Бактеріальна цятка на помідорі в північній частині штату Нью-Йорк.

*Pseudomonas syringae* зимує на заражених тканинах рослин, таких як ділянки некрозу або гуммозу (сік, що сочиться з ран на дереві), але також може зимувати в здорових на вигляд тканинах рослин. Навесні вода з дощу або з інших джерел змиє бактерії на листя/квітки, де вони будуть рости та виживати протягом літа. Це епіфітна фаза життєвого циклу *P. syringae*, де він буде розмножуватися та поширюватися, але не спричинить захворювання. Як тільки він потрапляє в рослину через продихи листя або некротичні плями на листках або деревних тканинах, хвороба починається. Потім патоген буде використовувати і рости в міжклітинному просторі, викликаючи плями на листі та виразки. *P. syringae* також може виживати при температурах трохи нижче нуля [39].

**Епідеміологія.** Захворюванням, спричиненим *P. syringae*, як правило, сприяють вологі прохолодні умови (оптимальна температура для захворювання становить близько 12 °C), хоча це може змінюватись залежно від задіяного патовару. Бактерії, як правило, переносяться насінням і поширюються між рослинами під час дощу. Хоча це патоген рослин, він також може жити як сапротроф у філосфері, коли умови несприятливі для

захворювання. Деякі сапротрофні штами *P. syringae* використовувалися як біоконтроль проти післяжнивних гнилей [40].

**Геноміка.** На основі порівняльного геномного та філогеномічного аналізу 494 повних геномів усього роду *Pseudomonas*, *P. syringae* не утворює монофілетичний вид у строгому сенсі, а ширшу еволюційну групу (всього 34 геноми, організовані в 3 підгрупи), яка включає інші види також. Основний протеом групи *P. syringae* складався з 2944 білків, тоді як кількість білка та вміст GC у штамів цієї групи коливався між 4973 та 6026 (середнє: 5465) та між 58 та 59,3% (середнє: 58,6%) відповідно.

**Контроль.** На даний момент не існує 100% ефективного способу знищення *P. syringae* на полі. Найпоширенішим способом боротьби з цим збудником є розпилення бактерицидів із сполуками міді або інших важких металів, які можна комбінувати з фунгіцидами чи іншими хімікатами для боротьби зі шкідниками. Хімічна обробка фіксованою міддю, такою як Бордо, гідроксид міді та сульфат міді, використовується, щоб зупинити поширення *P. syringae* шляхом знищення бактерій, поки вони перебувають у стадії епіфіту на листках або деревних частинах дерев – незважаючи на стійкість *P. syringae* штами існують. Обприскування антибіотиками, такими як стрептоміцин і органічні бактерициди, є іншим способом боротьби з *P. syringae*, але менш поширеним, ніж методи, перераховані вище. Нове дослідження показало, що додавання амонійного ( $\text{NH}_4^+$ ) живлення до рослин томатів може спричинити метаболічні зміни, що призведе до резистентності проти *Pseudomonas syringae*. Цей «амонієвий синдром» викликає дисбаланс поживних речовин у рослині і, отже, запускає захисну реакцію проти патогену. Селекція рослин на стійкість є ще одним досить ефективним способом уникнути *P. syringae* [41].

**Механізми патогенності *P. syringae*** можна розділити на кілька категорій: здатність проникати в рослину, здатність долати резистентність хазяїна, утворення біоплівки та виробництво білків із властивостями зародження льоду. Здатність проникати в рослини Планктонний *P. syringae* здатний проникати в рослини за допомогою своїх джгутиків і пілі, щоб плисти

до цільового господаря. Він потрапляє в рослину через рани природних отворів, оскільки не здатний порушити клітинну стінку рослини. Прикладом цього є співробітництво з мухою-мінувальником *Scaptomyza flava*, яка створює отвори в листі під час відкладання яєць, якими може скористатися патоген. Роль таксисів у *P. syringae* не була добре вивчена, але вважається, що бактерії використовують хімічні сигнали, які виділяє рослина, щоб знайти свого господаря та викликати інфекцію [42].

**Подолання резистентності господаря.** Ізоляти *Pseudomonas syringae* несуть низку факторів вірулентності, які називаються ефекторними білками системи секреції III типу (T3SS). Ці білки головним чином функціонують, щоб викликати симптоми захворювання та маніпулювати імунною відповіддю господаря, щоб полегшити інфекцію. Основним сімейством ефекторів T3SS у *P. syringae* є кластер гена *hgr*, який кодує апарат секреції Hrp.

Ефектори хмелю *HopZ1s* — це ефектори типу III, які перешкоджають 2-гідроксиізофлаванондегідратазі гліцину (*GmHID1*). *HopZ1b* руйнує дайдзеїн після виробництва, знижуючи концентрації та, таким чином, знижуючи імунітет, який він забезпечує рослині [43].

**Фітотоксини.** Патогени також виробляють фітотоксини, які пошкоджують рослину та можуть пригнічувати імунну систему господаря. Одним із таких фітотоксинів є коронатин, який міститься в патоварах *Pto* та *Pgl*. Elicitors *Pst* DC3000 виробляє *PsINF1*, *INF1* у *P. syringae*. Господарі відповідають аутофагією на виявлення цього елісатора. Лю та ін. 2005 вважає, що це єдина альтернатива масовій гіперчутливості, що призводить до масової запрограмованої загибелі клітин [44].

**Утворення біоплівки *Pseudomonas syringae*** виробляє полісахариди, які дозволяють їй прилипати до поверхні рослинних клітин. Він також вивільняє молекули, що сприймають кворум, що дозволяє відчутти присутність інших бактеріальних клітин поблизу. Якщо ці молекули перевищують пороговий рівень, бактерії змінюють свою модель експресії генів, утворюючи біоплівку та починаючи експресію генів, пов'язаних з вірулентністю. Бактерії виділяють

високов'язкі сполуки, такі як полісахариди та ДНК, щоб створити захисне середовище для росту [45].

**Властивості утворення льоду *Pseudomonas syringae*** — більше, ніж будь-який мінерал чи інший організм — відповідальний за поверхневе пошкодження морозом рослин, які піддаються впливу навколишнього середовища. Для рослин без антифризних протеїнів пошкодження морозом зазвичай відбувається в діапазоні від -4 до -12 С, оскільки вода в рослинній тканині може залишатися в переохолодженому рідкому стані. *P. syringae* може викликати замерзання води при температурах до -1,8 С, але штамми, що викликають зародження льоду при нижчих температурах (до -8 С), є більш поширеними. Заморожування спричиняє пошкодження епітелію та робить доступними для бактерій поживні речовини в підлеглих рослинних тканинах. *Pseudomonas syringae* має гени *ina* (активні до нуклеації льоду), які виробляють білки INA, які переміщуються на зовнішню бактеріальну мембрану на поверхні бактерії, де білки діють як ядра для утворення льоду. Штучні штамми *P. syringae*, відомі як лід-мінус бактерії, були створені для зменшення шкоди від морозу. *Pseudomonas syringae* була знайдена в центрі градини, що свідчить про те, що бактерія може відігравати певну роль у гідрологічному циклі Землі [46].

