

СЕРОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* АГРОЕКОСИСТЕМ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

Л.А. Пасічник, Л.М. Буценко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
e-mail: imv_phyto@ukr.net

Мета. Вивчити особливості серогрупування штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці і сегетальної рослинності агроєкосистеми пшениці за різних систем землеробства. **Методи.** Мікробіологічні – вирощування бактерій на живильних середовищах, серологічні – отримання О- і ОН-антигенів за методом Грасе, реакція аглютинації та подвійної дифузії в агарі. **Результати.** За серологічними властивостями патогенні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані із пшениці, розподілені на чотири серологічні групи (II, IV, V, VI) за схемою серогрупування фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae*, розробленою Л.Т. Пастушенко та І.Д. Симонович. В популяції збудника переважали штами серогрупи IV. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані із поверхні зовні здорових рослин пшениці, належали до серогрупи II. Виділені із бур'янів штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* за антигенним складом належать до п'яти серологічних груп (I, II, IV, V, VI). Більшість штамів належать до серогрупи IV (53 %), менша кількість – до серогруп II (22 %) і VI (13 %). **Висновки.** Встановлено, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із пшениці і бур'янів, які ростуть в посівах пшениці, гетерогенні за антигенним складом. Виявлено високий ступінь серологічної спорідненості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених із сегетальної рослинності агроєкосистем пшениці, зі збудником базального бактеріозу зернових культур. Уперше в агрофітоценозі пшениці виявлено штами збудника, які належать до серогрупи I, що свідчить про ширший набір антигенних детермінант у штамів, ізольованих із бур'янів.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, пшениця, сегетальна рослинність, серологічні групи.

Серологічні методи спрощують важкий та тривалий процес ідентифікації збудників хвороб різної етіології. Незважаючи на широке застосування молекулярно-генетичних методів, серологічні методи ідентифікації збудників хвороб, особливо у випадку їх масового поширення, широко використовують завдяки відносній дешевизні та високій специфічності, швидкості отримання результату, легкості у роботі і можливості здійснення аналізу великої кількості зразків, точності та відтворюваності результатів [1, 2].

Багато фітопатогенних бактерій важко виділити з рослинного матеріалу, особливо за комплексної інфекції, а дослідження збудника, як правило, вимагає тривалого часу та використання численних біохімічних тестів. Як альтернатива збудник хвороби може бути виявлений за допомогою серологічних методів, що застосовують безпосередньо до уражених тканин рослин [3]. Це важливо для своєчасного проведення заходів щодо

захисту сільськогосподарських культур від збудників хвороб, бо значно пришвидшує процес діагностики.

Завдяки появі нових методів отримання бактеріальних антигенів, дослідники намагалися виявити антигени, специфічні для виду або штаму. Л.Т. Пастушенко та І.Д. Симонович встановили відмінність у наборі ОН-антигенів сапрофітних та патогенних псевдомонад, використовуючи перехресні реакції аглютинації ОН-сироваток і клітин бактерій [4]. На основі виявлених групспецифічних антигенів в реакції агарпреципітації в гелі з використанням О- і ОН-антисироваток і термолабільних та термостабільних антигенів, отриманих за методом Грасе, була розроблена схема серогрупування бактерій *P. syringae*, яка включає дев'ять серологічних груп [5]. Незважаючи на те, що деякі дослідники намагалися розробити схеми серотипування фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* [6–9], до теперішнього часу немає єдиної загальноприйнятої схеми серогрупування цього виду бактерій.

За основними фізіолого-біохімічними властивостями бактерії патоварів *P. syringae*, які уражують зернові культури, не відрізняються, а розрізняють їх за спеціалізацією до рослини-хазяїна. В той же час, згідно даних ДНК-ДНК гібридизації, патовари *atrofaciens* і *coronafaciens* належать до різних геномовидів – до першого і четвертого відповідно [10]. За серологічними властивостями штами патоварів *P. syringae* гетерогенні і штами одного патовару можуть належати до декількох серологічних груп [5–7, 11–13]. Тому при ідентифікації бактерій патоварів *P. syringae* необхідно враховувати їх серологічну гетерогенність.

Метою роботи було встановлення серологічних особливостей штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із агрофітоценозу пшениці за різних систем землеробства.

