УДК 632.35:634.1

Л.А. Данкевич, С.К. Воцелко, Т.М. Щербина, В.П. Патика

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

ФЕНОТИПОВА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *ERWINIA* – ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ ЯБЛУНІ В УКРАЇНІ

Мета*. Вивчити фенотипові властивості ізольованих штамів Erwinia sp. та колекційних штамів «Erwinia horticola» для їх ідентифікації.* ***Методи.*** *Патогенність та агресивність штамів перевіряли шляхом штучного ураження бруньок яблуні і груші, а також нестиглих плодів груші. Фізіолого-біохімічні властивості бактерій досліджували, використовуючи API тестування (API 20E та API 50CH тест системи). Вивчення жирнокислотного складу клітинних ліпідів здійснювали методом газової хроматографії.* ***Результати.*** *Аналіз патогенних, морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей, а також жирнокислотного складу ліпідів клітин вказує на значну подібність колекційних «Erwinia horticola» і ізольованих Erwinia sp. штамів з представниками виду Erwinia amylovora.* ***Висновки****. Одержані нами результати ставлять під сумнів існування окремого виду «Erwinia horticola». Але для остаточного з'ясування видового статусу досліджуваних штамів необхідно вивчити їх генотипові властивості.*

К л ю ч о в і с л о в а: Erwinia sp., «Erwinia horticola», Erwinia amylovora, фенотипові властивості.

Фітопатогенні бактерії, що належать до роду *Erwinia,* завдають значної шкоди рослинництву і садівництву [1, 3, 5, 10]. Типовим представником даного роду є *Erwinia amylovora* – збудник бактеріального опіку плодових, що уражує близько 170 видів рослин, зокрема, рослини родини *Rosaceae* [1, 3, 8]. Завдяки високій агресивності та поліфаговості даний збудник занесений до списку карантинних об'єктів у більшості країн світу, у тому числі в Україні [3, 10]. Але, не зважаючи на всі заходи із запобігання поширенню *Erwinia amylovora,* починаючи з 1997 року спалахи даного захворювання періодично реєструють у західних, північних і південних областях України [1, 5]. Також відомо, що у 1963–1974 роках К.Г. Бельтюковою, Р.І. Гвоздяком із колегами було виділено у чисту культуру та ідентифіковано за комплексом ознак фенотипу збудника чорного бактеріозу, що уражує яблуню, грушу і бук – «*Erwinia horticola»* [1]. Та, не зважаючи на детальне вивчення фенотипових властивостей, значну шкодочинність і подібність окремих симптомів до збудника бактеріального опіку плодових, таксономічний статус даного фітопатогену залишився невизначеним [8]. Крім того, згідно даних сучасної таксономії, викликати аналогічні до *Erwinia amylovora* симптоми ураження різних гібридів груші можуть представники близькоспоріднених видів *Erwinia pyrifoliae, Erwinia pyriforinigrans* та *Erwinia uzenensis* [8, 13, 14]. Саме тому, в останні роки для ідентифікації ізольованих з уражених плодових культур штамів *Erwinia* sp. використовують поліфазний підхід, що полягає у дослідженні комплексу їх фізіолого-біохімічних ознак, жирнокис-

© Л.А. Данкевич, С.К. Воцелко, Т.М. Щербина, В.П. Патика, 2016

лотного складу клітинних ліпідів, гомології нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК, ДНК-ДНК реасоціації, подібності плазмідного профілю, фінгеринтування геному тощо [8, 11, 12]. Тому метою наших досліджень було вивчення ряду ознак фенотипу ізольованих штамів *Erwinia* sp. та колекційних штамів «*Erwinia horticola»* для їх ідентифікації.