Завдяки ранній доступності послідовностей генома для *P. syringae* pv. *syringae*, штам В728а, і *P. syringae* pv. *phaseolicola*, штам 1448А, разом зі здатністю вибраних штамів викликати захворювання добре охарактеризованих рослин-господарів, таких як *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* та помідори, *P. syringae* стала важливою модельною системою для експериментальної характеристики молекулярної динаміки взаємодії рослин і патогенів. Експериментальна система *P. syringae* була джерелом новаторських доказів важливої ролі генних продуктів патогенів у придушенні захисту рослин. Номенклатурна система, розроблена для ефекторів *P. syringae*, була прийнята дослідниками, що характеризують ефекторний репертуар інших бактерій, а методи, що використовуються для біоінформаційної ідентифікації

ефекторів, були адаптовані для інших організмів. Крім того, дослідники, що працюють з *P. syringae*, зіграли важливу роль у робочій групі з онтології генів мікробів, пов'язаних із рослинами, спрямованої на розробку термінів генної онтології, які охоплюють біологічні процеси, що відбуваються під час взаємодії між організмами, і використання термінів для анотації генів продуктів [47].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Виділення бактерій з уражених органів рослин

Матеріал для аналізу збирають по можливості в стерильний папір або посуд, швидко доставляють у лабораторію та аналізують. Якщо зібраний матеріал не можна проаналізований негайно, то його консервують. Із цією метою зі зразків листя готують гербарій.

Кожен зразок супроводжують описом зовнішніх ознак захворювання. При плямистості листя характеризують форму плям (незграбна, округла, розпливчаста і т. д.), їх величину, забарвлення, жирність, наявність хлоротичної зони, виділення бактеріального ексудату і т. п. За наявності гнилі вказують характер ураження (загальна мокра або локальна місцева гниль), забарвлення ураженої тканини, її консистенцію, запах та ін.

Для доказу бактеріальної природи хвороби з уражених тканин рослини попередньо готують препарати різними способами, що залежить від стану рослинної тканини. Зазвичай скальпелем вирізують невеликі уражені шматочки тканини (5–7 см), з яких бритвою готують тонкі зрізи (при цьому шматочки можна закладати в бузину). Зрізи поміщають у краплю води на чисте знежирене предметне скло і забарвлюють прижиттєво або готують фіксовані препарати

Приступаючи до виділення бактерій з рослин, у зоні полум'я пальника розливають розплавлені та охолоджені до 50–60 °С поживні середовища (картопляний агар, м'ясо-пептонний агар та ін.) у заздалегідь підготовлені стерильні чашки Петрі. Це найкраще робити в спеціальному лабораторному боксі на столі, укритому пластиком або склом, який перед роботою протирають спиртом.

Для аналізу з досліджуваного зразка на межі хворої та здорової тканини попередньо фламованим (проведеним через полум'я пальника) і охолодженим скальпелем вирізують невеликі шматочки, які промивають протягом 20–30 хв проточною водопровідною водою в спеціальних ситечках або марлевих



мішечках, підвішених до водопровідного крану. Якщо аналізують шматочки коренів або гербарний матеріал, то термін промивання у водопровідній воді подовжують [3].

## **2.2. Посів із розтертого матеріалу**

Добре промитий шматочок рослинної тканини переносять у стерильну ступку, розміщену близько до полум'я пальника, і розтирають товкачем з додаванням кількох крапель стерильної води до отримання однорідної маси. Попередньо прожареною на полум'ї пальника та охолодженою петлею беруть одну краплю суспензії, що утворилася, та переносять у чашку Петрі на поверхню щільного поживного середовища.

Унесений матеріал рівномірно розтирають шпателем по всій поверхні середовища; цим самим шпателем проводять посів у другій та третій чашках Петрі для отримання більшої кількості ізольованих колоній [13].

## **2.3. Метод накопичення**

Ретельно промитий матеріал стерильно переносять у пробірку з рідким живильним середовищем (м'ясо-пептонний бульйон, середовище Омелянського та ін.) і витримують у термостаті до появи ознак зростання (приблизно 1–3 дні). Потім попередньо прожареною на полум'ї пальника петлею беруть одну краплю помутнілого живильного середовища і переносять на поверхню щільного поживного середовища в чашку Петрі, де розтирають шпателем. Цим самим шпателем здійснюють посів ще в двох чашках Петрі.

Після посіву чашки Петрі в перевернутому (догори дном) вигляді поміщають у термостат за температури 26–28 °С. З появою бактеріальних колоній (здебільшого через 1–3 дні після посіву) чашки виймають із термостата, колонії досліджують (див. *дослідження колоній*), ізолюють у пробірки і починають перевірку патогенності бактерій [14].

## **2.4. Визначення зараженості насіння**

за проявом захворювання на сходах базується на тому, що деякі бактеріальні захворювання рослин, що передаються з насінням, проявляються на сім'ядолях. Для цього не менше 100 насінин висівають у простерилізовані пробірки або ванночки зі зволженим піском. Добре промитий зволженим пісок насипають у широкі пробірки на 1/4 їх висоти, закривають ватними пробками і стерилізують в автоклаві при тиску 2 атм. протягом 40 хв. У кожен пробірку поміщають по одній насініні. Потім пробірки з насінням ставлять у термостат зі спеціальним світловим і температурним режимом і три рази протягом двох–трьох тижнів (залежно від виду рослини) підраховують проростки, на сім'ядолях яких проявляються ознаки захворювання. У кінці досліду визначають загальний відсоток зараженості кожної партії насіння [3].

## **2.5. Перевірка патогенності бактерій**

Через кілька днів після посіву розтертої кашки рослин на щільні поживні середовища в чашки Петрі в них утворюються видимі неозброєним оком колонії бактерій.

Зовнішній вигляд колоній має значення для визначення виду фітопатогенних бактерій. Колонії переглядають спочатку неозброєним оком у прохідному та відбитому світлі, а потім при малому збільшенні мікроскопа. Для цього чашку Петрі (не відкриваючи її) поміщають на столик мікроскопа у перевернутому вигляді (дном догори). Звертають увагу на розмір колоній, форму, структуру і консистенцію, поверхню, профіль, краї, колір та ін. Колонії, схожі на колонії фітопатогену, що визначають за зовнішніми ознаками, виділяють восковим олівцем або тушшю роблять коло (на дні чашки), ставлять номери поряд з обведеним кружком і відповідні цифри на пробірках та приступають до виділення культури.

Для посіву в пробірку вибирають однорідну за зовнішнім виглядом колонію, розташовану ізольовано від інших. Ізоляцію проводять, дотримуючись правил стерильності. Пробірку з косим агаром затискають

середнім пальцем лівої руки (скошена сторона агару повинна бути звернена вгору), обпалюють обвивальну петлю на полум'ї, відкривають чашку Петрі, беруть петлею матеріал із колонії та закривають кришку чашки.

Коли ізолювані культури виростуть на щільному живильному середовищі у пробірках, починають перевірку їх патогенності щодо рослин-господарів. На перевірку патогенності бактерій слід звернути особливу увагу, оскільки морфолого-культуральні властивості багатьох фітопатогенних бактерій іноді повністю збігаються з властивостями сапрофітів і розрізнити їх тільки за цими ознаками неможливо. Тому тільки довівши, що бактерії патогенні, приступають до детального вивчення їхніх морфологічних і культурально-біохімічних властивостей, необхідних для визначення видової приналежності.

Спочатку патогенність ізолюваних штамів перевіряють за допомогою штучного зараження певного виду рослини, з якого цей мікроорганізм було виділено. Для інокуляції за можливості відбирають молоді рослини, до яких прив'язують етикетки, написані простим олівцем, із зазначенням номера штаму бактерій і дати інокуляції.