Матеріали і методи. Досліджували штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані із уражених (62 штами) і здорових рослин пшениці (2 штами) та різних видів уражених бур'янів (берізка польова, будяк польовий, грицики звичайні, енотера дворічна, лобода біла, осот польовий, пирій повзучий, хвощ польовий, підмаренник чіпкий, плоскуха звичайна, редька дика) в агроecosистемі пшениці (32 штами). Бактерії ізолювали із пшениці і бур'янів, які росли в посівах пшениці, вирощеної за різних систем землеробства в Київській і Полтавській областях. Антигенні властивості штамів бактерій вивчали за реакціями аглютинації та преципітації [5, 14, 15]. Для цього використовували антисироватки до штамів *P. syringae* п'яти серологічних груп, що трапляються на зернових культурах: *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 (УКМ В-1013) – серогрупа I; *P. syringae* pv. *atrofaciens* К-1025 – серогрупа II; *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (PDDCC 4394, УКМ В-1011) – серогрупа IV; *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 – серогрупа V; *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (УКМ В-1115) – серогрупа VI. Для визначення належності штамів до конкретних серологічних груп використали специфічну реакцію – подвійної дифузії в агарі (ПДА) [14]. В реакціях ПДА використовували О- і ОН-антигени, отримані за модифікованим методом Грасе [16].

Результати. Визначено серологічні властивості бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* (41 штамп), виділених із пшениці за інтенсивної системи землеробства ННЦ «Інститут землеробства». В реакції аглютинації вони показали серологічну спорідненість з антисироватками до штамів *P. syringae* п'яти серологічних груп (I, II, IV, V, VI), які трапляються на зернових культурах. Титр антисироваток до штамів *P. syringae* в гомологічних реакціях був високим і становив 12800-25600.

Відомо, що за набором серологічно активних детермінант штами різних патоварів можуть відрізнятися [5, 7, 17]. Тому для більш чіткого уявлення про антигенний склад і приналежність штамів бактерій до певних серологічних груп здійснювали їх серогрупування за використання реакції ПДА (табл.1).

Таблиця 1

Результати подвійної дифузії в агарі штамів із пшениці, вирощеної за інтенсивної системи землеробства, з антисироватками до штамів *P. syringae*

№ штамів <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	Лінії преципітації з антисироватками до культур <i>P. syringae</i> , серогруп				
	I	II	IV	V	VI
9400, 9402, 9491, 9638a	0	3	0	0	0
9501, 9502, 9505, 9639, 9640, 9641, 9494, 9495, 9599, 9482	0	3	0	0	1
9493	0	2	0	0	1
9487, 9517, 9581, 9590, 9417, 9418	0	0	3	0	0
9489	0	1	3	0	0
9403a, 9403b, 9404, 9405, 9406, 9407, 9408, 9410a, 9410b	0	0	2	0	0
9616	0	0	2-3	0	0
9617	0	0	2	0	0
9433, 9443	0	0	1	0	0
9411, 9481, 9484, 9492	0	0	0	0	1
9475	0	1	0	0	1
9496	0	0	1 сл.	0	1

Виявлено (табл. 1), що частина антигенів за методом Грасе досліджених штамів (34%) утворювали по три лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 (серогрупа II) і по дві-три з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV). Чотири штами (9411, 9481, 9484, 9492) формували по одній лінії преципітації лише з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI) (табл. 1). На основі отриманих результатів найбільша кількість штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* (48%), ізольованих із ураженої пшениці, вирощеної за інтенсивної системи землеробства, віднесена до серогрупи IV, менша (37%) – до серогрупи II (табл. 2). Два штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які ізольовано з поверхні зовні здорового листя пшениці, утворювали по 2-3 лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 (серогрупа II) і віднесені до серогрупи II.

Належність штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці, до серологічних груп

Номери штамів <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	Кількість штамів, %	Серологічна група			
		II	IV	V	VI
Ізольовані за інтенсивної системи землеробства					
9400, 9402, 9482, 9491, 9493, 9494, 9495, 9501, 9502, 9505, 9599, 9638а, 9639, 9640, 9641	37	+			
9403а, 9403б, 9404, 9405, 9406, 9407, 9408, 9410а, 9410б, 9417, 9418, 9433, 9443, 9487, 9489, 9517, 9581, 9590, 9616, 9617	48		+		
9411, 9481, 9484, 9492, 9475, 9496	15				+
Ізольовані за органічної системи землеробства					
9780, 9837, 9900	14,3	+			
9747, 9748, 9752, 9771, 9775, 9776, 9785, 9894а, 9895, 9896, 9906	52,4		+		
9819, 9833	9,5			+	
9857а, 9858, 9894, 9899, 9938	23,8				+

Бактерії, які ізольовані із пшениці, що вирощувалася за використання органічного землеробства (21 ізолят), виявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів *P. syringae* різних серологічних груп (табл. 3). Слід відзначити, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* неоднаково взаємодіяли з антисироватками різних серогруп залежно від року ізоляції. 75% ізольованих в 2012 р. штамів бактерій в високих титрах (12800-25600) реагували з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* К-1025 (серогрупа II) і 4394 (серогрупа IV), 25% ізолятів – з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI). Штам 9819 в високих титрах взаємодіяв з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 (серогрупа I) і 948 (серогрупа V).

Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені в 2014 р. із пшениці в Київській області в високому титрі, реагували з антисироватками *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V) і К-1025 (серогрупа II). Всі штами бактерій, які ізольовані із пшениці, що вирощувалася в ПП «Агроєкологія», в високому титрі реагували з антисироваткою *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV) і 7194 (серогрупа VI). 85 % штамів, ізольованих в 2015 році, реагували в високих титрах (12800-25600) з антисироватками до *P. syringae* pv. *atrofaciens* К-1025 (серогрупа II) і 4394 (серогрупа IV). 71% штамів – з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* обох серогруп: К-1025 (серогрупа II) і 4394 (серогрупа IV).

Так як ізольовані із пшениці бактерії за реакцією аглютинації виявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів *P. syringae* різних серологічних груп, то проведено їх розподіл на серогрупи за схемою Л.Т Пастушенко та І.Д.Симонович. Встановлено (табл. 4), що більша частина штамів утворювала по дві лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV).

Таблиця 3

Реакція аглютинації штамів *P. syringae* рв. *atrofaciens* із пшениці, вирощеної за органічного землеробства, з антисироватками різних серогруп

№ штамів, місце виділення		Титри реакції з антисироватками до культур <i>P. syringae</i> , серогруп					
		I	II	IV	V	VI	
9747	ННЦ «Інститут землеробства»	3200	25600	25600	3200	12800	
9748		6400	12800	12800	3200	1600	
9752		3200	12800	12800	3200	3200	
9819		12800	3200	1600	25600	1600	
9833		100	400	400	12800	0	
9837		200	12800	200	200	200	
9894		0	1600	12800	400	12800	
9894a		0	12800	12800	1600	1600	
9895		0	12800	12800	400	6400	
9896		0	12800	12800	1600	12800	
9938		0	6400	1600	3200	12800	
9771		ПП «Агроекологія»	3200	12800	25600	3200	3200
9775			1600	12800	12800	3200	1600
9776	1600		3200	12800	3200	800	
9780	1600		25600	12800	3200	25600	
9785	200		1600	12800	3200	3200	
9857a	100		400	12800	200	12800	
9858	100		100	12800	100	12800	
9899	0		12800	12800	400	25600	
9900	0		25600	6400	1600	12800	
9906	0		12800	12800	6400	200	

Таблиця 4

Результати реакції преципітації штамів *P. syringae* рв. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці, вирощеної за органічної системи землеробства

№ штамів бактерій	Кількість ліній преципітації з антисироватками до штамів <i>P. syringae</i> , серогруп				
	I	II	IV	V	VI
9747, 9748, 9752, 9771, 9775, 9776	0	1	2	0	1
9780, 9837	0	2	0	0	1
9785	0	0	2	0	0
9819	0	0	0	3	0
9833	0	1	0	2	0
9857a, 9858, 9894, 9938	0	0	1 сл.	0	1
9894a, 9895, 9896	0	1	3	0	0
9899	0	1	1	0	2
9900	0	3	0	0	0
9906	0	1	2	0	0

Менша частина штамів бактерій давала дві лінії преципітації з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 (серогрупа II). Виявлено бактерії, які утворювали по 2-3 лінії преципітації з антисироваткою до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V). Ні один із досліджених штамів не утворював ліній преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 (серогрупа I).

Отже, досліджені штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані із пшениці за органічної системи землеробства, розподілені на чотири серогрупи (II, IV, V, VI) за відомою схемою серогруповання [5] (табл. 2). Найбільшу кількість штамів віднесено до серогрупи IV (52,4%), меншу – до серогрупи VI (23,8%). Штами, які належать до серогруп II і V, складають 14,3% і 9,5% відповідно.

Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* за антигенним складом мають деяку приуроченість до місця виділення бактерій. Так, штами бактерій 9819 і 9833, ізольовані в Київській області, належать до серогрупи V, в якій відсутні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані в Полтавській області.