Матеріали і методи. Матеріалом для аналізу слугували уражені зразки дерев яблуні, що відібрані на території Київської, Сумської, Запорізької, Херсонської, Одеської та Миколаївської областей протягом 2012−2015 років. Об'єктами досліджень були ізольовані нами з уражених тканин яблуні штами фітопатогенних бактерій *Erwinia* sp. 1я, 2я, 3я, 4я, 5я, 6я, 7я, 8я, 9я, 10я та колекційні штами «*Erwinia horticola»* 8559, 8558, 8560, 8561, 8398, виділені К.Г. Бельтюковою і Л.Т. Пастушенко із уражених дерев яблуні. Для порівняльного аналізу у дослідженнях також використовували типовий штам *Erwinia amylovora* B 1095^T (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) 30165, International collection of microorganisms from plant (ICMP) 1540) та колекційні штами «*Erwinia horticola»* 8793, 8794 і 8557, ізольовані Р.І. Гвоздяком із буку. Штами люб'язно надані з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України та Української колекції мікроорганізмів (УКМ). Патогенні властивості бактерій вивчали шляхом штучного зараження нестиглих плодів груші. Агресивність штамів перевіряли шляхом штучного інфікування бруньок яблуні та груші. Для штучного ураження використовували суспензію однодобових бактерій титром 10^7−10^9 кл/мл. Контролем слугувала стерильна водогінна вода. Облік агресивності штамів здійснювали на 7−10-у добу після інфікування за загальноприйнятою 5-бальною шкалою. Повторюваність дослідів 4-х кратна. Штучне зараження здійснювали у лабораторних умовах з наступним знезараженням рослинного матеріалу. Окремі культуральні та фізіологічні властивості бактерій вивчали загальноприйнятими методами [4]. Також фізіолого-біохімічні властивості бактерій вивчали, використовуючи набори для ідентифікації бактерій (тест-системи) API 20E та API 50CH фірми bioMerieux (Франція), згідно рекомендацій виробника. Закриті кришкою стріпи з мікролунками усіх досліджуваних тест-систем інкубували 24−48 годин за 29 ^{0}C. Бактерії для вивчення жирнокислотного складу клітин культивували на картопляному агарі (КА) протягом 24 годин за температури 29 ^{0}C. Метилові ефіри жирних кислот одержували наступним чином: гідроліз клітин проводили у 5 %-му розчині ацетилхлориду у метанолі протягом 4 годин за 100 ^{0}C, з наступною екстракцією сумішшю ефір-гексан (1:1). Ідентифікацію метилових ефірів жирних кислот проводили за допомогою хроматомасс-спектрометричної системи Agilent 6800N/5973 inert. Метилові ефіри ідентифікували автоматично за часом їх утримання у порівнянні зі стандартами. Вміст жирних кислот визначали за допомогою програмного забезпечення Agilent ChemStation і відображали у відсотках від загальної площі піків.

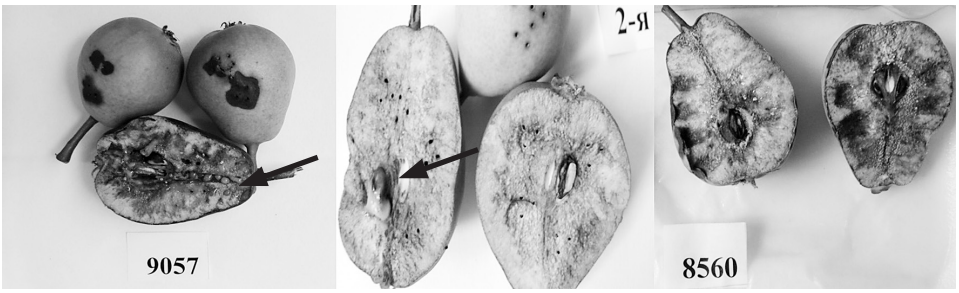
Результати та їх обговорення. У ході фітопатологічного аналізу було діагностовано два типи уражень. Перший тип (90 % усього відібраного ураженого рослинного матеріалу), як правило, характеризувався ура-

женням багаторічних насаджень яблуні, а перебіг хвороби мав характер хронічного. Гілки та стовбур дерев були вкриті овальними плямами різних розмірів, які від живої тканини відділялися тріщинами. Виділення ексудату не спостерігалося. Листя на уражених гілках по краю жовтіло, але не опадало. За результатами попередніх наших досліджень на основі комплексу фенотипових та генотипових властивостей було встановлено, що даний тип захворювання викликає збудник бактеріального некрозу кори − *Pseudomonas syringae* pv. s*yringae* [2]. Другий тип захворювання був зареєстрований у Київській області на площі насаджень близько 200 га. Навесні однорічні насадження яблунь не починали розвиток бруньок (рис. 1). Молоді, не задерев'янілі пагони змінили свій колір від насиченого зеленого до темно- або світло-коричневого та були зігнуті у вигляді гачка (рис. 1).

Рис. 1. Симптоми природного ураження однорічних насаджень яблуні (стрілками позначені уражені пагони, що набули вигляду гачка)

На гілках та стовбурі спостерігали виразки клиноподібної форми. З ран яблунь при розміщенні у стерильній вологій камері витікав ексудат, з якого легко виділявся збудник. З уражених дерев яблуні було виділено понад 40 ізолятів з яких, за результатами первинного скринінгу, у подальші дослідження було відібрано 10 штамів. Більшість ізольованих штамів уражували зелені плоди груш з характерними ознаками. При штучному інфікуванні нестиглих плодів груш, що є тестом для перевірки патогенності *Erwinia amylovora,* спостерігали появу темно-коричневих плям, що проникали у середину плоду. З часом у місці ураження з'являлися краплі молочно-білого ексудату, що є специфічним симптомом при ураженні дерев збудником опіку плодових (рис. 2б). Натомість колекційні штами «*Erwinia horticola»* хоча і викликали характерні ураження тканин плодів груш, але виділення ексудату ми не спостерігали (рис. 2в).