Для штучного зараження використовують свіжі (одно-дводобові) культури бактерій, вирощені на щільному живильному середовищі, з яких готують суспензії. Густиоту бактеріальної суспензії за стандартом мутності частіше доводять до 500 млн або 1 млрд клітин в 1 мл стерильної водопровідної води. Маленькі краплі суспензії наносять на нижню поверхню листової пластинки або інші частини рослин стерильною пастерівською піпеткою, після чого крізь краплі роблять легкі уколи тонкою стерильною голкою, оскільки більшість фітопатогенних бактерій проникають у рослини через поранення. Рекомендують робити легкий укол трьома голками, скріпленими на стрижні у вигляді правильного трикутника, що дозволяє дотримуватися однакових умов при проведенні штучного зараження та порівнювати отримані результати.

Спочатку обробляють контрольні рослини стерильною водою, а потім піддослідні – бактеріальною суспензією. Інокульовані рослини або окремі їхні

органи протягом декількох днів витримують в умовах підвищеної вологості. Якщо зараження проводять у лабораторних умовах, то рослини поміщають під ковпак або у вологе приміщення, а плоди, цибулини, бульби тощо – у кристалізатори або ексикатори, де підтримують підвищену вологість. При зараженні окремих органів рослин у польових умовах їх укладають у зволожений пергаментний мішечок для створення вищої вологості. Температуру слід тримати на рівні, що сприяє прояву хвороби.

Спостерігаючи за розвитком інфекції, відзначають час появи перших ознак хвороби (плями на листі, стеблах або плодах, симптоми в'янення, початок розростання тканини та ін.), характеризують особливості її розвитку та записують дату загибелі рослини або відмирання окремих його органів. Під час остаточного визначення результатів штучного зараження при судинних бактеріозах готують поздовжні та поперечні зрізи стебел рослин, щоб робити висновки про наявність бактерій у судинах і про інтенсивність розвитку патологічного процесу. З потемнілих ділянок, розташованих вище і нижче від місць унесення бактерій, готують мазки або відбитки і фарбують їх за Грамом [13].

## **2.6. Дослідження морфології бактеріальних клітин**

Якщо ізольовані з рослин бактерії виявляться фітопатогенними, то починають дослідження морфології клітин. Для цього готують препарати (незабарвлені і забарвлені), які розглядають під мікроскопом. Краще досліджувати форму клітини, переглядаючи незабарвлені препарати, адже висушування, що застосовують при виготовленні забарвлених препаратів, викликає плазмоліз умісту клітини, що трохи змінює її нормальну форму. Живі бактерії вивчають у роздавленій або висячій краплі.

У роздавленій краплі прижиттєвий препарат готують таким чином. На чисте предметне скло наносять краплю стерильної чи водопровідної води, до неї петлею вносять невелику кількість мікроорганізмів, вирощених на щільному живильному середовищі, і обережно змішують з водою. Дуже густу

суспензію розбавляють, петлею переносять у краплю води на іншому предметному склі та накривають покривним склом.

Якщо бактерії вирощено в рідкому живильному середовищі, то на предметне скло наносять краплю цієї рідини петлею або піпеткою, накривають покривним склом і розглядають під мікроскопом, використовуючи звичайний об'єктив або іммерсійну систему.

Для приготування прижиттєвих препаратів використовують однодобові або молодші культури бактерій, щоб краще розглянути їх рухливість. Під час спостережень необхідно розрізнити активну рухливість бактерій (коли клітини пересуваються в полі зору у всіх напрямках) від броунівського руху, що має пасивний характер.

Висячі краплі використовують для тривалих спостережень рухливості і розмноження бактерій. Для цього необхідне предметне скло зі спеціальним поглибленням (ямкове). Беруть негусту суспензію бактерій і невелику її краплю поміщають у центр стерильного покривного скла, краї якого попередньо змащують вазеліном за допомогою скляної палички. Потім перевернуте покривне скло з висячою краплею накладають на стерильне предметне скло з поглибленням посередині так, щоб крапля висіла над поглибленням, не торкаючись до предметного скла. Вазелін не дає краплі висихати. Рух бактерій зазвичай спостерігають у висячій краплі, узятій із 12–14-годинної або однодобової рідкої бульйонної культури.

Якщо бактерії при першому перегляді виявляться нерухомими, то пробірку з культурою поміщають у термостат і знову перевіряють рухливість бактерій 3–4 дні поспіль. Оскільки деякі бактерії дуже швидко втрачають джгутики, рекомендують перше спостереження проводити через кілька годин після посіву в бульйон.

Для прижиттєвого забарвлення використовують у малих концентраціях водні розчини різних фарб, які не мають на мікроорганізми згубного впливу.

Використовують метиленову синь, нейтральний червоний, зелений янус, еозин, еритрозин та інші барвники концентрацією від 0,01 до 0,0001 % (див.

*приготування фарб*). Бактерії вносять у краплю фарби на предметному склі та накривають покривним склом.

Пофарбовані препарати зазвичай готують на чистих знежирених предметних стеклах, щоб нанесена на них суспензія бактерій розтікалася по склу, а не збиралася у вигляді крапель. Найпростіші способи очищення стекол – їх фламування (2–3-кратне) з подальшим протиранням фільтрувальним папером або натирання підсохлим шматочком мила з видаленням утвореного шару фільтрувальним папером.

*Приготування мазка*. Його готують на чистому знежиреному предметному склі. Спочатку наносять маленьку краплю стерильної води. Потім петлею беруть невелику кількість культури зі щільного поживного середовища, змішують з водою та рівномірно розподіляють по поверхні скла якомога тоншим шаром. Під час приготування мазків із культур, вирощених на рідких середовищах, краплю досліджуваної рідини розподіляють по поверхні скла.

*Висушування*. Зазвичай мазок висушують на повітрі при кімнатній температурі без нагрівання. Для прискорення висихання препарат можна злегка підігріти, тримаючи скло високо над полум'ям пальника мазком догори. Слід пам'ятати, що обережне висушування сприяє збереженню структури клітини.

*Фіксація*. Висушений мазок фіксують, щоб забезпечити краще прилипання бактерій до скла і зробити їх більш сприйнятливими до фарбування. Існує багато способів фіксації мазків. Найпоширеніший – фіксація полум'ям. Для цього, взявши скло за краї так, щоб мазок був звернений догори, його три рази проводять через верхню частину полум'я пальника і нагрівають нижню поверхню скла. Однак при нагріванні клітини можуть дещо змінити свою форму. Тому, вивчаючи будову клітини, фіксацію проводять 95 % етиловим спиртом протягом 10–15 хв або сумішшю його з ефіром (1 : 1) протягом 2–5 хв. Фіксувати можна також сумішшю етилового спирту з формаліном (формаліну 5 мл, спирту 95 мл) – 5–10 хв, парами

формаліну або оцтової кислоти – 5–10 хв, парами 1–2 % розчину осмієвої кислоти – 3–5 хв. В останньому випадку фіксацію проводять у закритій склянці, поміщаючи препарат на підставку.

