

ХВОРОБИ СОЇ ЗА ДІЇ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Т.Т. Гнатюк¹, Н.В. Житкевич¹, В.Ф. Петриченко²,
А.В. Калініченко³, В.П.Патика¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН України,
проспект Юності, 16, Вінниця, 21100, Україна

³Опольський університет, вул. Дмовського, 1/3, Ополе, 43-365, Польща
e-mail: gnatuktatiana@gmail.com

Мета. Обґрунтувати і експериментально підтвердити роль бактерій роду *Pseudomonas* у патогенезі сої та вивчити біологічні властивості домінуючого збудника *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. **Методи.** Теоретичне узагальнення, лабораторно-модельні дослідження, фітопатологічні, мікробіологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярно-генетичні. **Результати.** Встановлено, що в різних ґрунтово-кліматичних зонах України найбільшу групу патогенів складають бактерії роду *Pseudomonas*. Запропоновано методи ідентифікації домінуючого виду фітопатогенної бактерії *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, що викликає кутасту плямистість сої. **Висновки.** Багаторічний моніторинг посівів сої районуваних сортів різних ґрунтово-кліматичних зон України показав, що одним з домінуючих збудників бактеріозів є *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* у колі бактеріальних патогенів цієї рослини. Створено базу профілів ВОХ-фрагментів для колекційних штампів *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Метод ВОХ-ПЛР дозволяє ідентифікувати фітопатогенні псевдомонади до виду, але не до патовару. Показано, що ідентифікацію збудників бактеріозів сої роду *Pseudomonas* потрібно проводити на основі симптоматики та поліфазної таксономії.

Ключові слова: фітопатогенні бактерії, соя, збудник кутастої плямистості, біологічні властивості, полімеразна ланцюгова реакція.

Фітопатогенні бактерії роду *Pseudomonas* є окремою групою в родині *Pseudomonadaceae*. Вони відзначаються високою шкодочинністю щодо рослини-хазяїна, значною екологічною пластичністю у різних агроекологічних умовах, уражують широке коло сільськогосподарських і декоративних рослин і часто домінують серед інших фітопатогенних збудників [1, 2, 3]. У той же час серед усього спектру збудників бактеріозів рослин облігатні фітопатогени роду *Pseudomonas* найбільш стійкі до токсичної дії препаратів захисту рослин хімічного і біологічного походження. Тому вивчення їх біологічних властивостей і розповсюдження, незважаючи на велику кількість робіт, присвячених зазначеним фітопатогенним бактеріям у світі, сьогодні не втратило **своєї актуальності** [4, 5].

Збудники бактеріальних хвороб зернобобових рослин, які відносяться до фітопатогенів роду *Pseudomonas*, включають вузькоспеціалізовані групи (*P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. savastanoi* pv. *glycinea*) і поліфаги (*P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tabaci*) [6, 7]. Моніторинг,

діагностика цих патогенів та прогнозування поширення хвороб, які вони викликають, неможливе без ідентифікації та вивчення біологічних властивостей збудників. Труднощі ідентифікації цих патогенів полягають у подібності їх культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей. Тому при ідентифікації та відокремленні на рівні патовару один від одного патогенних для сої псевдомонад необхідно поєднане визначення фенотипових та генотипових властивостей [8].

Фітопатогени роду *Pseudomonas*, які уражують зернобобові культури, мають характерні ознаки ураження рослини-хазяїна, проте між собою розрізняються певними особливостями. Тому вивчення симптоматики прояву хвороб, які викликають зазначені вище патогени, є необхідною складовою при виділенні і визначенні збудників [6].

Метою роботи було обґрунтування та експериментальне підтвердження ролі бактерій роду *Pseudomonas* у патогенезі сої і вивчення біологічних властивостей домінуючого збудника кутастої плямистості *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

Матеріали і методи. Дослідження проводили упродовж 2010–2017 рр. на науково-дослідних стаціонарах та виробничих посівах сої у 9-ти областях України, а саме: Київській, Вінницькій, Черкаській, Сумській, Полтавській, Чернігівській, Рівненській, Херсонській, Кропивницькій (рис. 1).



Рис. 1. Ґрунтово-кліматичні зони і області моніторингу посівів сої України (моніторингові області позначено кольором, відповідним до кліматичної зони).

Обстеження районованих рослин сої та відбір зразків збудника проводили у фазах сходів, бутонізації та цвітіння рослин, а також під час наливу та дозрівання зерна. Оцінку ураження посівів сої та відбір зразків проводили за методами, описаними у літературі [10].

Збудники виділяли в чисту культуру із свіжих рослинних зразків на різних стадіях розвитку ураження бактеріальними патогенами. Кожен зразок супроводжували описом зовнішніх ознак хвороб у відповідності до загальноприйнятих методів [11, 12].

Патогенні властивості всіх ізолятів бактерій визначали шляхом штучного зараження [11, 12]. Для цього використовували суспензію од-но-дводобових культур бактерій зі щільністю за стандартом мутності 1×10^9 КУО в 1мл стерильної водогінної води, яку наносили на поверхню листя з подальшим потрійним пораненням голкою або вводили в стебло рослини шляхом ін'єкції шприцом. Як контроль використовували введено у рослину стерильну водогінну воду. Штучне зараження проводили на **стадіях** бутонізації і цвітіння та наливу і досягання зерна.

Облік штучного зараження сої здійснювали за розробленою нами [11] 5-бальною шкалою (0–4) через 7–14 діб. Повторність дослідів – 5-ти разова. Для визначення можливої належності фітопатогенного збудника до роду *Pseudomonas* досліджували реакцію надчутливості на тютюні (РНЧ) [12].