Основна частина штамів, ізольованих із різних бур'янів, у високих титрах (12800-25600) реагувала з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* серогруп II, IV та VI (табл. 5). В нижчих титрах (400 – 6400) досліджені штами бактерій реагували з антисироватками до штамів серогруп I і V.

За результатами ПДА показано, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені з бур'янів, за наявністю і ступенем вираженості специфічних антигенних комплексів не ідентичні між собою (табл. 6). Шістнадцять штамів утворювали по дві чіткі лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 серогрупи IV, сім штамів – з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 серогрупи II. Чотири штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* сформували лінії преципітації з антисироваткою до штаму серогрупи VI (табл. 6). Виявлено штами бактерій, які утворювали три чіткі лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V) та дві чіткі лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 (серогрупа I) (табл. 6).

Два штами бактерій (536а, 563б), виділені з бур'янів – редьки дикої і берізки польової, незважаючи на те, що у реакції аглютинації реагували з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, не утворювали ліній преципітації ні з однієї з досліджених антисироваток. При спробі встановити серотипи епіфітних штамів *P. syringae* pv. *coronafaciens*, виділених з бур'янів, частину досліджених штамів теж не вдалося віднести до жодної з відомих серологічних груп (I-IX) [2].

Аналізуючи характер і ступінь вираженості антигенної спорідненості в реакції ПДА, 30 штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* із бур'янів розподілено на п'ять серологічних груп – I, II, IV, V, VI (табл. 7) згідно схеми серогруповання Л.Т. Пастушенко та І.Д. Симонович [5]. Два штами не ввійшло до жодної з відомих серогруп і, можливо, належать до інших серологічних груп.

Штами, виділені з бур'янів лободи білої, хвощу польового, енотери дворічної, грициків звичайних, осоту польового та будяка польового, були однорідні за антигенним складом і належали до серогрупи IV.

Таблиця 5

Реакція аглютинації *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених з бур'янів,
з антисироватками до штамів *P. syringae*

Номери штамів	Титри реакції з антисироватками до штамів <i>P. syringae</i> , серогруп					Рослина
	I	II	IV	V	VI	
508в	0	12800	800	400	6400	Берізка польова
515в	400	12800	12800	1600	0	Хвощ польовий
516а	800	1600	25600	800	0	Хвощ польовий
536а	400	400	6400	800	800	Редька дика
560а	400	6400	12800	1600	1600	Берізка польова
560в	800	12800	12800	1600	6400	Берізка польова
562	400	25600	12800	1600	3200	Берізка польова
563а	400	6400	12800	1600	6400	Берізка польова
563б	400	3200	1600	1600	6400	Берізка польова
564а	800	3200	6400	1600	25600	Берізка польова
566б	400	1600	25600	400	100	Лобода біла
573а	3200	400	12800	400	0	Енотера дворічна
587а	400	800	200	12800	400	Пирій повзучий
632б	400	3200	6400	800	100	Грицики звичайні
643д	1600	12500	1600	400	3200	Берізка польова
646а	800	25600	6400	3200	12800	Пирій повзучий
650а	0	12800	25600	0	6400	Плоскуха звичайна
650б	6400	1600	400	12800	0	Плоскуха звичайна
663б	0	3200	12800	400	0	Осот польовий
670є	800	400	12800	400	0	Осот польовий
682а	400	3200	12800	3200	100	Підмаренник чіпкий
684б	400	12800	800	1600	12800	Підмаренник чіпкий
687а	800	3200	12800	800	0	Підмаренник чіпкий
689б	3200	6400	25600	1600	0	Хвощ польовий
754б	0	12800	3200	1600	25600	Плоскуха звичайна
754в	0	25600	1600	1600	25600	Плоскуха звичайна
886б, 888в	0	12800	25600	800	800	Берізка польова
906а	12800	0	200	1600	0	Берізка польова
913б	0	6400	25600	800	800	Будяк польовий
915а	0	25600	1600	0	6400	Берізка польова
916а	0	1600	12800	0	1600	Лобода біла

На підмареннику чіпкому трапляються штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* двох серогруп – II та IV, з переважанням штамів серогрупи IV. На бур'яні плоскуха звичайна виявлені штами трьох серогруп – II, V та VI, але домінують штами серогрупи VI. Для штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених з берізки польової, характерна найбільша антигенна гетерогенність – їх розподілено на чотири серологічні групи (I, II, IV, VI). Більшість штамів належать до серогруп II та IV і по одному штаму – до серогруп I та VI. Штами, виділені з пирію повзучого, належать до серогруп II та VI. Штами серогрупи V рідко трапляються на пшениці і серед досліджених штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих з бур'янів, виявлений лише один штам бактерій, який був виділений з плоскухи звичайної.