*Фарбування.* Існує багато різних способів забарвлення бактерій, які застосовують залежно від цілей дослідження. Просте забарвлення роблять, досліджуючи форму мікроорганізмів. На мазок наливають розчин фарби так, щоб покрити всю його поверхню. Тривалість фарбування (3–5 хв) залежить від міцності фарби та виду бактерій. Мазки з агару добре фарбуються метиленовою синню, фуксином або сафраніном. Препарати, вирощені на бульйоні та молоці, слід фарбувати метиленовою синню, бо фуксин забарвлює органічні речовини цих середовищ.

*Промивання.* Після закінчення експозиції забарвлення фарбу зливають, а препарат промивають водою. Потім мазок висушують фільтрувальним папером, злегка торкаючись ним до препарату (але не пересуваючи). Після висушування препарат розглядають під мікроскопом. Найкраще досліджувати пофарбовані препарати за допомогою імерсійної системи мікроскопа.

*Фарбування за Грамом* являє собою спеціальний метод, що має діагностичне значення. При цьому методі фарбування бактерії ділять на дві групи: грампозитивні та грамнегативні. Бактерії першої групи при фарбуванні мазка кристалвіолетом (лігенціанвіолетом) з подальшими обробками його розчином йоду в йодистому калії та знебарвленням спиртом міцно утримують фіолетову фарбу, тоді як грамнегативні легко знебарвлюються спиртом, що залежить від особливостей хімічного складу бактерій. У результаті бактерії, що фарбуються за Грамом (грампозитивні), набувають темно-фіолетового кольору, а ті, що не фарбуються – червоного. Фарбування проводять у такій послідовності:

1. Готовий мазок (після висушування та фіксування на полум'ї пальника) підігриваючи, протягом 1 хв забарвлюють, розчином кристалвіолету чи генціанвіолету або накладають смужку фільтрувального паперу, просочену в розчинах цих фарб. Пофарбовані смужки паперу готують про запас і

підсушують (див. *приготування фарб*). Під час використання таких смужок зверху на них наливають кілька крапель води. Для приготування кристалвіолету або генціанвіолету беруть 1 г фарб, розчиняють в 100 мл спирту і додають 5 мл гліцерину.

2. Зливши фарбу або знявши смужку паперу, препарат (не промиваючи водою) обробляють розчином Люголя (розчин йоду в йодистому калії) протягом 1 хв. При цьому бактерії, що фарбуються за Грамом, утворюють нерозчинні в спирті з'єднання фарби з йодом. Для приготування розчину Люголя 2 г йодистого калію розчиняють у 5–10 мл води, додають 1 г йоду і після його розчинення доводять об'єм дистильованою водою до 300 мл. Зберігають у склянці з темного скла.

3. Зливши розчин Люголя, на препарат наливають 96 % спирт на 0,5–1,0 хв (не більше). Краще для знебарвлення препарату використовувати не чистий спирт, а спирт з додаванням йоду. На 50 мл 96 % спирту додають 1 мл 5 % спиртової настоянки йоду. Бактерії, що фарбуються за Грамом, стають темно-фіолетовими, а ті, що не фарбуються, – знебарвлюються.

4. Промивши препарат водою, додатково забарвлюють його фуксином Пфейфера або сафраніном протягом 2–3 хв (див. *приготування фарб*).

5. Зливши розчин фарби, препарат промивають водою і висушують за допомогою фільтрувального паперу. Для більш точного визначення результатів фарбування краще на одному предметному склі готувати одночасно три мазки з таких бактеріальних культур: свідомо грампозитивної, піддослідної та свідомо грамнегативної [14].

## **2.7. Тести на патогенність**

Для оцінки патогенності штамів *P. syringae* для рослин-господарів проводили трьома різними методами (SM, LIM і DLA).

Розпилювальний метод (SM). Випробування проводили в контрольованій ростовій камері. Рослини вирощували за температури  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , 16-годинного світлового дня, вологості 70–80 % і поливали за потреби



(приблизно двічі на тиждень). П'ять рослин на горщик (90 мм завширшки та 110 мм заввишки) вирощували на торф'яному субстраті "Універсальний" (рН 5,5–6,5, N 120–160 мг/л, K<sub>2</sub>O 190–240 мг/л, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 160–200 мг/л). Коли рослини досягають стадії росту 12–13 см, їх інокуюють (~1 мл на рослину) бактеріальною суспензією (10<sup>7</sup> клітин/мл). Проростки рослин-господарів інокують 13 штамами відібраних *P. syringae* і двома еталонними бактеріями: *P. syringae* pv. *syringae* (PSS) та *P. syringae* pv. *atrofaciens* (PSA). Для негативного контролю проростки інокулювали стерильною дистильованою водою (ТДВ). Горщики були рандомізовані з чотирма повторами кожної обробки. Інокульовані рослини накривали поліетиленовими пакетами на перші 72 години, щоб поверхня рослин залишалася вологою, і інкубували в вищезазначених умовах камери. Після інкубації (3–7 днів) штами, що викликають невеликі, просочені водою, сірувато-зелені ураження на листках розсади, вважалися патогенними для рослин-господарів. При появі симптомів захворювання проводили повторне виділення патогенних бактерій: для перевірки присутності *P. syringae* частини симптоматичних тканин висівали на середовище КВС та інкубували протягом 48 год при температурі 25°C. Ступінь ураження листя оцінювали за шкалою від 1% до 75%, запропонованою Duveiller et al. (1997). Експеримент повторювали тричі.

Метод листової ін'єкції (LIM). Проростки рослин-господарів вирощували на вологому фільтрувальному папері в чашках Петрі (90 × 20 мм) при кімнатній температурі (21 ± 2 °C) до досягнення 2–4 см в довжину. Верхню частину листя інокулювали шляхом введення стерильної голки, наповненої свіжою суспензією бактеріальних клітин (10<sup>7</sup> клітин/мл). Штами *P. syringae* тестували на чотирьох саджанцях, і тест повторювали тричі. Еталонні бактерії *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atrofaciens* також були включені в тест. Листя досліджували через 2–4 дні, штами, що викликають некротичні ураження в оточенні хлоротичної зони, вважалися патогенними для рослини-господаря.

Аналіз відокремленого листа (DLA). Для цього тесту з полів відбирали листя розсади, поверхню стерилізували в 3% розчині NaClO протягом 3 хвилин. Листя довжиною 5 см відрізали, а центр верхівки кожного листка поранили за допомогою стерильного наконечника піпетки. Потім сегменти листа поміщали в чашки Петрі розміром 100 мм (по чотири листки на чашку) на поверхню 0,5% водного агару, що містить 10 мг/л кінетину як сповільнювача старіння, і інокулював 5 мкл краплею бактеріальної суспензії ( $10^7$  КУО/мл), що містить 0,08% Tween 20. Контрольні листки інокулюють SDW, що містить Tween 20. Для цього тесту також використовували контрольні штами обох патогенів. Чашки Петрі витримували при кімнатній температурі ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) протягом 5 днів. Розмір ураження в мм, виходячи з його середньої довжини та ширини, вимірювали щодня.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 3.1. Виділення фітопатогенних бактерій із уражених рослин зернових культур

Загалом протягом 2023–2024 рр. було зібрано 38 зразків, зразки зерна (20) та листя (18) із симптомами бактеріального опіку листя та інфекції зерна (табл. 3.1, 3.2).