Морфолого-культуральні (профілі, консистенція, забарвлення колоній, забарвлення за Грамом, характер руху, росту на м'ясо-пептонному бульйоні тощо) та фізіолого-біохімічні властивості бактерій (табл. 4) вивчали за методами, описаними у відповідній літературі [11, 12, 13].

Ріст ізолятів штамів на діагностичних середовищах порівнювали з колекційними еталонними штамми та перевіряли їх ідентичність у відповідності з описаними у літературі та міжнародними загальноприйнятими визначниками [13].

Для порівняльних досліджень як еталони використовували бактеріальні штамми, отримані з колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної Академії Наук України (ІМВ) та Української колекції мікроорганізмів (УКМ): *P. savastanoi* pv. *glycinea* – штамми ІМВ В-9070, 9072, 9073, 9074, 9076, 8531, 8542, ІМВ В-8541 = УКМ В1019, ІМВ В-8571[†] = НССРВ 1139[†], ІМВ В-9176 = ІСМР 2189; *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* – штамми ІМВ В-9066[†] = НССРВ 52[†], ІМВ В-4012 = УКМ В-1026 = ІСМР 10444; *P. syringae* pv. *tabaci* – штам ІМВ В-223; *P. syringae* pv. *syringae* – штамми В-8570, 8543, ІМВ В-8511[†] = УКМ В 1027[†] = НССРВ 281[†].

Виділення ДНК. Виділення ДНК із 24-годинних культур бактерій проводили з використанням комерційного набору Diatom DNA Prep 200 (“Изоген”, Росія) відповідно до інструкції виробника. Культуру бактерій ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині в пробірці об'ємом 1,5 мл. Отриману бактеріальну суспензію центрифугували на мікроцентрифузі протягом 2 хвилин при 16000 g (13200 об/хв). Надосадову рідину зливали, до осаду додавали 500 мкл лізуючого реагенту. Осад ресуспендували на вортексі та інкубували в термостаті при 65°C протягом 5 хв. Клітинний дебрис осаджували центрифугуванням – 5000 g, 1 хв. 400 мкл супернатанту переносили в чисті пробірки, додавали по 20 мкл суспензії сорбенту NucleoS і поміщали на ротатор (40–60 об/хв) на 10 хв. Центрифугували 1 хв, 5000g, осад ресуспендували в 200 мкл лізуючого реагенту і додавали 1 мл сольового буфера. Центрифугували 1 хв, 5000 g і осад промивали 1 мл сольового буфера. Осад сорбенту висушували при 65°C протягом 5 хв. ДНК із сорбенту відмивали ресуспендуванням осаду в 100 мкл екстрагуючого буфера і витримували в термостаті при 65°C 5 хв. Сорбент відділяли від розчину ДНК центрифугуванням при 16 000g, 1 хв.[14].

Полімеразна ланцюгова реакція. Ампліфікацію фрагментів Rep проводили з використанням праймера BOX-A1R (5-CTACGCGAAGGCC-AGGCTGACG-3).

ПЛР проводили на ампліфікаторі Eppendorf Mastercycler Personal 5332 (Німеччина). Для проведення ПЛР використовували 5 мкл розчину бактеріальної ДНК, яку додавали в ПЛР-суміш, що містила: 1,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ дНТФ; 1,25 U Taq-полімерази; 0,8 мкМ BOX-A1R праймера; 10 мМ Трис-НСІ буфера рН 8.8; 50 мМ КСІ. Загальний об'єм суміші становив 25 мкл.

Ампліфікацію проводили в такому температурному режимі: початкова денатурація – 95°C, 7 хв; 30 циклів: денатурація – 95°C, 1 хв, відпал праймера – 53°C, 1 хв., елонгація – 65°C, 8 хв. Термінальна елонгація – 65°C, 16 хв.

Розділення продуктів ПЛР здійснювали шляхом електрофорезу в 1,5 %-вому агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мкл), тривалістю 120 хв, за напруженості електричного поля 3 В/см. Для визначення молекулярної маси та кількості фрагментів ДНК використовували маркер молекулярної маси O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas, Литва).

Визначення довжин ампліконів в гелі здійснювали за допомогою програми Gel-Pro Analyzer 4 [15].

При обчисленні результатів гель-електрофорезу враховували лише ті смуги, інтенсивність яких сягала не менше 2,5% від максимальної. Спорідненість зразків ДНК визначали за часткою ампліконів однакової довжини, користуючись коефіцієнтом Жаккара [16]. Кластерний аналіз, при якому використовували незважений парногруповий метод із арифметичним усередненням (UPGMA), і побудову дендрограми проводили за допомогою програми DendroUPGMA [17].

Результати. Згідно з даними літератури [2] та за нашими спостереженнями прояв симптомів бактеріальних хвороб сої не залежить від сорту рослини. На початковій стадії ураження сої (фаза сходів) на кутасту плямистість можна спостерігати появу дрібних кутастих некротичних коричневих плям з хлоротичною облямівкою. Також спостерігали появу водянисто-прозорих маслянистих плям, схожих на ті, які викликає збудник пустульного бактеріозу (збудник *Xanthomonas axonopodis* рв. *glycines*). На наступному етапі розвитку хвороб різниця в симптомах більш чітка. **Однак** на більш пізній стадії розвитку некрози, викликані збудником кутастої плямистості (збудник *Pseudomonas savastanoi* рв. *glycinea*), схожі на луснуті пустули пустульного бактеріозу, які зливаються та утворюють суцільні буро-коричневі некротичні або вже «випавші» ділянки (рис. 2).