Таблиця 6

Результати реакції преципітації штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих з бур'янів, з антисироватками до штамів *P. syringae*

Штами	Кількість ліній преципітації з антисироватками до штамів, серогруп					Штами	Кількість ліній преципітації з антисироватками до штамів, серогруп				
	I	II	IV	V	VI		I	II	IV	V	VI
508В	0	2	0	0	1	650а	0	0	2	0	0
515В	0	0	2	0	0	650б	0	0	0	3	0
516а	0	0	2	0	0	663б	0	0	2	0	0
536а	0	0	0	0	0	670є	0	0	2	0	0
560а	0	0	2	0	0	682а	0	0	2	0	0
560В	0	2	0	0	1	684б	0	2	0	0	1
562	0	2	0	0	0	687а	0	0	2	0	0
563а	0	0	2	0	0	689б	0	0	2	0	0
563б	0	0	0	0	0	754б	0	0	0	0	1
564а	0	0	0	0	2	754В	0	0	0	0	2
566б	0	0	2	0	0	886б	0	0	2	0	0
573а	0	0	2	0	0	888В	0	0	2	0	0
587а	0	0	0	0	2	906а	2	0	0	0	0
632б	0	0	1	0	0	913б	0	0	2	0	0
643д	0	2	0	0	1	915а	0	2	0	0	0
646а	0	2	0	0	1	916а	0	0	3	0	0

Таблиця 7

Серологічні групи штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених з бур'янів

Рослина-хазяїн	Розподіл штамів на серогрупи					
	I	II	IV	V	VI	Не визначена
Берізка польова	906а	508б, 560в, 643д, 915а	560а, 886б, 888в, 563а, 562		564а	563б
Будяк польовий			913б			
Грицики звичайні			632б			
Енотера дворічна			573а			
Лобода біла			566б, 916а			
Осот польовий			663б, 670є			
Пирій повзучий		646а			587а	
Підмаренник чіпкий		684б	682а, 687а			
Плоскуха звичайна		650а		650б	754б, 754В	
Редька дика						536а
Хвощ польовий			515в, 516а, 689б			

Обговорення. Отже, всі досліджені штами бактерій проявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів різних серологічних груп *P. syringae*. Встановлено, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із пшениці, гетерогенні за антигенним складом і належать до чотирьох серологічних груп (II, IV, V, VI), а виділені з бур'янів штами – до п'яти

(I, II, IV, V, VI) та мають високий ступінь серологічної спорідненості зі збудником базального бактеріозу зернових культур *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Більшість штамів, виділених із бур'янів, належать до серогрупи IV (53 %), менша кількість – до серогруп II (22 %) і VI (13 %). Уперше в агрофітоценозі пшениці виявлені штами, які належать до серогрупи I.

Л.Т. Пастушенко та І.Д. Симонович [5] на великому наборі представників патоварів *P. syringae* розробили схему серотипування фітопатогенних бактерій, яка включає серологічні групи штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені лише з пшениці (II, IV, V, VI). Доповненням до даної схеми є результати серотипування штамів *P. syringae* pv. *coronafaciens* та *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які за антигенним складом відрізняються і розподілені на серологічні групи в залежності від рослини-хазяїна [2]: штами *P. syringae* pv. *coronafaciens*, виділені з рослин вівса, належать до двох серологічних груп (I і V), а штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані з жита – до п'яти серогруп (I, II, IV, V, VI) [18].

Порівнюючи штами *P. syringae* pv. *syringae*, виділені з різноманітних видів рослин різних регіонів Ірану, за результатами агарпреципітації їх було об'єднано в сім серологічних груп [11]. На відміну від цих результатів J. Otta згрупував фітопатогенні ізоляти *P. syringae*, виділені з понад 30 видів рослин з різних країн світу, на 10 серотипів [8], а ізоляти *P. syringae*, вилучені з пшениці, кукурудзи, сорго і щетинника – на шість серотипів [19]. Але деякі дослідники, вивчаючи антигенні властивості штамів патоварів *P. syringae*: *aptata*, *tabaci*, *morsprunorum*, *phaseolicola*, показали, що кожен з цих патоварів формує однорідні серогрупи [20, 21].