Таблиця 3.1

Зразки для виділення ізолятів бактерій із заражених рослин

Ізоляти	Рослини	Частина рослин
ЯПЗ	яра пшениця	зерно
ЯПЛ	яра пшениця	листя
ОПЗ	озима пшениця	зерно
ОПЛ	озима пшениця	листя
ОТЗ	озиме тритикале	зерно
ОТЛ	озиме тритикале	листя
ЯЯЗ	ячмінь ярий	зерно
ЯЯЛ	ячмінь ярий	листя

Таблиця 3.2

Кількість виділених ізолятів бактерій із заражених рослин

Ізоляти	Кількість зразків	Кількість ізольованих бактерій	Флуоресцентні бактерії на середовищі КВС середовищі
ЯПЗ	12	12	13
ЯПЛ	8	9	6
ОПЗ	10	7	7
ОПЛ	7	8	10

ОТЗ	12	5	7
ОТЛ	11	13	4
ЯЯЗ	9	10	6
ЯЯЛ	6	5	2
Всього	75	69	55

Бактерії, виділені з некротичних сегментів листя та насіння (основний кінець яких був темно-коричневим) на середовищі КВС дали 54 бактеріальних ізоляти.

Флуоресцентний синьо-зелений пігмент на цьому середовищі виробляли 38 білуватих, напівпрозорих бактеріальних колоній після 48 годин інкубації.

Таблиця 3.2.

Реакція штаму *Pseudomonas syringae* на тести LOPAT і патогенність для рослин-господарів (метод обприскування)

Назва виду	L	O	P	A	T	HP	Кількість ізолятів
<i>P. syringae</i>	+	–	–	–	+	+	9
<i>P. syringae</i>	+	–	–	–	+	–	27
<i>P. syringae</i>	+	–	–	–	±	±	12
<i>P. syringae</i>	+	–	–	–	±	–	38

Примітки: L – продукція левану, O – оксидазна реакція, P – пектолitiчна активність на картоплі, A – активність аргініндигідролази, T – гіперчутливість листя тютюну, HP – чутливість рослини-хазяїна.

Під час проведення LOPAT-тестів 11 штамів (5 виділено з листя та 6 із зерна) дали позитивну реакцію на продукцію левану, але негативну на оксидазну реакцію та активність аргініндигідролази та не спричиняли м'яку

гниль на бульбах картоплі; однак 33 із цих штамів викликали явну реакцію гіперчутливості на листя тютюну, а решта (44) ні (табл. 3.3).

За допомогою методу розпилення (СМ) усі 68 штамів були оцінені на їх патогенність для рослин-господарів, і лише 11 штамів (6 із зерна та 5 із листя) показали позитивну реакцію і, отже, були відібрані для подальших досліджень. Ці штами були виділені із зерна та листя всіх відібраних видів рослин і походили з різних районів України (табл. 3.4).

### **3.2. Визначення патогенності ізолятів, виділених із уражених частин зернових культур**

Симптоми опіку листя на розсаді рослин-господарів, обприсканих досліджуваними бактеріями, в основному були дуже слабкими (тяжкість захворювання 0,1–0,5%) (табл. 3.4).

Жодних симптомів на рослинах-господарях при застосуванні стерильної дистильованої води не спостерігалось. Серйозність опіку листя, спричиненого *P. syringae* pv. *atrofaciens* (6,8%) була вищою, ніж *P. syringae* pv. *syringae* (2,7%).

Метод листової ін'єкції (LIM) показав, що 4 штами виділено із зерна озимої пшениці (ОПЗ-6, ОПЗ-9, ОПЗ-4 та ОПЗ-8), 1 із листя озимої пшениці (ОПЛ-2), 2 із зерна ярої пшениці (ЯПЗ-2, ЯПЗ-11) та 1 із листя тритикале озимого (ОТЛ-1), а також *P. syringae* pv. *atrofaciens* були здатні викликати типовий для *P. syringae* pv. *atrofaciens* темні поля навколо точок щеплення.

Інші штами із зерна ярої пшениці (ЯПЗ-1 і ЯПЗ-3), листя ярої пшениці (ЯПЛ-6), зерна озимого тритикале (ОТЗ-1) і зерна ярого ячменю (ЯЯЗ-8) були протестовані, і, як і стерильна дистильована вода, не спричинили жодної зміни кольору. *P. syringae* pv. *syringae* спричинив змочені водою плями на листках, які стали некротичними та змінили колір із сіро-зеленого на жовто-білий (рис. 3.1).

Пізніше спостерігали некротизовані всі листки, за ураження *P. syringae* pv. *atrofaciens* спостерігали невеликі темно-зелені або коричневі, просочені

водою неправильної форми ураження 2–5 мм у довжину (рис. 3.2). Ці подовжені до 5 мм пошкодження ставали жовтими, а потім коричневими, коли тканина остаточно висихала.

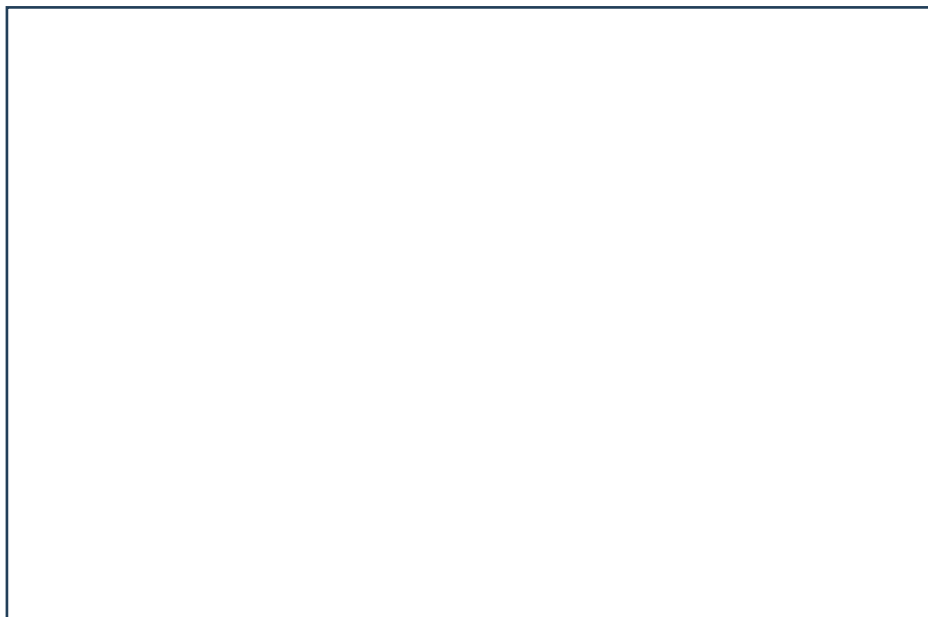


Рис. 3.1. Симптоми на рослинах використання методу обприскування листя (SM) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