Бактеріальний опік утворює світло-бурі некротичні плями різних розмірів **часто** неправильної форми, оточені широким жовтим ореолом. Хвороба **з'являється** спочатку на листах нижнього ярусу, чим відрізняється від збудника кутастої плямистості і швидко розповсюджується у вологу погоду. Плями збільшуються, некротизуються і утворюють великі ділянки ураженої **тканини найчастіше** по краю листка з хлоротичним ореолом. Таким чином, протягом усього періоду вегетації симптоми у певні

періоди нагадують ураження, які характерні для кутастої плямистості та пустульного бактеріозу або бактеріального опіку на кінцевій стадії. Тобто на пізній стадії розвитку інфекції тільки ізоляція патогена може забезпечити достовірну діагностику (рис. 2).

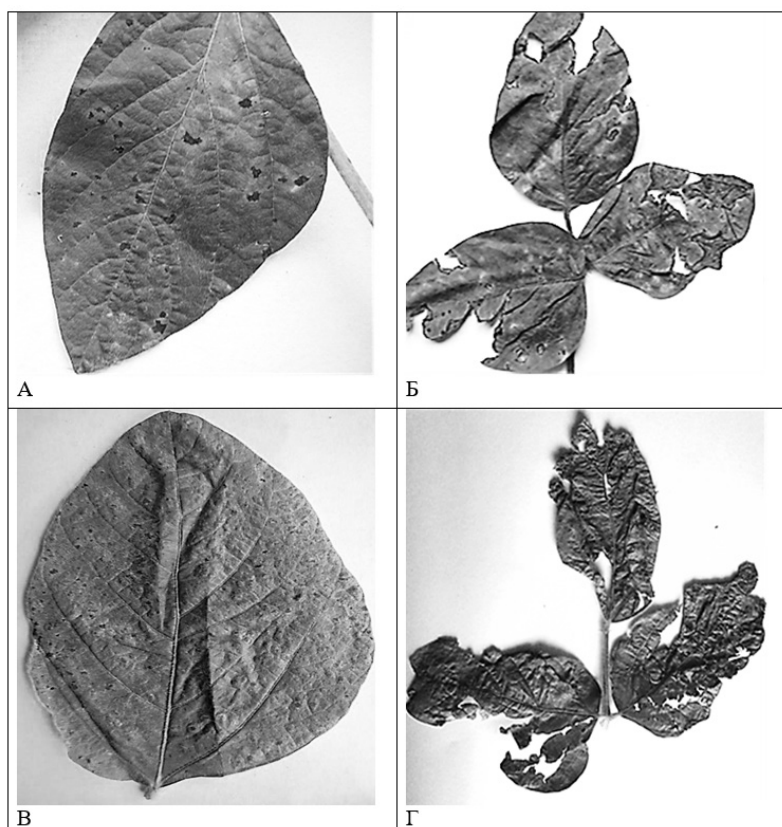


Рис. 2. Симптоми природнього ураження сої (А, В – фаза бутонізації та цвітіння; Б, Г – фаза наливу та досягання зерна): А, Б – симптоми, що викликані збудником кутастої плямистості; В, Г – симптоми, що викликані збудником пустульного бактеріозу

Смугастість стебла (збудник *Pantoea agglomerans*) уражує переважно стебла, черешки та жилки. У фазі цвітіння рослин на нижній частині стебла з'являються червоно-коричневі, **пурпурові** подовжені плями та смуги. Ураження на стеблах особливо небезпечні, так як вони поступово охоплюють усе стебло. За ураження стебла сої збудником кутастої плямистості на стеблах розвиваються подовжені світло-коричневі плями, які згодом темніють, стають чорно-коричневими, розтікаються по стеблу, нагадуючи смуги. **Таким чином**, у певний період розвитку хвороб на стеблі симптоми схожі, а деякі характерні ознаки прояву захворювання можуть маскуватися у природніх умовах дією біотичних і абіотичних факторів, **і тільки** лабораторна діагностика може підтвердити діагноз і результати моніторингу (рис. 3).

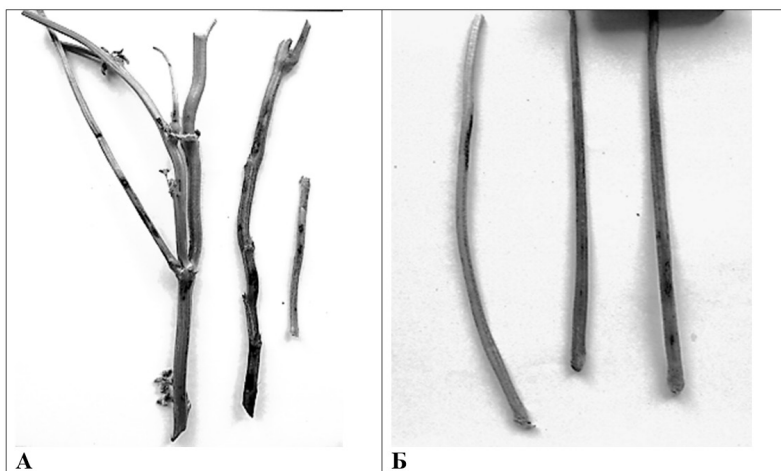


Рис. 3. Симптоми природнього ураження стебла сої (фаза бутонізації та цвітіння):
 А - симптоми смугастості стебла, викликані *Pantoea agglomerans*; В - симптоми кутастої плямистості на стеблі сої, викликані *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

За період 2010 – 2017 рр. було проаналізовано 1729 зразків рослин сої з характерними бактеріальними ураженнями (табл.1). З них **було** виділено 1271 ізолят, а після бактеріологічного аналізу було відібрано 860 бактеріальних культур для подальшої роботи. Відібрані культури за симптомами ураження та морфологією колоній розподілили на декілька типів фітопатогенних збудників бактеріозів сої, **зокрема типу *Pseudomonas***, які становлять найбільшу групу, та три види жовтопігментних (табл.1).