За серологічною схемою, розробленою М. Saunier із співавторами, штами *P. syringae* розподілені на 23 серологічні групи [7]. Шістнадцять штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* із пшениці ними віднесені до чотирьох серологічних груп (SYR1, SYR2, MOP2, APTPIS), а дев'ять штамів *P. syringae* pv. *coronafaciens* – до трьох (RIB, SYR2, PERSAVTOM2). Штами *P. syringae* серогруп SYR1, APTPIS, і SYR2 відповідають штамам серогруп II, IV, VI (відповідно) схеми серогруповання, розробленої Л.Т. Пастушенко та І.Д. Симонович [5].

Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* з інших зернових культур не представлені в схемах Л.Т. Пастушенко, І.Д. Симонович [5] та М. Saunier із співавторами [7], а штами *P. syringae* pv. *coronafaciens* – в схемі Л.Т. Пастушенко, І.Д. Симонович [5]. При аналізі штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* із жита в Україні додатково виявлено бактерії, які віднесені до серогрупи I [18], яка відповідає серогрупі PERSAVTOM2 за класифікацією М. Saunier та ін. [7].

З моменту створення схеми серогруповання [5] вчені намагалися розробити молекулярні основи серогруповання. Тонкі варіації в структурі О-специфічних полісахаридних ланцюгів (О-ПС) використовуються як молекулярна основа серологічних класифікаційних схем. Встановлено хімічну структуру О-ПС ланцюгів для кожної серологічної групи *P. syringae* та кореляцію між нею і серологічною активністю ЛПС [22–24]. Високу ступінь серологічної спорідненості між штамми бактерій виявляють тільки при наявності в складі ЛПС повністю ідентичних О-ПС ланцюгів [25].

В той же час запропоновано схему серогрупування [9] на основі серогрупових та серотипових специфічних моноклональних антитіл (MAbs) до О-ПС ліпополісахаридів *P. syringae* та кор-специфічних MAbs. Штами *P. syringae*, що представляють 21 патовар, були класифіковані в 15 серотипів в серогрупах 01-07. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* серогруп II, IV, VI (за схемою Л.Т. Пастушенко, І.Д. Симонович) віднесені до серогрупи 01 (серотипи 01b, 01c, 01d відповідно), а серогрупи V – до 03с [9].

Аналізуючи багаторічні результати серологічних досліджень збудників бактеріозів зернових культур (табл. 8), можна зробити наступні висновки.

Штами патоварів *P. syringae*, ізольовані із різних зернових культур і септальної рослинності, гетерогенні за антигенним складом, який залежить від рослини-хазяїна, з якої вилучено патоген (табл. 8). Як встановлено, штами *P. syringae* pv. *coronafaciens* з вівса розподілені на дві серологічні групи (I і V), а *P. syringae* pv. *atrofaciens* із пшениці – на чотири (II, IV, V, VI), *P. syringae* pv. *atrofaciens* із жита – на п'ять (I, II, IV, V, VI).

Таблиця 8

Серологічні групи бактерій, виділених із зернових культур і бур'янів

Види бактерій	Розподіл штамів на серогрупи, %					
	I	II	IV	V	VI	Не встановлена
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> з уражених рослин вівса	14	0	0	86	0	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> з вівса (епіфіти)	87	0	0	13	0	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> з бур'янів (епіфіти)	12,5	25	0	0	0	62,5
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> з жита	50	26	11	4	9	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> з жита (епіфіти)	0	75	0	0	25	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> із пшениці (епіфіти)	0	100	0	0	0	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> із пшениці	0	31	51	5	13	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> із бур'янів	3	22	53	3	13	6

Нами виявлено відмінність у приуроченості до певної серологічної групи між епіфітними і патогенними штамми *P. syringae*. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* і *P. syringae* pv. *coronafaciens*, виділені як епіфіти, домінували в інших серологічних групах, ніж штами цих збудників, ізольовані з уражень. Переважна більшість штамів *P. syringae* pv. *coronafaciens*, ізольованих із здорових рослин вівса, належить до серогрупи I, а штами, ізольовані з некрозів – до серогрупи V (табл. 8). Епіфітні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із жита і пшениці, належали до серогрупи II. Отже, спостерігається вплив екологічної ніші на локалізацію штамів з певними антигенними детермінантами.

Переважання певних серогруп визначається способом існування та рослиною-хазяїном, а також, на нашу думку, пов'язано з більшою при-

стосованістю і виживанням штамів цих серогруп у різноманітних умовах. На користь приуроченості серогруп патогенів до рослини-хазяїна свідчать дані про те, що ці серогрупи представлені, як правило, великою кількістю штамів.