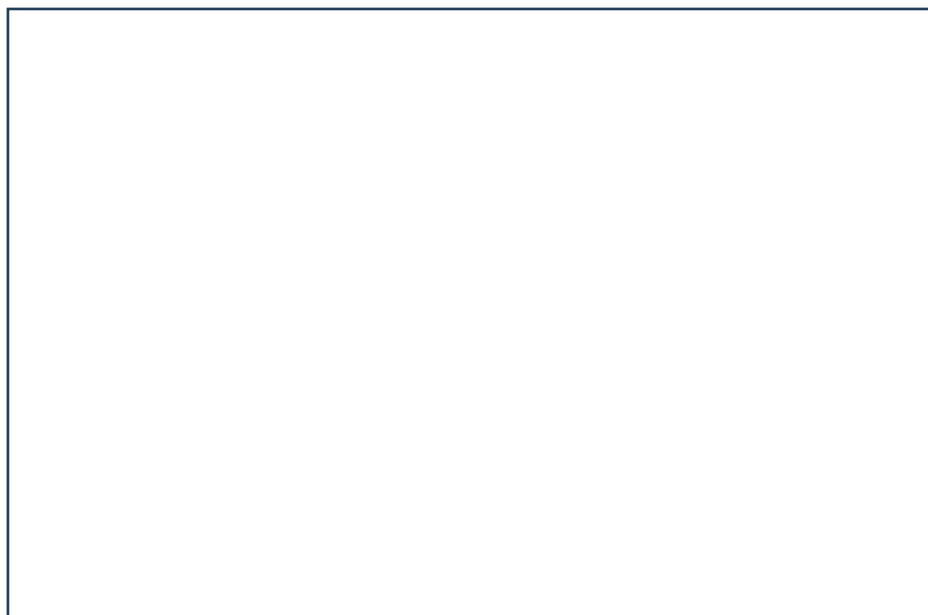


Рис. 3.2. Симптоми на рослинах за використання методу обприскування листя (SM) *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Патогенність штамів *Pseudomonas syringae* для зернових культур за допомогою методів обприскування розсади (SM), ін'єкції листя (LIM) та аналізу відокремленого листка (DLA) (2023–2024 рр.)

Ізоляти	Рослина	Частина рослини	SM: НР %	LIM: НР	DLA: розмір ураження мм
ЯПЗ-2	яра пшениця	зерно	42	+	5,2
ЯПЗ-11	яра пшениця	зерно	53	+	4,2
ЯПЗ-1	яра пшениця	зерно	45	–	4,3
ЯПЗ-3	яра пшениця	зерно	48	–	4,7
ЯПЛ-6	яра пшениця	листки	52	–	5,1
ОПЗ-3	озима пшениця	зерно	67	+	5,4
ОПЗ-9	озима пшениця	зерно	54	+	4,1
ОПЗ-4	озима пшениця	зерно	44	+	3,8
ОПЗ-8	озима пшениця	зерно	36	+	3,6
ОПЛ-2	озима пшениця	листки	52	+	3,7
ОТЗ-1	озиме тритикале	зерно	39	–	3,5
ОТЛ-4	озиме тритикале	листки	44	+	4,0
ЯЯЗ-8	ячмінь ярий	зерно	55	–	3,7
PSA	<i>T. durum</i>	–	82	+	6,5
PSS	<i>H. vulgare</i>	–	77	+	6,3

Використовуючи аналіз відокремленого листа (DLA), симптоми хвороби на листі рослини-господаря були чітко виражені у всіх досліджених штамів бактерій.

Симптоми на листі в точці щеплення спочатку проявилися у вигляді невеликої краплі води.

Через два дні плями, просочені водою, згодом перетворилися на некротичні ураження овальної форми, оточені жовтими хлоротичними ділянками.

Сегменти листа, інокульовані SDW, не показали видимих пошкоджень. Інокуляція штамми бактерій спричинила пошкодження на листі розміром 3,5–5,4 мм (табл. 3.3).

Дослідники з усього світу (Sundin et al., 2016; Tripathi, 2017; Xin et al., 2018) помітили зростаючий ризик фітопатогенних бактерій для росту рослин, у тому числі зернових, особливо пшениці, однієї з найцінніших і найважливіших зернових культур, що займає перше місце у світі за посівними площами (Valencia-Botín, Cisneros-López, 2012; Suszanowicz et al., 2019; Butsenko et al., 2021).

Зважаючи на те, що бактеріальні хвороби на зернових культурах України раніше не досліджувалися, а нетипові для грибних хвороб плямистість листа та зміна кольору луски на полях зустрічаються на зернових культурах досить часто, ці дослідження мали на меті виявити наявність *P. syringae* в листках і зерні пшениці, ячменю і тритикале.

У поточному дослідженні симптоми опіку листа та прикореневої плямистості луски, викликані *P. syringae*, були вперше досліджені на зернових культурах.

Симптоми вищезазначених захворювань частіше виявлялися у посівах ярої та озимої пшениці, ніж у озимого тритикале та ярого ячменю, що свідчить про те, що останні можуть бути більш стійкими до інфекцій *P. syringae*. Інша причина полягає в тому, що на поширення бактеріальних захворювань також можуть впливати умови навколишнього середовища.



Раніше було показано, що симптоми базальної плямистості луски, викликані *P. syringae* pv. *atrofaciens* змінювалися залежно від сільськогосподарської практики, стадії росту та факторів навколишнього середовища (Ратука, 2016). Збільшення кількості азотних, фосфорних і калійних добрив підвищувало потенціал зараження пшениці цією бактерією.

Симптоматичні зразки листя та зерна, зібрані під час експерименту, дали 38 штамів (6 виділено з листя та 5 із зерна), які були ідентифіковані на основі тестів LOPAT як *P. syringae*.

Проте більшість штамів (78,4%) не викликали симптомів захворювання на рослинах-господарях при дослідженні методом обприскування в контрольованих умовах. З попередніх досліджень (Kietzel, Rudolph, 1997; Valencia-Botín, Cisneros-López, 2012; Butsenko et al., 2021) відомо, що епіфітний *P. syringae* присутній на поверхні рослин пшениці та інших господарів.

Висока вологість сприяє великій кількості епіфітної популяції *P. syringae*, і розмір такої популяції кількісно корелює з частотою спалахів захворювання (Xin et al., 2018).

Патогенні та епіфітні *P. syringae* були вперше виявлені в зернових культурах. *P. syringae* pv. *atrofaciens* протягом багатьох років є основним збудником бактеріальних захворювань пшениці, зокрема базальної лускоподібної гнилі пшениці, протягом багатьох років в інших країнах (Matveeva et al., 2008; Kazempour et al., 2010; Butsenko et al., 2021).

Проте метод розпилення (SM) показав, що ізоляти *P. syringae* були слабкими збудниками зернових культур на власних господарях. Методи SM і DLA показали, що вони здатні викликати захворювання.

За допомогою DLA ізоляти були майже такими ж ефективними, як позитивний контроль контрольних штамів (табл. 3.3). Обидва останні методи включали фізичні рани на рослинах, тоді як SM не робив цього.

Крім того, взаємодія господар-патоген є складною та багаторівневою. Також важливу роль може мати точний час (ранок або вечір) і спосіб

обприскування. *P. syringae* поширений у навколишньому середовищі та бере участь у снігоутворенні в атмосфері, присутній у дощах, струмках та інших джерелах води (Morris et al., 2013).

Якби він міг вільно вторгтися в рослини, спустошення було б незмірним. Натомість це умовно-патогенний мікроорганізм, який покладається на інші фактори, такі як грибкові інфекції або живлення комахами, щоб зробити рани в рослинах, які допомагають йому проникнути в господарів.

Однак його велика кількість гарантує, що *P. syringae* завжди присутній і готовий скористатися сприятливими умовами, які можуть призвести до спонтанної епідемії. За даними Ратука (2016) та Butsenko et al. (2021), хвороба не завдала значних збитків, але для поширення хвороби потрібні сприятливі погодні умови.