Усі включені у дослідження штами здатні викликати характерні ураження гілок яблуні та груші на стадії набухання бруньок. Зокрема, на бруньках гілок яблуні та груші спостерігали поступову зміну кольору квіток від білого до світло- та темно-коричневого. Цвіт та окреме листя засихало, але не опадало. Поступово інфекція поширювалася на всю гілку, що в'янула та засихала (рис. 3). Усі включені у дослідження штами гетерогенні за рівнем агресивності (рис. 4). Слід відзначити, що рівень агресивності колекційних штамів «*Erwinia horticola»,* ізольованих з яблуні, був дещо вищим (4,2−5,0 бали) порівняно з аналогічними показниками



а б в

Рис. 2. Симптоми штучного ураження плодів груші: а – *Erwinia amylovora* В 1095^{T}; б – *Erwinia* sp. 2я; в − «*Erwinia horticola*» 8560 (стрілками позначені місця виділення ексудату)

у виділених нами із яблуні штамів *Erwinia* sp. (3,6−4,8 бали). Натомість агресивність колекційних штамів «*Erwinia horticola*», ізольованих з буку, була найнижчою серед усіх протестованих штамів (3,5−4,0 бали).

а б в

г д е

Рис. 3. Симптоми штучного ураження пагонів (г, е), суцвіть (д) та листя (е) груші (а, д) та яблуні (б, в, г, е) колекційними штамами «*Erwinia horticola*» та ізольованими штамами *Erwinia* sp. (стрілками позначені місця ураження)

Отже за результатами дослідження патогенних властивостей колекційні штами «*Erwinia horticola*» та ізольовані штами *Erwinia* sp. подібні до представників виду *Erwinia amylovora* та близькоспоріднених видів [6]. Але подібність симптомів, що викликають окремі представники роду *Erwinia* при інфікуванні плодових дерев, не дає змоги остаточно ідентифікувати дані штами виключно за патогенними властивостями [5, 13, 14].

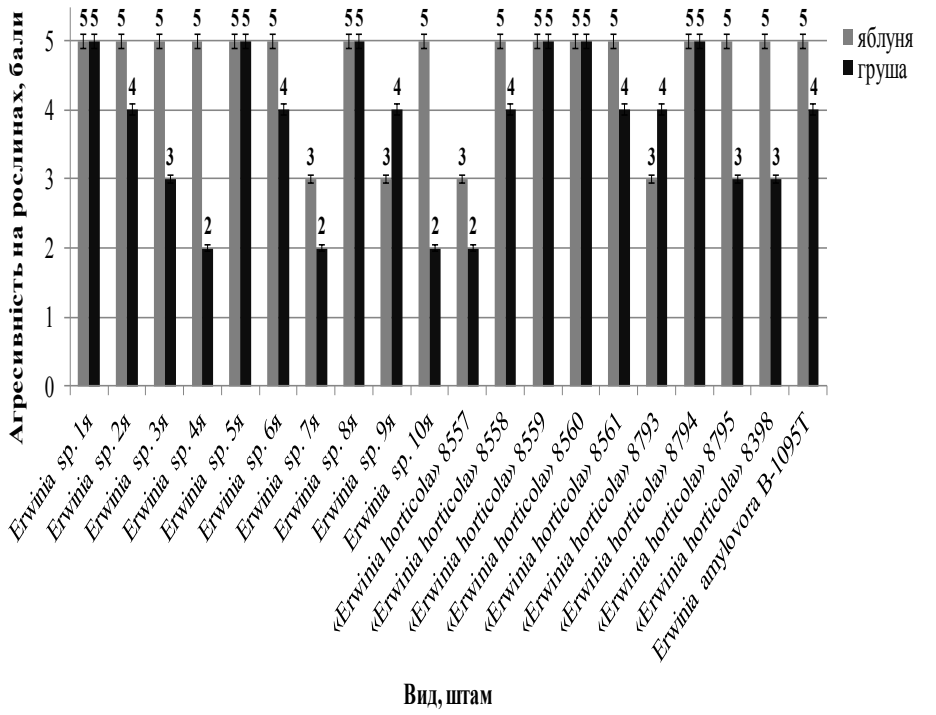


Рис. 4. Агресивність колекційних штамів «*Erwinia horticola*», ізольованих штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *Erwinia amylovora* на яблуні та груші за умов штучного інфікування

Тому нами був проведений порівняльний аналіз морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей досліджуваних штамів з типовими представниками близькоспоріднених з *Erwinia amylovora* видів.

Усі досліджувані штами за морфологією клітин є прямими рухливими паличками, що розташовувалися поодинці або парами, грамнегативні і не утворювали спор. На картопляному агарі утворювали невеликі блискучі сірувато-білі напівпрозорі колонії з рівними краями.