Як видно з таблиці, найбільшу групу ізолятів становлять бактеріальні форми, які за морфотипом колоній можна попередньо віднести до фітопатогенів роду *Pseudomonas*. Тому найбільшу увагу було приділено саме цим ізолятам.

При визначенні їх культурально-морфологічних властивостей встановлено, що колонії відібраних ізолятів мали типовий вигляд для представників *P. savastanoi* pv. *glycinea* та інших фітопатогенних псевдомонад [13]. Аналіз показав, що це негативні за Грамом, неспорогенні, рухливі палички, рух – поступальний, що характерно для монотрихів, оксидазота **каталазонегативних**. При рості на м'ясо-пептонному бульйоні досліджувані бактеріальні культури утворювали рівномірний ріст по всій площі рідини та плівку, що також характерно для збудників бактеріозів роду *Pseudomonas*.

Як видно з таблиці 3, більшість відібраних ізолятів проявили або максимально високу, або **наближену** до максимальної агресивність (3–4 бали) до всіх частин рослини сої: стебла, листя і бобів. Особливо чутливими до досліджуваних ізолятів були боби сої. Ті ізоляти, які проявили низький або середній рівень агресивності, є потенційно небезпечною групою збудників, які в залежності від зміни умов навколишнього середовища можуть підвищити свою агресивність. 69 ізолятів були включені з досліджень як невірулентні сапрофіти. Ці ізоляти, на відміну від вірулентних, не давали реакції надчутливості на тютюні (рис.4), що є методом експрес-діагностики належності бактеріальних культур до

Таблиця 1

Фітопатологічний аналіз зразків сої

Роки	Зразки			Кількість ізолятів				
	проаналізовано	З яких ізольовано бактерій	Ізольовано для подальшого вивчення	Жовтопігментні			Сіро-білі, напів-прозорі, типу <i>Pseudomonas</i>	білі, непрозорі
				типу <i>Raptoea agglomerans</i>	типу <i>Xanthomonas</i>	типу <i>Curtobacterium</i>		
2010	148	113	92	18	24	9	39	2
2011	132	98	77	12	18	7	34	6
2012	318	202	132	8	33	17	61	13
2013	635	468	307	36	63	41	130	46
2014	175	137	72	7	21	10	22	12
2015	110	95	60	9	19	10	20	2
2016	112	80	63	7	22	8	24	2
2017	90	78	57	8	18	10	20	1
Всього	1729	1271	860	105	218	112	350	84

фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas*. Таким чином, визначення вірулентних властивостей показало високий рівень агресивності переважної кількості ізолятів.

Таблиця 3

Вірулентні властивості досліджуваних новоізольованих бактеріальних культур уражених рослин сої (сорт «Горлиця»)

Кількість ізолятів	Ступінь вірулентності у балах			
	стебло	листя	боби	РНЧ
47	4	4	4	+
29	4	3	4	+
27	3	4	4	+
26	3	3	4	+
63	2	3	4	+
28	3	3	3	+
23	1	3	3	+
25	2	2	2	+
10	1	1	2	+
3	0	3	3	0
69	0	0	0	0

Примітка: цифрова позначка – ступінь вірулентності ізоляту [6], «0» – сліди від штучного уколу шприцем [6], «+» – позитивна реакція РНЧ

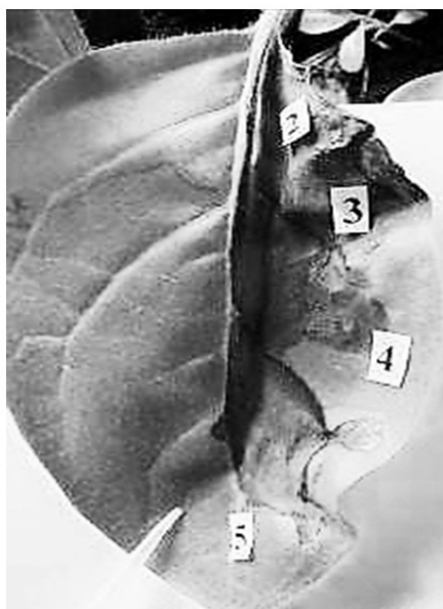


Рис. 4. Приклад реакції надчутливості на тютюні новоізольованих з сої фітопатогенних бактерій, попередньо віднесених до роду *Pseudomonas*: 2, 3, 4 – приклад некрозу, викликаного новоізольованими культурами, 5 – некроз, викликаний колекційним штамом *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* IMB – В-9176

Для подальшої ідентифікації проведено дослідження фізіолого-біохімічних властивостей новоізольованих бактеріальних культур (табл.4).

Як еталони використані типові колекційні фітопатогенні псевдомонади тих патоварів, які найчастіше зустрічаються на зернобобових.

Таблиця 4

Фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas*

Тести	Штами						
	<i>P. savastanoi</i> <i>pv. glycinea</i> IMB 9176	<i>P. syringae</i> <i>pv. syringae</i> IMB-8511	<i>P. savastanoi</i> <i>pv.</i> <i>phaseolicola</i> IMB-9066	Кількість ново-ізольованих штамів			
				25	129	28	3
Глюкоза анаеробно	-	-	-	-	-	-	-
Глюкоза, арабіноза, рафіноза, фруктоза, манітол	к	к	к	к	к	к	к
Лактоза	-	-	-	-	-	-	-
Сахароза, галактоза	к	к	-/к	к	к	к	к
Рамноза	-	-	к	-	-	к	к
Маноза	+/-	к	к	к	к	к	к
Ксилоза	к	-	к	-	к	к	-
Мальтоза	-	к	-	к	-	-	к
Саліцин, дульцитол	-	-	-	-	-	-	-
Гліцерин	к	-	-	-	к	-	к
Сорбітол	-	к	-	к	-	-	к
Інозитол	к	к	к	к	к	к	-
Яблучна та бурштинова к-ти	d	л	d	л	л	л	л
Лакмус	л	л	л	л	л	л	л
Желатин	+/-	-	+/-	+	+	+	+
Згортання казеїну	+/-	-	+/-	-	-	-	-

Примітка: “-” – відсутність ознаки; “+” – наявність ознаки; к – утворення кислоти; л – утворення луку; d – варіабельна ознака.