### **3.3. Вплив пестицидів на збудника бактеріального опіку пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *syringae***

Схожість симптомів, які спричинює збудник бактеріального опіку пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, та відсутність зареєстрованих антибактеріальних препаратів для рослинництва призводять до використання аграріями фунгіцидів, як засобу контролю *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Тому у дослідженні впливу пестицидів на бактерії цього патовару та близьких патоварів, які поширені у агрофітоценозах зернових культур в Україні, найбільшу увагу приділено фунгіцидам.

Антибактеріальну активність фунгіцидів було визначено щодо широкого кола штамів збудника *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, які ізольовано нами в посівах пшениці, та типових штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Для оброблення зернових культур рекомендовані фунгіциди на основі беномілу, тіофанат метилу, флудіоксаонілу.

Чутливість штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* до препаратів  
фунгіцидної дії

Діюча речовина пестициду	Концен- трація	Ріст штаму на середовищі з пестицидом	
		Ізольовані штами	Колекційні штами
Беноміл, 500 г/кг	10*РВ	+	+
	РВ	+	+
Тіофанат-метил, 700 г/кг	10*РВ	+	+
	РВ	+	+
Флудіоксоніл, 25г/л	10*РВ	+	+
	РВ	+	+
Пенконазол, 100 г/л	10*РВ	+	+
	РВ	+	+
Дифеноконазол, 250 г/л	10*РВ	+	+
	РВ	+	+
Фосетил алюмінію, 800 г/кг	10*РВ	–	–
	РВ	+	+
Манкоцеб, 800 г/кг	10*РВ	–	–
	РВ	–	–
Манкоцеб, 640 г/кг + металаксил, 40 г/кг	10*РВ	–	–
	РВ	–	–
Пропамокарбу гідрохлорид, 248 г/л + манкоцеб, 301,6 г/л	10*РВ	–	–
	РВ	–	–
Гідроокис міді, 770 г/кг	10*РВ	–	–
	РВ	–	–

Нами встановлено, що жоден із цих фунгіцидів у рекомендованій до застосування концентрації та у збільшеній у 10 разів концентрації не впливає на штами збудника бактеріального опіку *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (табл. 3.5). Тому нами перевірено антибактеріальну активність фунгіцидів, які рекомендовані до використання в посівах інших культур, щодо штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Встановлено, що фунгіциди на основі пенконазолу (100 г/л) та дифеноконазолу (250 г/л) не виявляють антибактеріальної активності стосовно штамів збудника бактеріального опіку пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Фунгіцид на основі фосетилу алюмінію (800 г/кг) характеризується антибактеріальною дією лише у концентрації, що у 10 разів перевищує рекомендовану до застосування виробником концентрацію. Антибактеріальну активність щодо всіх штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* виявляють препарати що містять у своєму складі манкоцеб: манкоцеб, 800 г/кг; манкоцеб, 640 г/кг + металаксил, 40 г/кг; пропамокарбу гідрохлорид, 248 г/л + манкоцеб, 301,6 г/л (табл. 3.5). Два із цих препаратів характеризуються високою антибактеріальною активністю та зупиняють ріст штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* навіть у концентраціях, що є нижчими за рекомендовану до використання. Фунгіцид, що містить як діючу речовину комбінацію пропамокарбу гідрохлорид, 248 г/л + манкоцеб, 301,6 г/л, характеризується антибактеріальною активністю лише у рекомендованій та вищій за рекомендовану концентраціях, що на нашу думку обумовлено більш низьким вмістом манкоцебу в препараті.

Здатність пригнічувати ріст фітопатогенних бактерій також притаманна препарату гідроксиду міді, 770 г/кг у рекомендованій та навіть нижчих за рекомендовані концентраціях (табл. 3.5). Необхідно зазначити, що використання препаратів на основі міді, зокрема, сульфату міді, оксихлориду і гідроксиду міді наразі є одним із першочергових заходів для контролю збудників бактеріальних хвороб.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що симптоми бактеріального опіку на листках і темно-коричневі ураження на базальному кінці зерна приблизно в 10 разів частіше виявлялися у ярої та озимої пшениці, ніж у озимого тритикале та ярого ячменю.

2. З ураженого листя і насіння виділено 38 штамів *Pseudomonas syringae* (6 з листя та 5 з зерна), більшість з яких (78,4%) були непатогенними для рослин-господарів при тестуванні методом розпилення (SM) у контрольованих умовах камери росту.

3. Патогенні штами *P. syringae* були виділені із зерна та листя усіх відібраних видів рослин (яра пшениця, озима пшениця, озиме тритикале та ярий ячмінь), з різних областей країни, що підтверджує, що хвороби, спричинені *P. syringae*, присутні у вирощуваних зернових культурах.

4. Встановлено, що препарати, які містять манкоцеб, характеризуються високою антибактеріальною активністю щодо *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Baltrus D. A., McCann H. C., Guttman D. S. 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Pathology*, 18 (1): 152–168. <https://doi.org/10.1111/mpp.12506>
2. Barghouthi A. A. 2011. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian Journal of Microbiology*, 51 (4): 430–444. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0122-5>
3. Butsenko L., Pasichnyk L., Kolomiets Y., Kalinichenko A., Suszanowicz D., Sporek M., Patyka V. 2021. Characteristic of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* isolated from weeds of wheat field. *Applied Sciences*, 11 (1): 286. <https://doi.org/10.3390/app11010286>
4. Choi O., Kang B., Cho S. K., Park J., Lee Y., Kim W.-I., Marunga J., Hwang I., Kim J. 2017. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf blight of *Miscanthus sinensis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124: 97–100. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0058-4>
5. Duveiller E., Fucikovsky L., Rudolph K. (eds). 1997. *The Bacterial Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. CIMMYT, Mexico D.F., 78 p.
6. Glinushkin A. P., Beloshapkina O. O., Solovykh A. A., Sudarenkov G. V., Molnár J. 2016. Bacterial diseases of wheat in the Southern Ural: manifestations, biological characteristics and monitoring features. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 51 (1): 57–67. <https://doi.org/10.1556/038.51.2016.1.5>
7. Iličić R., Balaž J., Stojšin V., Bagi F., Pivić R., Stanojković- Sebić A., Jošić D. 2016. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pvs. from different host plants by repetitive sequence-based PCR and multiplex-PCR. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103 (2): 199–206. <https://doi.org/10.13080/z-a.2016.103.026>
8. Kazempour M. N., Kheyrgoo M., Pedramfar H., Rahimian H. 2010. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat

(*Triticum aestivum* L.) in Iran. African Journal of Biotechnology, 9 (20): 2860–2865. <https://www.cabi.org/isc/abstract/20103179807>

9. Kietzel J. V., Rudolph K. 1997. Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrovaciens*. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Developments in Plant Pathology Series. Rudolph K. et al. (eds). Kluwer Academic Publishers, p. 29–34. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5472-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5472-7_6)

10. Konavko D., Moročko-Bičevska I., Bankina B. 2014. *Pseudomonas syringae* as important pathogen of fruit trees with emphasis on plum and cherry. Research for Rural Development, 1: 19–25.