За результатами API тестування усі досліджені штами не утворювали індол та сірководень, не відновлювали нітрати та не використовували цитрати, але розріджували поступово желатин та продукували ацетоїн. Як більшість колекційних штамів «*Erwinia horticola*», так і ізольовані штами *Erwinia* sp. та типовий штам *Erwinia amylovora* В 1095^T синтезували каталазу, але не утворювали β- галактозидазу, аргініндирідролазу, лізиндекарбоксилазу, орнітиндекарбоксилазу, триптофандезаміназу, оксидазу, уреазу (табл. 1). Усі штами продукували кислоту на середовищі з додаванням D-глюкози (аеробно та анаеробно), D-сахарози, L-арабинози, D-маніту, D-сорбіту, D-рибози, D-фруктози, D-трегалози та розщеплювали N-ацетилглюкозамин. Натомість, досліджені штами не використовували як єдине джерело живлення амігдалін, L-рамнозу, D-арабінозу, L-сорбозу, D-мальтозу, D-лактозу, D-туранозу, D-ліксозу, D-тагатозу, D і L -фукозу, еритритол, D-адонітол, дульцитол, гліцерин, арбутін, саліцин, інулін, крохмаль, глікоген, ксиліт, D і L-арабітол, метил-βD-ксилопіранозид,

Таблиця 1

Фізіолого-біохімічні властивості* колекційних «*Erwinia horticola*» та ізольованих штамів *Erwinia* sp., що уражують яблуню

Ознака	Вид, штам			
	ізольовані штами *Erwinia* sp. (10 шт)	Колекційні штами «*Erwinia horticola*»		*Erwinia amylovora* B 1095^T
		ізольовані з яблуні (6 шт)	ізольовані з буку (4 шт)	
Забарвлення по Граму	-	-	-	-
Рухливість	+	+	+	+
Утворення індолу та сірководню	-	-	-	-
Розрідження желатину	+	+	-/W	+
Відновлення нітратів та використання цитратів	-	-	-	-
Продукція ацетоїну (реакція Фогеса-Проскауера)	+	+	-/W	+
Наявність ферментів:				
β-галактозидази	-	-	-	-
аргініндирідролази	-	-	-/W	-
лізиндекарбоксилази	-	-	-	-
орнітиндекарбоксилази	-	-	-	-
триптофандезамінази	-	-	-	-
каталази	+	+	+	+
оксидази, уреази	-	-	-	-
Збродження:				
D-глюкози (аеробно та анаеробно)	+	+	+	+
D-сахарози, L-арабінози	+	+	+	+
D-мелібіози	-	-	-/W	-
L-рамнози	-	-	-/W	-
D-маніту, D-сорбіту	+	+	+	+
інозиту	W	W	W	-
амігдаліну	-	-	-	-

Примітки: * − результати, отримані з використанням тест-системи API 20E; «+» − реакція позитивна; «-» − реакція негативна; «W» − реакція слабко позитивна.

метил-αD-манопіранозид, метил-αD-глюкопіранозид, калію глюконат, калію 2-кето глюконат, калію 5-кето глюконат (табл. 2). Як колекційні штами «*Erwinia horticola*», так і ізольовані штами *Erwinia* sp. інколи давали слабко позитивну реакцію на середовищі з додаванням інозиту, D і L-ксилози, D-галактози, D-манози, D-целобіози, ескуліну, L-рамнози, β-гентиобіози, D-рафінози. Штами «*Erwinia horticola*», ізольовані з буку, також давали слабко позитивну реакцію на середовищі з D-мелібіозою та L-арабінозою. Отже, як колекційні штами «*Erwinia horticola*», так і ізольовані штами *Erwinia* sp. подібні до типового штаму *Erwinia amylovora* B 1095^T за ключовими морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями, що корелюють з даними літератури [8]. Зокрема,

J. Mergaert із співавторами зробили спробу нумерологічної таксономії 123 штамів 18 видів, що раніше належали до роду *Erwinia*, використовуючи API тестування [15].

Таблиця 2

Використання колекційними «*Erwinia horticola*» та ізольованими штамами *Erwinia* sp., що уражують яблуню, окремих сполук як єдиного джерела живлення

Сполука**	Вид, штам			
	ізольовані штами *Erwinia* sp. (10 шт)	Колекційні штами «*Erwinia horticola*»		*Erwinia amylovora* B 1095^T
		ізольовані з яблуні (6 шт)	ізольовані з буку (4 шт)	
D-рибоза, D-фруктоза, D-трегалоза, N-ацетилглюкозамин	+	+	+	+
D і L –ксилоза, D-галактоза, D-маноза, D-целобіоза, екулін,	-/W	-/W	-/W	V
β-гентобіоза,	+/W	+/W	+/W	+
D-рафіноза	-/W	-/W	-/W	-
D-арабіноза, L-сорбоза, D-мальтоза, D-лактоза, D-тураноза, D-ліксоза, D-тагатоза, D і L -фукоза, еритритол, D-адонітол, дульцитол, гліцерин, арбутин, саліцин, інулін, крохмаль, глікоген, ксиліт, D і L -арабіт, метил-βD-ксилопіранозид, метил-αD-манопіранозид, метил-αD-глюкопіранозид, калію глюконат, калію 2-кето глюконат, калію 5-кето глюконат	-	-	-	-

Примітки: * – результати, отримані з використанням тест-системи API 50CH; ** – сполуки, що є аналогічними для тест-системи API 50CH та API 20E, у таблиці 2 не зазначені; «+» – реакція позитивна; «-» – реакція негативна; «W» – реакція слабко позитивна; «V» – реакція залежить від штаму .