За здатністю засвоювати деякі вуглеводи та спирти як єдине джерело живлення нові високоагресивні штами є достатньо компактною групою поряд з неатиповим штамом *P. savastanoi* *pv. glycinea*. Досліджувані патогенні ізоляти, які за морфологічними і фізіолого-біохімічними ознаками можуть бути віднесені до роду *Pseudomonas*, використовували як єдине джерело вуглецевого живлення глюкозу, сахарозу, галактозу, арабінозу, ксилозу. Досліджувані бактеріальні культури не змінювали лактозу, мальтозу, рамнозу та дульцит, як і еталонний штам. При рості ізолятів на м'ясо-пептонному бульйоні спостерігався рівномірний ріст та поверхневе кільце; сірководень та індол вони не утворювали (табл.4), що повністю збігається з традиційними ознаками за літературними джерелами для збудника кутастої плямистості сої [13]. За здатністю засвоювати деякі вуглеводи та спирти як єдине джерело живлення нові високовірulentні штами є достатньо компактною групою поряд з неатиповим штамом *P. savastanoi* *pv. glycinea*.

Отримані результати співпадають із ознаками, що описані у визначнику Берджі [13], де допускається певна варіабельність ознак. Три ізоляти, які уражували тютюн і не викликали реакцію надчутливості, практично не відрізнялись від інших за здатністю ферментувати карбогідрати.

Спираючись на дані щодо симптомів ураження, ступеня вірулентності, а також за культурально-морфологічними і фізіолого-біохімічними властивостями, отримані ізоляти розподілили на збудники кутастої плямистості *P. savastanoi* pv. *glycinea* (велика група високоагресивних ізолятів) та *P. syringae* pv. *syringae* (ізоляти з низькою агресивністю) і 3 штами, які уражували сою та тютюн за штучного зараження, але не індукували реакцію надчутливості, віднесено до *P. syringae* pv. *tabaci*.

Для створення бази даних ВОХ-фрагментів і уточнення ідентифікації представників основного збудника хвороб сої *P. savastanoi* pv. *glycinea* (визначено за симптомами ураження, вірулентністю, культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями) проведено ампліфікацію 15-ти штамів *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* та *P. syringae* pv. *tabaci*. У цю групу ввійшли як новоізольовані штами, так і колекційні. Для проведення ампліфікації ВОХ-фрагментів було відібрано три представники нових неколекційних бактеріальних культур (це штами 9мс, 6мс та 12в1), які є найбільш яскравими і типовими за культурально-морфологічними, фізіолого-біохімічними та вірулентними властивостями представниками дослідних ізолятів.

У результаті ампліфікації цих штамів отримано 10 фрагментів, довжина яких знаходилась в діапазоні 3000–200 п.н. (рис. 5). Для усіх патоварів та штамів *Pseudomonas savastanoi* характерні фрагменти на відстані 200 п.н. У всіх патоварів та штамів *Pseudomonas syringae* є спільні фрагменти на відстані 300, 2000 та 2500 п.н. Інші ж фрагменти групуються в залежності від близькості штамів у обох видів.

На побудованій дендрограмі (рис.6) спостерігається розділення штамів на два кластери: до першого кластера увійшли представники виду *P. savastanoi*, а до другого – *P. syringae*, але в жодному кластері немає розділення на патовари.

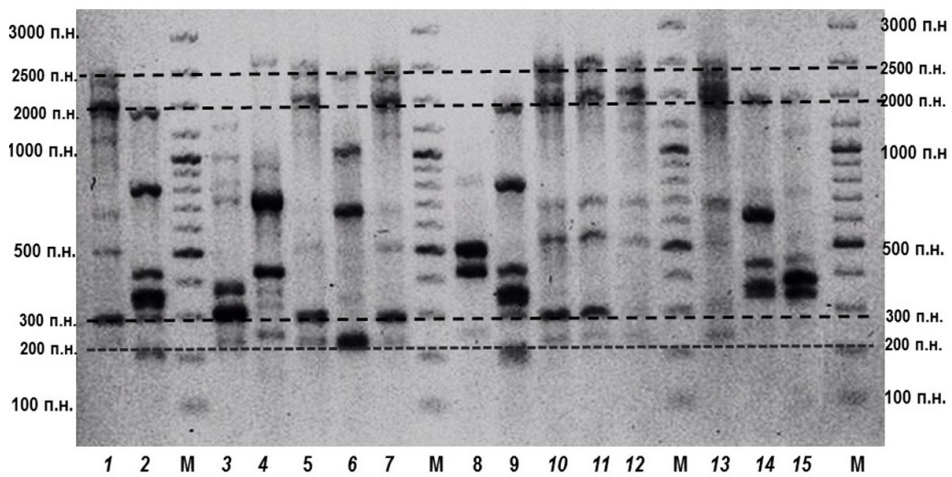


Рис. 5. Електрофореграма розподілу продуктів ПЛР геному *Pseudomonas savastanoi* та *Pseudomonas syringae* з використанням ВОХ-A1R праймера

P. syringae pv. *syringae*: 1 – 8511, 14 – 8543, 15 – 8570; *P. syringae* pv. *tabaci* : 13 – 223; *P. savastanoi* pv. *glycinea*: 2 – 9073, 3 – 9072, 4 – 8531, 6 – 9074, 7 – 9174, 10 – 8531; *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*: 11 – 4012, 12 – 9066; новоізольовані: 5 – 9мс, 8 – 6мс, 9 – 12в1; М – маркер молекулярної маси.