11. Matveeva E. V., Ignatov A. N., Bobrova V. K., Milyutina I. A., Troitsky A. V., Polityko V. A., Schaad N. W. 2008. Genetic diversity among pseudomonad strains associated with cereal diseases in Russian Federation. Fatmi M. et al. (eds). *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics. Springer, p. 337–345. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6901-7\\_35](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6901-7_35)

12. Morris C. E., Monteil C. L., Berge O. 2013. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. Annual Review of Phytopathology. 51: 85–104. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102402>

13. Pasichnyk L. A., Butsenko L. M. 2018. Serological features of bacteria *Pseudomonas syringae* agroecosystems of cereal. Mikrobiologichnyi Zhurnal, 80 (4): 41–54 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.041>

14. Patyka V. P. 2016. Phytopathogenic bacteria in contemporary agriculture. Mikrobiologichnyi Zhurnal, 78 (6): 71–83. <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.06.071>

15. Schaad N. W., Jones J. B., Chun W. (eds). 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3<sup>rd</sup> ed.). American Phytopathological Society, 373 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>

16. Sundin G. W., Castiblanco L. F., Yuan X., Zeng Q., Yang C.-H. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future

prospects. Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*, 17(9): 1506–1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>

17. Suszanowicz D., Patyka N. V., Patyka V. et al. 2019. Express diagnostics of phytopathogenic bacteria and phytoplasmas in agrophytocenosis: monograph. *Phytopathogenic Bacteria in Contemporary Agriculture*, 78 p.

18. Toben H., Mavridis A., Rudolph K. W. E. 1989. Basal glume rot (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*) on wheat and barley in FRG and resistance screening of wheat. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19 (1): 119–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1989.tb00137.x>

19. Tripathi D. 2017. Bacterial pathogens in plants. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 4 (2): 38–39. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2017.04.00083>

20. Valencia-Botín A. J., Cisneros-López M. E. 2012. A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *International Journal of Agronomy*, 2012: 692350. <https://doi.org/10.1155/2012/692350>

21. Vasinauskiene M. 1997. Occurrence and control of a *Pseudomonas syringae* pathovar causing bacterial lupine blotch. Rudolph K. et al. (eds). *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens. *Developments in Plant Pathology*. Springer, vol. 9, p. 623–628. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5472-7\\_113](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5472-7_113)

22. Vasinauskienė M., Baranauskaitė L., Burokienė D. 2008. Search for *Pseudomonas syringae* on stone fruits in Lithuania. Annual Meeting of COST Action 873 STF meeting within WG1 Determination of the Incidence of the Different Pathovars of *Pseudomonas syringae* in Stone Fruits. Skierniewice, Poland, 11 p. <https://www.yumpu.com/en/document/read/46665862/search-for-pseudomonas-syringae-on-stone-fruits-in-cost-873>

23. Xin X.-F., Kvitko B., He S. 2018. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16: 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>

24. P. K. Anderson, A. A. Cunningham, N. G. Patel, F. J. Morales, P. R. Epstein, and P. Daszak, “Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution,



climate change and agrotechnology drivers,” *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 19, no. 10, pp. 535–544, 2004.

25. H. E. Villasenor, “Importancia del trigo,” in *El Trigo de Temporal en Mexico*, H. E. Villasenor and E. Espitia, Eds., pp. 7–24, INIFAP, CIR-CENTRO, Centro, Mexico, 2000.

26. FAOSTAT, “Production, crops,” 2010, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

27. United States Department of Agriculture, “World agricultural supply and demand estimates,” WASDE, 501, 2011, <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>.

28. J. L. Vanneste, D. A. Cornish, J. Yu, and C. E. Morris, “The application of polymerase chain reaction for characterising strains of *Pseudomonas syringae* isolated from New Zealand rivers,” *New Zealand Plant Protection*, vol. 62, pp. 256–261, 2009.

29. M. N. Kazempour, M. Kheyrghoo, H. Pedramfar, and H. Rahimian, “Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 20, pp. 2860–2865, 2010.

30. A. J. Valencia-Botín, L. E. Mendoza-Onofre, H. V. Silva-Rojas et al., “Indicadores de agresividad y metodos de inoculación con bacterias fitopatogenas en plantas y semillas de trigo ‘Seri M82’,” *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 30, no. 3, pp. 255–259, 2007.

31. H. A. Zavaleta-Mancera, A. J. Valencia-Botín, L. E. Mendoza-Onofre, H. V. Silva-Rojas, and E. Valadez-Moctezuma, “Use of green fluorescent protein to monitor the colonization of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* on wheat seeds,” *Microscopy and Microanalysis Journal*, vol. 13, no. S02, pp. 298–299, 2007.

32. A. J. Valencia-Botín, L. E. Mendoza-Onofre, H. V. Silva-Rojas, E. Valadez-Moctezuma, L. Cordova-Tellez, and H. E. Villasenor-Mir, “Effect of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* on yield and biomass distribution in wheat,” *Spanish Journal of Agricultural Research*, vol. 9, no. 4, pp. 1287–1297, 2011.

33. M. T. Buenrostro-Nava, Characterization of GFP gene expression using an automated image collection system and image analysis, Ph.D. thesis, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA, 2002.

34. B. Bohanec, Z. Luthar, and K. Rudolf, "A protocol for quantitative analysis of green fluorescent protein-transformed plants, using multiparameter flow cytometry with cluster analysis," *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, vol. 44, pp. 145–153, 2002.

35. A. C. Sexton and B. J. Howlett, "Green fluorescent protein as a reporter in the Brassica-Leptosphaeria maculans interaction," *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 58, no. 1, pp. 13–21, 2001.

36. J. T. Coombs and C. M. Franco, "Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 7, pp. 4260–4262, 2003.

37. N. Chen, T. Hsiang, and P. H. Goodwin, "Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 53, no. 1, pp. 113–122, 2003.

38. L. Oren, S. Ezrati, D. Cohen, and A. Sharon, "Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 3, pp. 1695–1701, 2003.

39. C. T. Bull, C. R. Clarke, R. Cai, B. A. Vinatzer, T. M. Jardini, and S. T. Koike, "Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley," *Phytopathology*, vol. 101, no. 7, pp. 847–858, 2011.

40. C. Weinel, Comparative and functional genome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440, Ph.D. thesis, University of Hannover, Hanover, Germany, 2003.

41. H. V. Silva-Rojas, Caracterización de bacterias fitopatógenas causantes de manchas foliares en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en

Mexico, Tesis de Doctor en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico, 2000.

42. Y. Anzai, H. Kim, J. Park, H. Wakabayashi, and H. Oyaizu, "Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 50, no. 4, pp. 1563–1589, 2000.

43. B. Slabbinck, B. de Baets, P. Dawyndt, and P. de Vos, "Analysis of plant-pathogenic *Pseudomonas* species using intelligent learning methods: a general focus on taxonomy and fatty acid analysis within the genus *Pseudomonas*," *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 28, pp. 1–16, 2010.

44. M. D. R. Rodicio and M. D. C. Mendoza, "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 22, no. 4, pp. 238–245, 2004.

45. D. Gevers, F. M. Cohan, J. G. Lawrence et al., "Re-evaluating prokaryotic species," *Nature Reviews*, vol. 3, no. 9, pp. 733–739, 2005.

46. H. E. O'Brien, S. Thakur, and D. S. Guttman, "Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 49, pp. 269–289, 2011.

47. A. J. Valencia-Botín, Caracterización, identificación, colonización y repercusión agronómica de bacterias fitopatógenas en trigo, Tesis de Doctor en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico, 2007.

48. Valencia-Botín, Alberto J., Cisneros-López, María E., A Review of the Studies and Interactions of *Pseudomonas syringae* Pathovars on Wheat, *International Journal of Agronomy*, 2012, 692350, 5 pages, 2012.