Такий аналіз дозволив виділити у межах даної групи видів 12 фенонів, з яких можна диференціювати 2–3 підгрупи, але найбільш чітко ідентифікувати на основі API тестування вдалося 3 кластера видів – «*amylovora»,* «*herbicola*», «*carotovora».* Як відмічається зазначеними дослідниками, ключовими при ідентифікації представників кластера «*amylovora»* від інших кластерів є продукція ацетоїну, утворення кислоти на середовищі з L-арабінозою, нездатність відновлювати нітрати, використовувати цитрати, утворювати β- галактозидазу, ферментувати інозит, L-рамнозу, амигдалін та D-мелібіозу, що узгоджується з одержаними нами даними. Незначна варіабельність, що спостерігається у групі колекційних штамів «*Erwinia horticola»*, ізольованих із буку, не суперечить даним літератури [6, 7]. Так, групою болгарських дослідників при API тестуванні штамів збудника бактеріального опіку плодових, ізольованих з 9 видів рослин, виявлена незначна гетерогенність фенотипу, яка корелює з рослиною-

господарем, що уражається [6, 7]. Натомість, група дослідників із Іспанії при поліфазній таксономії штамів *Erwinia amylovora* з використанням API тестування показала, що гетерогенність за фізіолого-біохімічними властивостями штамів корелює із регіоном, у якому був відібраний уражений рослинний матеріал [11]. Варіабельність фізіолого-біохімічних властивостей штамів *Erwinia amylovora* при API тестуванні також відмічена і групою угорських науковців [17]. Зважаючи на зазначене вище, а також з метою стандартизації і спрощення процесу коректної діагностики збудника бактеріального опіку плодових Європейською та Середземноморською організацією із захисту рослин, було розроблено протокол із ідентифікації даного патогена. У цьому документі зазначено, що ключовими при API тестуванні близькоспоріднених видів *Erwinia amylovora, Erwinia pyrifoliae* та *Erwinia pyriforinigrans* є наступні ознаки: розрідження желатину, зброджування інозиту, сорбіту, ескуліну, мелібіози, D-рафінози, β-гентобіози [10]. Вказані ознаки узгоджуються із одержаними нами результатами, а незначна штамова варіабельність, все ж відмічена нами при API тестуванні досліджуваних штамів, не суперечить даним літератури.

Отже, проведене нами API тестування вказує на суттєву спорідненість як колекційних штамів «*Erwinia horticola»*, так і ізольованих штамів *Erwinia* sp. з представниками виду *Erwinia amylovora*. Але відома внутрішньовидова гетерогенність збудника бактеріального опіку плодових та фенотипова спорідненість даного виду з видами *Erwinia pyrifoliae, Erwinia pyriforinigrans* та *Erwinia uzenensis* робить видову ідентифікацію досліджуваних штамів за результатами API тестування дещо ускладненою. Саме тому на наступному етапі наших досліджень ми провели хемотаксономічний аналіз колекційних штамів «*Erwinia horticola»* та ізольованих штамів *Erwinia* sp.

У жирнокислотних спектрах усіх досліджуваних штамів виявили жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{10} до C_{18}, а саме: ненасичені – гексадеценову ($C_{16:1}$) та cis-9 октадеценову кислоти ($C_{18:1\ cis\ 9}$); насичені – додеканову ($C_{12:0}$), тетрадеканову ($C_{14:0}$), пентадеканову ($C_{15:0}$), гексадеканову ($C_{16:0}$), гептадеканову ($C_{17:0}$) кислоти; оксикислоти – тригідрокситетрадеканову кислоту ($C_{14:0\ 3OH}$) та циклопропанову кислоту з 17 атомами вуглецю ($C_{17:0\ cyclo}$) (табл. 3). Слід зазначити, що J.M. Wells із колегами, аналізуючи жирнокислотні спектри представників виду *Erwinia amylovora* та близькоспоріднених видів, відмічали, що найбільш поширеними у клітинних ліпідах є: ненасичені – гексадеценова ($C_{16:1}$) та cis-9 октадеценова ($C_{18:1\ cis\ 9}$) кислоти; насичені – додеканова ($C_{12:0}$), тетрадеканова ($C_{14:0}$), гексадеканова ($C_{16:0}$), а також оксикислоти – тригідрокситетрадеканова кислота ($C_{14:0\ 3OH}$) та циклопропанова кислота з 17 атомами вуглецю ($C_{17:0\ cyclo}$). Натомість, пентадеканова ($C_{15:0}$), гептадеканова ($C_{17:0}$) та октадеканова ($C_{18:0}$) кислоти присутні у незначних кількостях у ліпідах клітин *Erwinia amylovora* та близькоспоріднених видів [18, 19]. Тобто якісний та частково кількісний склад жирних кислот клітинних ліпідів досліджених нами штамів відповідає літературним даним для представників даного виду (табл. 3).