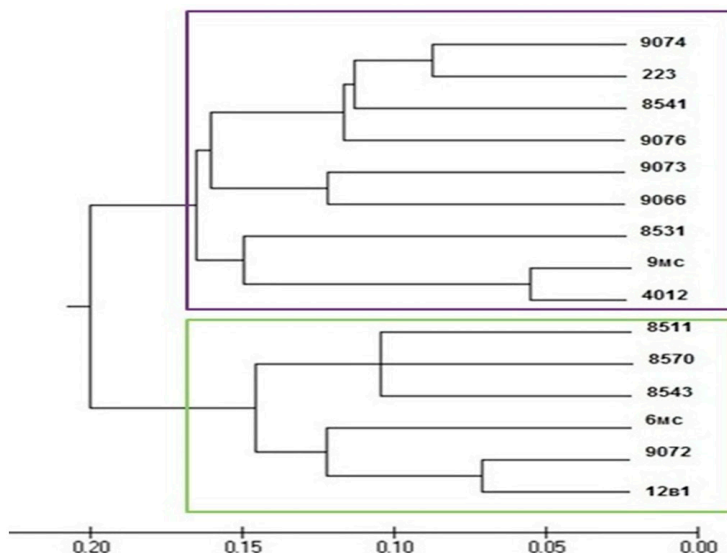


Рис. 6. Дендрограма кластерного аналізу, побудована методом UPGMA

P. savastanoi pv. *glycinea* – штами 9074, 9072, 8541, 9076, 9073, 8531;
P. savastanoi – *phaseolicola* – штами 9066, 4012; новоізолювані штами – 9мс, 6мс, 12в₁;
P. syringae pv. *tabaci* – штам 223; *P. syringae* pv. *syringae* – штами 8570, 8543, 8511.

Отже, встановлено, що відібрані дослідні новоізолювані штами відносяться до видів *P. savastanoi*, *P. syringae* та *P. syringae* pv. *tabaci*. Таким чином, використання методу ВОХ-ПЛР для фітопатогенних псевдомонад дозволяє ідентифікувати їх до виду, але не до патовару.

Отримані результати з ідентифікації та вивчення біологічних властивостей збудника кутастої плямистості сої підтвердили дані польових досліджень щодо розповсюдження бактеріальних збудників сої роду *Pseudomonas*, зокрема найбільш агресивного серед них *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

Відомо, що *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* – збудник кутастої плямистості сої вважається монофагом в колі бактеріальних хвороб зернобобових рослин, які викликані патогенами роду *Pseudomonas*. Однак визначення його домінування серед псевдомонад на посівах сої поставило запитання про потенційну загрозу й іншим зернобобовим рослинам. Тому у зв'язку з високою агресивністю і найбільшою поширеністю домінуючого збудника *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* проведено порівняльне штучне зараження ряду зернобобових рослин досліджуваними новоізолюваними та еталонними колекційними штамами (табл. 5).

Із результатів штучного перехресного зараження зернобобових рослин (соя, квасоля і нут) колекційними культурами виду *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (табл.5) та новоізолюваними (протягом 7-и років) патогенами встановлено, що усі новоізолювані штами мають високий ступінь агресивності. Переважна більшість штамів у більшому чи меншому ступені уражує не тільки сою, а й квасолю, а інколи і нут, що свідчить про спроможність збудників бактеріозів сої становити певну загрозу і іншим зернобобовим культурам, що підтверджується нашими даними та даними літератури [2, 3, 6]. Крім того, довготривале збереження бактеріальних

культур (від 50-ти років і більше) впливає на їх агресивність дуже вибірково. Штами, які втратили свою агресивність, серед *P. pv. glycinea* відсутні: виявлено тільки такі, у яких вона значно знизилася – 8541, 8542, 8570; *Pseudomonas savastanoi* *pv. glycinea*, які зберігаються в колекції 10–20 років, переважно зберігають свою агресивність від середнього до максимального балів за п'ятибальною шкалою, як і патотиповий штам (8571). **Таким чином**, даний вид спроможний зберігати свої агресивні властивості навіть в лабораторних умовах протягом десятиріч.

Таблиця 5

Вірулентні властивості досліджуваних колекційних штамів *Pseudomonas savastanoi* *pv. glycinea* та новоізольованих із сої

Фітопатогенні бактерії	Соя (сорт Горлиця)			Квасоля (сорт Мавка)			Нут (сорт Триумф)		
	стебло	листя	боби	стебло	листя	боби	стебло	листя	боби
ІМВ-8541	2	3	3	1	2	2	1	0	2
ІМВ-8542	1	1	2	1	2	2	1	3	1
ІМВ-8570	2	1	2	2	2	2	2	0	2
ІМВ 8571	3	3	3	1	1	3	1	0	3
ІМВ-9070	2	3	3	2-3	1	4	2	0	2
ІМВ-9073	4	2	4	3	3	3	0	3	1
ІМВ-9074	4	4	4	2	2	3-4	3	1	2-3
ІМВ 9176	2	4	4	0	1	2	1	1	2
Досліджувані штами (кількість)									
24	3	4	4	0	1	0	3	3	3
12	1	3	3	0	1	0	1	2	0
25	4	4	4	2	2	2	2	2	2
18	4	4	4	1	1	1	2	1	1
19	4	3	4	1	2	4	2	2	1
21	3	4	4	1	3	3	2	1	2
11	4	4	4	2	3	3	3	0	3

Примітка: облік проведено за п'ятибальною шкалою [11].