На уражених рослинах пшениці бактерії серогрупи I не виявлені, але визначені серед фітопатогенів, ізольованих із бур'янів. Штами серогрупи I характерні для бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених із жита [2, 18], та збудників ореольного опіку вівса *P. syringae* pv. *coronafaciens* [2].

До серогруп II та IV було віднесено більшість досліджених штамів, виділених з бур'янів (табл.7), що свідчить про переважання штамів бактерій даних серогруп не тільки для збудників, виділених із пшениці, а й для інших рослин цього агрофітоценозу.

До серогрупи V належать штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені з пшениці і жита, в обмеженій кількості. Штами бактерій цієї серогрупи, виділені з бур'янів, теж є нечисленими, як і штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені з пшениці в інших країнах (Росія та США). Представників цієї серогрупи не виявлено серед штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих з пшениці в Болгарії [17].

Наявність штамів *P. syringae* серогруп I та V, виділених з бур'янів, дає підстави припустити ширшу можливість цих штамів до пристосування та виживання за зміни умов навколишнього середовища порівняно зі збудниками хвороб, виділеними з пшениці.

Отже, всі досліджені штами бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* проявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів різних серологічних груп *P. syringae* pv. *atrofaciens* (I, II, IV, V, VI). Нами встановлено, що найбільша кількість штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих з пшениці, як за використання інтенсивної системи землеробства, так і органічного землеробства, і бур'янів агрофітоценозу пшениці належать до серогрупи IV за схемою серогруповання фітопатогенних бактерій *P. syringae* [5]. Уперше в агрофітоценозі пшениці виявлено штами збудника, які належать до серогрупи I, що свідчить про ширший набір антигенних детермінант у штамів, ізольованих із бур'янів.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* АГРОЭКОСИСТЕМ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Л.А. Пасичник, Л. Н. Буценко

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

Резюме

Цель. Изучить особенности серогруппирования штаммов *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, изолированных из пшеницы и сеgetальной растительности агроэкосистемы пшеницы при различных системах земледелия. **Методы.** Микробиологические – выращивание бактерий на питательных средах, серологические – получение О- и ОН-антигенов методом Грассе, реакция агглютинации и двойной

диффузии в агаре. **Результаты.** По серологическим свойствам патогенные штаммы *P. syringae* pv. *atrofaciens*, изолированные из пшеницы, принадлежат к четырем серологическим группам (II, IV, V, VI) по схеме серогруппирования фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*, разработанной Л.Т. Пастушенко и И.Д. Симонович. В популяции возбудителя преобладали штаммы серогруппы IV. Штаммы *P. syringae* pv. *atrofaciens*, изолированные с поверхности внешне здоровых растений пшеницы, принадлежали к серогруппе II. Выделенные из сорняков штаммы *P. syringae* pv. *atrofaciens* по антигенному составу принадлежат к пяти серологическим группам (I, II, IV, V, VI). Большинство штаммов относятся к серогруппе IV (53%), меньшее количество – к серогруппам II (22%) и VI (13%). **Выводы.** Установлено, что штаммы *P. syringae* pv. *atrofaciens*, выделенные из пшеницы и сорняков, произрастающих в посевах пшеницы, гетерогенны по антигенному составу. Выявлена высокая степень серологического родства штаммов *P. syringae* pv. *atrofaciens*, выделенных из сеgetальной растительности агроэкосистем пшеницы, с возбудителем базального бактериоза зерновых культур. Впервые в агрофитоценозе пшеницы обнаружены штаммы возбудителя, которые относятся к серогруппе I, что свидетельствует о более широком наборе антигенных детерминант у штаммов, изолированных из сорняков.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, пшеница, сеgetальная растительность, серологические группы.