Таблиця 3

Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів колекційних «*Erwinia horticola*» та ізольованих штамів *Erwinia* sp., що уражують яблуню та типового штаму *Erwinia amylovora* 9057^T

Вид, штам	Жирні кислоти*								
	$C_{12:0}$	$C_{14:0}$	$C_{14:0\ 3OH}$	$C_{15:0}$	$C_{16:1}$	$C_{16:0}$	$C_{17:0\ cyclo}$	$C_{17:0\ iso}$	$C_{18:1\ cis\ 9}$
Erwinia sp. 1я	5,49	2,11	0,98	-	25,18	44,85	0,93	-	23,55
Erwinia sp. 2я	6,94	0,89	1,24	-	22,52	52,30	1,43	-	18,23
Erwinia sp. 3я	1,98	3,22	0,75	-	23,58	43,01	0,98	-	19,80
Erwinia sp. 4я	6,33	0,97	0,89	-	24,02	46,96	1,24	-	22,68
Erwinia sp. 5я	7,39	2,30	1,46	-	22,95	47,36	2,48	-	22,30
Erwinia sp. 6я	3,48	1,48	0,69	-	28,01	40,98	10,32	-	21,48
Erwinia sp. 7я	5,11	1,98	0,72	-	23,70	42,30	2,48	-	18,98
Erwinia sp. 8я	1,89	2,01	0,95	-	25,80	41,50	5,24	-	19,98
Erwinia sp. 9я	2,34	3,09	1,39	-	19,80	39,21	7,98	-	20,19
Erwinia sp. 10я	2,78	2,32	0,83	-	24,21	40,10	3,01	-	20,52
«*Erwinia horticola*» 8557	2,67	2,24	0,72	-	23,30	54,30	5,01	-	11,28
«*Erwinia horticola*» 8558	2,35	2,81	0,98	-	17,16	52,58	10,51	-	13,61
«*Erwinia horticola*» 8559	5,19	0,56	1,27	-	28,82	38,74	1,31	-	25,39
«*Erwinia horticola*» 8560	1,71	2,72	1,46	-	33,95	44,34	1,24	-	14,59
«*Erwinia horticola*» 8561	1,37	2,25	0,82	-	28,22	49,27	3,93	0,81	13,32
«*Erwinia horticola*» 8793	3,98	0,98	0,74	-	30,57	44,04	3,20	-	19,98
«*Erwinia horticola*» 8794	2,99	3,90	1,46	0,92	17,84	48,23	10,06	1,11	11,35
«*Erwinia horticola*» 8795	2,64	2,90	0,68	0,88	14,29	57,00	10,61	-	7,92
«*Erwinia horticola*» 8398	1,70	2,31	0,68	-	37,05	29,26	1,81	-	28,87
Erwinia amylovora B1095^T	4,96	2,18	1,52	-	33,91	48,42	0,72	-	9,26

Примітка: * − тут і у табл. 4 вміст жирних кислот вказаний у відсотках від загальної площі піків; «-» − не виявлено.

Однак, згідно даних літератури, існують складності із ідентифікацією представників виду *Erwinia amylovora* та близькоспоріднених видів саме за вмістом жирних кислот у ліпідах клітин. Так, T. Van Der Zwet та J.M. Wells et al. [19] була проведена спроба сформувати так звані «характерні особливості» кількісного вмісту жирних кислот клітин для представників виду *Erwinia amylovora*: вміст ненасичених жирних кислот − 43–49 %, насичених − 41 %, оксикислот – 7 %, циклопропанових кислот – 3 %, розгалужених жирних кислот – 4 %, що не зовсім корелює з одержаними нами даними (табл. 4). Але, як відомо з літератури, дана ознака для представників *Erwinia amylovora* та близькоспоріднених видів значно залежить від середовища та тривалості культивування мікроорганізмів [9, 18, 19]. Зокрема, деякими науковцями виявлено, що культивування представників даного виду на середовищі Кінга порівняно з триптазно-соєвим агаром значно збільшує вміст ненасичених, але водночас зменшує кількість насичених, циклопропанових та інших жирних кислот [18]. Тобто, ідентифікація цих видів фітопатогенних бактерій за кількісним вмістом жирних кислот вкрай ускладнена. Згідно даних літератури, за вмістом жирних кислот у межах даного роду можна виділити лише дві групи близькоспоріднених видів: «*amylovora*» та «*carotovora*» [19].