Обговорення. Ретельне вивчення симптоматики розвитку патогенного процесу при ураженні бактеріозами сої, зокрема збудником кутастої плямистості, показало наявність ряду нових тенденцій і закономірностей в сучасних умовах землеробства в Україні. На різних фазах росту рослини, різних циклах розвитку бактеріальної популяції, при зміні погодних умов та високого антропогенного навантаження симптоми бактеріального ураження можуть бути схожі між собою і ураженням збудником грибних хвороб (таких, як несправжня борошниста роса *Peronospora manshurica* S. або антракноз *Colletotrichum lindemuthianum* та інші), а також нагадувати стан, викликаний рядом абіотичних факторів. **Таким чином**, моніторинг поширення збудника потрібно постійно контролювати ізоляцією та ідентифікацією патогена. Багаторічний моніторинг збудників бактеріозів сої в Україні дозволив визначити, що серед широкого кола патогенів сої [6] *Pseudomonas savastanoi* *pv. glycinea* займає провідне місце. Перевірка вірулентних властивостей ізолятів, які були віднесені за культурально-морфологічними властивостями до роду *Pseudomonas*, показала високий ступінь агресивності до сої більшості бактеріальних культур (табл.3).

Однак серед високо агресивних культур звертає на себе увагу невелика кількість ізолятів, які проявляють низьку агресивність до рослини-хазяїна. Це перш за все ті культури, які не дають реакції надчутливості на тютюні. Реакція полягає в швидкому визначенні патогена рослиною та у розвитку патологічних процесів, які ведуть до локалізації збудника захворювання в ділянці його проникнення шляхом швидкої некротизації клітин рослини і загибелі патогену (рис.4). За допомогою реакції надчутливості на тютюні (РНЧ) можна відокремити *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* від інших фітопатогенних збудників роду *Pseudomonas*. Тому ті штами, які не давали **позитивного результату** РНЧ на тютюні, але уражували тютюн і в невисокому ступені проявляли агресивність на сої, були нами визначені як *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Таким чином, за патогенними, морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями 129 штамів віднесено до *P. savastanoi* pv. *glycinea*, 25 – до *P. syringae* pv. *syringae*, 28 – до *P. savastanoi* pv. *phaseolica* та 3 – до *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Дослідження методом ВОХ-ПЛР показало, що цей метод для фітопатогенних псевдомонад дозволяє ідентифікувати їх до виду, але не до патовару. Створено базу профілів ВОХ-фрагментів для колекційних штамів *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolica*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Встановлено, що за фенотиповими та генотиповими ознаками більшість високо агресивних штамів належить до *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Ідентифікацію збудників бактеріозів сої роду *Pseudomonas* потрібно проводити на основі симптоматики та фенотипових і генотипових властивостей.

Здатність досліджуваного збудника проявляти високий рівень агресивності як в польових умовах, так і після зберігання протягом багатьох десятиріч в умовах лабораторії, вірогідно, і обумовлює його високу шкодочинність на посівах сої, а також потенційну небезпеку для інших зернобобових.

Сучасні екологічно-кліматичні зміни та високе антропогенне навантаження обумовлюють на посівах сої (і на інших рослинних культурах) тенденції до появи чи завезення нових фітопатогенів, розширення кола рослин-хазяїв монофагами, «селекцію» пестицидами збудників хвороб, перехід від умовно-патогенних збудників до агресивних, необхідність моніторингу та дослідження біологічних властивостей основних бактеріальних патогенів сої, зокрема *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, збудника кутастої плямистості [19].

Отже, у результаті моніторингу збудників бактеріальних хвороб сої обґрунтовано і експериментально підтверджено, що фітопатогенні бактерії роду *Pseudomonas* є домінуючими, а найбільш чисельним є збудник кутастої плямистості *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Ідентифікацію збудників бактеріозів сої роду *Pseudomonas* рекомендовано проводити на основі симптоматики та фенотипових і генотипових властивостей. Створено базу профілів ВОХ-фрагментів для колекційних штамів *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolica*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Встановлено, що метод ВОХ-ПЛР дозволяє ідентифікувати фітопатогенні псевдомонади до виду, але не до патовару.

БОЛЕЗНИ СОИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

Т.Т. Гнатюк¹, Н.В. Житкевич¹, В.Ф. Петриченко²,
А.В. Калиниченко³, В.П. Патыка¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

²Институт кормов и сельского хозяйства Подолья НААН Украины,
проспект Юности, 16, Винница, 21100, Украина

³Опольский университет, ул. Дмовского, 1/3, Ополе, 43-365, Польша

Резюме

Цель. Обосновать и экспериментально подтвердить роль бактерий рода *Pseudomonas* в патогенезе сои и изучить биологические свойства доминирующего возбудителя *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. **Методы.** Теоретическое обобщение, лабораторно-модельные исследования, фитопатологические, микробиологические, физиологические, биохимические и молекулярно-генетические. **Результаты.** Установлено, что в различных почвенно-климатических зонах Украины наибольшую группу патогенов составляют бактерии рода *Pseudomonas*. Предложены методы идентификации доминирующего вида фитопатогенной бактерии *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, которая вызывает угловатую пятнистость сои. **Выводы.** Многолетний мониторинг посевов сои районированных сортов различных почвенно-климатических зон Украины показал, что одним из доминирующих возбудителей бактериозов является *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в кругу бактериальных патогенов этого растения. Создана база профилей BOX-фрагментов для коллекционных штаммов *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Метод BOX-ПЦР позволяет идентифицировать фитопатогенные псевдомонады до вида, но не до патовара. Показано, что идентификацию возбудителей бактериозов сои рода *Pseudomonas* нужно проводить на основе симптоматики и полифазной таксономии.