Крім того, останнім часом видова структура даної групи фітопатогенних бактерій зазнала значних змін. Зокрема, окремі представники, що раніше належали до роду *Erwinia*, згідно даних сучасної систематики віднесено до родів *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Dickeya*, *Brenneria*, *Lonsdalea* переважно за результатами досліджень їх генотипових властивостей [8]. Раніше Р.І. Гвоздяком з колегами встановлена значна фенотипова подібність, у тому числі жирнокислотного складу клітинних ліпідів, окремих штамів «*Erwinia horticola»* з представниками виду *Erwinia qurencina.* Однак, даний вид за комплексом ознак генотипу було рекласифіковано та віднесено спочатку до роду *Brenneria*, а згодом − до роду *Lonsdalea* [8, 16]. Така штамова та видова варіабельність кількісного вмісту жирнокислотного складу клітинних ліпідів, на наш погляд, пояснює одержані результати для колекційних «*Erwinia horticola»* та ізольованих *Erwinia* sp. штамів, що не завжди корелюють із даними літератури (табл. 4), але водночас подібні до включеного у дослідження типового штаму *Erwinia amylovora* В 1095^{T}.

Таблиця 4

Кількісний вміст окремих жирних кислот у ліпідах клітин колекційних «*Erwinia horticola»* та ізольованих штамів *Erwinia* sp., що уражують яблуню та типового штаму *Erwinia amylovora* В 1095^{T}

Вид, штам	Жирні кислоти			
	Сума насичених жирних кислот	Сума ненасичених жирних кислот	Вміст $C_{14:0\ 3OH}$	Вміст $C_{17:0\ cyclo}$
Ізольовані штами *Erwinia* sp.	50,27	44,75	0,99	3,61
«*Erwinia horticola»*	51,45	41,95	0,98	5,30
Erwinia amylovora В 1095^{T}	55,56	43,17	1,52	0,72

Отже, за результатами досліджень комплексу фенотипових властивостей колекційних «*Erwinia horticola»* та ізольованих штамів *Erwinia* sp., що уражують яблуню, встановлена значна подібність з представниками виду *Erwinia amylovora.* Крім того, одержані нами результати ставлять під сумнів існування окремого виду «*Erwinia horticola».* Але, одержаних нами даних недостатньо для коректної видової ідентифікації як колекційних «*Erwinia horticola»*, так і ізольованих штамів *Erwinia* sp. Для остаточного вирішення даного питання необхідно залучення сучасних молекулярно-генетичних методів вивчення генотипових властивостей даних штамів.

Л.А. Данкевич, С.К. Воцелко, Т.М. Щербина, В.Ф. Патика

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

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *ERWINIA* – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ЯБЛОНИ В УКРАИНЕ

Резюме

Цель. Изучить фенотипические свойства изолированных *Erwinia sp.* и коллекционных *«Erwinia horticola»* штаммов для их идентификации. **Методы.** Пато-

генность и агрессивность штаммов проверяли путем искусственного заражения почек яблони и груши, а также незрелых плодов груши. Физиолого-биохимические свойства бактерий исследовали, используя API тестирование (API 20E и API 50CH тест системы). Жирнокислотный состав клеточных липидов определяли методом газовой хроматографии. **Результаты.** Анализ патогенных, морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, а также жирнокислотного состава клеточных липидов указывает на значительное сходство коллекционных *«Erwinia horticola»* и изолированных *Erwinia sp*. штаммов с представителями вида *Erwinia amylovora*. **Выводы.** Полученные нами результаты ставят под сомнение существование отдельного вида *«Erwinia horticola».* Но для окончательного выяснения видового положения исследованных штаммов необходимо изучение их генотипических свойств.

Ключевые слова: Erwinia spp., «Erwinia horticola», Erwinia amylovora, фенотипические свойства.

L.A. Dankevich, S.K. Votselko, T.M. Scherbina, V.P. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine,
154 Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

HENOTYPIC HETEROGYNICITY PHYTOPATHOGENIC BACTERIA BELONG TO *ERWINIA* GENUS – AGENT OF APPLES BACTERIAL DESEASES IN UKRAINE

Summary

Aim. To study the phenotypic properties of isolated *Erwinia sp*. and collection *«Erwinia horticola»* strains for their identification. **Methods.** The strains pathogenicity and aggressiveness was tested by an artificial infection of apple, pear buds and immature pear fruit. The physiological and biochemical properties of bacteria was investigated using API testing (API 20E and API 50CH test systems). Fatty acid composition of cellular lipids was determined by gas chromatography. **Results**. Analysis of pathogenic, morphological, cultural, physiological, biochemical properties and fatty acid composition of cellular lipids indicates significant similarity *«Erwinia horticola»* collection and *Erwinia* sp. isolated strains with the *Erwinia amylovora* typical strain. **Conclusions**. Our results cast doubt on the existence of a separate species *«Erwinia horticola»*. Though for the final strains classification at species level is necessary to study their genotypic properties.

Key words: Erwinia spp, *«Erwinia horticola»*, *Erwinia amylovora*, phenotypic properties.

1. *Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гринник І.В., Патика В.П.* Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В.П. Патики – Київ: ТОВ "НВП "Інтерсервіс", 2011. – 444 с.
2. *Данкевич Л.А.* Фенотипові та генотипові властивості домінуючих збудників бактеріальних хвороб яблуні в Україні в 2012-2014 роках // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: біологія − 2015. − Т. 63, № 1. − С. 88–94
3. *Перелік* регульованих шкідливих організмів // Міністерство аграрної політики України. Наказ № 467 від 4 серпня 2010 р. – 10 с.
4. *Чумаевская М.А., Матвеева Е.В.* Методические указания по изоляции и идентификации фитопатогенных бактерий. – Москва: ВАСХНИЛ, 1986. – 39 с.

5. *Яковлева Л.М., Мороз С.Н., Щербина Т.Н., Огородник Л.Е., Гвоздяк Р.І., Патика В.Ф. Erwinia amylovora* – возбудитель бактериального ожога деревьев в Украине // Микробиол. журн. – 2014. – Т. 76., № 4. – С. 26–33.
6. *Atanasova I., Kabadjova P., Bogatzevska N., Moncheva P.* New host plants of *Erwinia amylovora* in Bulgaria // Z. Naturforsch. C – 2005. – 60, N 11–12. – P. 893–898.
7. *Atanasova I., Stefanova K., Kabadjova P., Tishkov S., Dimitrov Z., Bogatzevska N., Moncheva P.* Phenotypic diversity of *Erwinia amylovora* in Bulgaria // Z. Naturforsch. C – 2007. – 62, N 11–12. – P. 857–868.
8. *Bergey's* Manual of Systematic Bacteriology / Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J. T., Garrity G.M. − New York; USA: Springer Science+ Business Media – 2005. – Vol. 1. 2nd ed. – 1108 p.
9. *Casano F., Well J., van der Zwet T*. Fatty acid profiles of *Erwinia amylovora* as influenced by growth medium, physiological age and experimental conditions // Journal of Phytopathology – 1988. – N 121. – P. 267–274.
10. *Diagnostic* PM 7/20 (2)* *Erwinia amylovora* // European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP) / Bulletin 2013. – 43, N 1. – P. 21–45.
11. *Donat V., Biosca E.G., Penalver J., Lopez M.M.* Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources // Journal of Applied Microbiology – 2007. – N 103. – P. 1639–1649.
12. *Geider K., Auling G., Jakovjevic V., Volksch B*. A polyphasic approach assigns the pathogenic *Erwinia* strains from diseased pear trees in Japan to *Erwinia pyrifoliae* // Letters of Applied Microbiology – 2009. – N 48. – P. 324–330.
13. *Kim W-S. Gardan L., Rhim S-L., Geider K. Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // Iternational Journal of Systematic Bacteriology – 1999. – 49. – P. 899–906.
14. *Matsuura T., Mizuno A., Tsukamoto T., Shimizu Y., Saito N., Sato S., Kikuchi S., Uzuki T., Azegami K., Sawada H. Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.) // Iternational Journal of Systematic Bacteriology – 2012. – 62. – P. 1799–1803.
15. *Mergaert J., Verdonck L., Kersters K., Swings J., Boeufgras J.-M., De Ley J*. Numerical taxonomy of *Erwinia* species using API systems // Journal of General Microbiology – 1984. – N 130. – P. 1893–1910.
16. *Toth T., Lakatos T., Kolta A. Lonsdalea quercina* subsp. *populi* subsp. nov., isolated from bark canker of poplar trees // International Journal of Systematic Bacteriology – 2013. – 63. – P. 2309–23013.
17. *Vegh A*. Biological diversity of Hungarian *Erwinia amylovora* isolates causing fire blight disease: Thesis of Phd Dissertation / Corvinus University of Budapest, Department of Plant Pathology – Budapest., 2012. – 20 p.
18. *Wells J.M., Butterfield J.E., Revear L.G.* Identification of bacterial associated with postharvest diseases of vegetables by cellular fatty acid composition: an expert system for personal computers // Postharvest Pathology and Mycotoxins – 1993. –83, N 4. – P. 445–455.
19. *Wells J.M., van der Zwet T., Hale C.N.* Differentiation of *Erwinia* species in the *amylovora* group by analysis of cellular fatty acids // Journal of Phytopathology – 1994. – N 140. – P. 31–38.

Отримано 30.05.2016