Ключевые слова: соя, фитопатогенные бактерии, угловатая пятнистость, биологические свойства, полимеразная цепная реакция.

SOYBEAN DISEASES CAUSED BY GENUS PSEUDOMONAS PHYTOPATHENES BACTERIA

Т.Т. Hnatiuk¹, N.V. Zhitkevich¹, V.F. Petrychenko²,
A.V. Kalinichenko³, V.P.Patyka¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

²Institute of Forage and Agriculture of Podillya, NAAN of Ukraine,
16 Yunosty Prospect, Vinnytsia, 21100, Ukraine

³University of Opole, Poland, 7-9 Dmowskiego Str., Opole, 45-365, Poland

Summary

Objective. The rationale and experimental confirmation of the role of the bacteria of the *Pseudomonas* genus in the pathogenesis of soybean, and the investigation of the biological properties of the main causative agent *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. **Methods.** Theoretical generalization, laboratory-model research, phytopathological, microbiological, physiological, biochemical and genetic methods. **Results.** The largest

group of pathogens in different soil-climatic zones of Ukraine consists of bacteria of the genus *Pseudomonas* was established. Their biological properties have been investigated and the methods for identification of the dominant type of phytopathogenic bacteria causing bacterial blight of soybean, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, have been proposed. **Conclusions.** Long-term soybean crops monitoring of regionalized varieties in different soil-climatic zones of Ukraine has shown that the one of the dominant bacterial pathogens is *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in the range of bacterial pathogens of this plant. A database of BOX-fragments profiles for *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* collections strains was created. The BOX-PCR method allows identification phytopathogenic pseudomonads to the species level, but not to the pathovar. Was shown that for *Pseudomonas* soybean bacteriosis identification should be used symptomatology and polyphase taxonomy methods.

Keywords: phytopathogenic bacteria, soybean, bacterial blight of soybean, biological properties, polymerase chain reaction.

1. Petrichenko VF, Likhchvor VV, Ivanyuk SV, Korniychuk OV, Kolisnik S.I., Kobak S.Y. et al. Soya: monograph - L 65 Vinnitsa: «Dilo»; 2016. 400 p. Ukrainian.
2. Patyka VP, Petrichenko VF, Pasichnyk LA, Zhytkevych NV, Gulyaeva GB, Tokovenko IP, Gnatyuk TT. et al. Diseases of soybean: monitoring, diagnostics, protection: [monograph]; Edited by Academicians NAAN VP. Patyka, VF. Petrychenko - Vinnytsia: "Vindruk"; 2018. 106 p. Ukrainian.
3. Zhitkevich NV, Zhmurko LG. [Distribution of bacterial diseases of soy in the Kiev region]. Visnik Odessa National University. (Biology). 2005; 10(7):244–248. Ukrainian.
4. Fartushniak AT., Fartushniak G B. Raspostronenie bolezei v lesostepi Ukraine i zadachi selekcii na imunitet. "Nauchno-tehn. boil. SOVASHNIL". – 1987; 29:38–42. Ukrainian
5. Patyka V, Buletsa N, Pasichnyk L, Zhitkevich N., Kalinichenko A, Gnatiuk T et al. [Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria]. Ecological Chemistry and Engineering, 2016;. 23(2):311–331. Ukrainian.
6. Gvozdak RI, Pasichnik LA, Yakovleva LM, Moroz SM., Litvinchuk OO, Zhitkevich NV et al. Phitopatogenni bakterii. In: Patyka V.P editors. Kyiv: Scientific-Production Enterprise InterService Ltd.; 2011:442 p. Ukrainian.
7. Patyka V, Gvozdiak R, Dankevich L, Zhytkevych N Diagnosis of bacteria of the genus *Pseudomonas* – pathogens of bacterial diseases of legumes. methodical recommendations. – Kyiv; 2007:26 p. Ukrainian.
8. Dankevych LA, [Phenotypical and genotypical characteristics of the pathogen in lupine bacterial brown spottiness]. Mikrobiol Z. 2006; 68(6):20–27. Ukrainian.
9. Patyka VP, Pasichnyk LA, Dankevich LA, Moroz SM, Butsenko LM, Zhytkevych NV Diagnostika phitopatogennih bakteriy. In: Patyka VP, editors. Kyiv. 2014:76 p. Ukrainian.
10. Shkalikov VA et al. Protection of plants from diseases. M: Kolos; 2004: 255 p.
11. Patyka VP, Pasichnyk LA., Gvozdiak RI., Petrichenko VF, Korniychuk OV, Kalinichenko AV et al. Phytopathogenic bacteria. Methods of research. In: Patyka VP, editors. Vinnitsa: Windroek LLC; 2017. 2:432. Ukrainian.

12. Klement Z, Rudolf K, Sands D. Methods in phytobacteriology. Budapest: Academia Kiado; 1990; 568 p.
13. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: DR. Boore, RW. Castenholz, GM. Garrity editors. 2nd ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer; 2005; 2(B):1106.
14. http://www.galartdiag.ru/files/diatom_dna_prep_200.pdf
15. <http://meyerinst.com/imaging-software/image-pro/gel/index.htm>
16. Dijkshoorn L., Towner K. J. and Struelens M. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Amsterdam: ELSAVIER, 2001. 371 p.
17. <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>
18. Hwang MS, Morgan RL, Sarkar SF, et al. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(9):5182–5191.
19. Kalinichenko A, Havrysh V, Perebyynis V. Evaluation of biogas production and usage potential. Ecological Chemistry and Engineering. 2016; 23(3):387–400.

Отримано 5.12.2018