SEROLOGICAL FEATURES OF BACTERIA PSEUDOMONAS SYRINGAE AGROECOSYSTEMS OF CEREAL

L.A. Pasichnyk, L.M. Butsenko

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Aim. To study the features of serogrouping of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, isolated from wheat and segetal vegetation of the agroecosystem of wheat under various farming systems. **Methods.** Microbiological - the growth of bacteria on nutrient media, serological - the obtaining of O and OH antigens by the Grasse method, the agglutination reaction and double diffusion in agar. **Results.** According to the serological properties, the pathogenic strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens*, isolated from wheat, belong to the four serological groups (II, IV, V, VI) according to the serogrouping scheme of phytopathogenic bacteria of the *Pseudomonas syringae* group, developed by L.T. Pastushenko and I.D. Symonovych. In the population of the causative agent, strains of serogroup IV prevailed. Strains *P. syringae* pv. *atrofaciens*, isolated from the surface of apparently healthy wheat plants belonged to serogroup II. Isolated from weeds strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens* on antigenic composition belong to the five serological groups (I, II, IV, V, VI). Most strains belong to serogroup IV (53%), a smaller number to serogroup II (22%) and VI (13%). **Conclusions.** It was established that strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens*, isolated from wheat and weeds growing in wheat crops, are heterogeneous in antigenic composition. It is reveal a high degree of serological relationship of strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens*, isolated from the segetal vegetation of wheat agroecosystems with the causative agent of basal bacteriosis of cereal crops. For the first time in the

agrophytocenosis of wheat the strains of the causative agent that belong to serogroup I are found, which indicates a broader set of antigenic determinants in strains isolated from weeds.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, wheat, segetal vegetation, serological groups.

1. Kondratieva IA, Yarilina AA, Yegorova SG et al. Prakticum po immunologii. – 2-ie izd. – M.: Izd. tsentr «Akademii», 2004.– 272 c. Russian.
2. Pasichnyk LA. [Antigenic properties of bacteria of pathovars of *Pseudomonas syringae* affected cereals]. Microbiol Z. 2000; 62(5): 18–22. Ukrainian.
3. Boer SH. Use of monoclonal antibodies to identify and detect plant pathogenic bacteria. Can J Plant Pathol. 1987; 9(2): 182–187.
4. Pastushenko LT, Simonovich ID. [Serological group of phytopathogenic bacteria of the *Pseudomonas* genus. I. Antigenic affinity within species]. Microbiol Z. 1979; 41(3): 222–228. Russian.
5. Pastushenko LT, Simonovich ID. [Serological group of phytopathogenic bacteria of the *Pseudomonas* genus. II. Antigenic affinity of different species]. Microbiol Z. 1979; 41(4): 330–339. Russian.
6. Lovrekovich L, Klement Z, Dowson WI. Serological investigation of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas morsprunorum*. Phytopathol. Zeitschrift. 1963; 47: 19–24.
7. Saunier M, Maladrin L, Samson R. Distribution of *Pseudomonas syringae* pathovars into twenty-three O serogroups. Appl Environ Microbiol. 1996; 62 (7): 2360–2374.
8. Otta JD, English H. Serology and pathology *Pseudomonas syringae*. Phytopatology. 1971; 61(N 5): 443–452.
9. Ovod V, Rudolph K, Krohn K. Serological classification of *Pseudomonas syringae* pathovars based on monoclonal antibodies towards the lipopolysaccharide O-chain. Developments in Plant Pathology. 1997; 9: 526–531.
10. Gardan L, Shafic H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PA. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). Int J Syst Bacteriol. 1999; (49(2): 469–478.
11. Khezri S, Rahimian H, Ahangaran A, Mohammadi M. Comparisons of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from various host with different methods. Int J Agric Biol. 2010; 12(1): 106–110.
12. Riffaud CM-H, Morris CE. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony-staining. Eur J Plant Pathol. 2002; 108(6): 539–545.
13. Jones JB, Dawe DL, McCarter S M. Separation of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* into serovars by three serological methods. Phytopathology. 1983; 73(4): 573–576.
14. Klement Z, Rudolph K, Sands D, editors. Methods in phytobacteriology. Budapest: Academia Kiado; 1990. 568 p.
15. Patyka VP, Pasichnyk LA, Dankevych LA, Moroz CM, Butsenko LM, Zhytkevych NV et al. Diahnostyka fitopatohennykh bakterii. Metodychni rekomendatsii. Kyiv; 2014. Ukrainian.

16. Pastushenko LT, Simonovich ID. [Study of methods for obtaining antigens of the pathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas*]. *Microbiol Z.* 1971; 33(3): 289–295. Russian.
17. Pasichnik LA, Yakovleva LM, Gvozdyak PI, Vassilev VI. [The serological heterogeneity of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* and their ecological niches]. *Mikrobiologiya.* 2003; 72(6): 828–833. Russian.
18. Pasichnik LA, Koroleva IB, Gvozdyak RI. [Serological properties of rye bacteriosis agent *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*]. *Microbiol Z.* 1991; 53(6): 82–87. Russian.
19. Otta J. D. Occurrence and characteristics of isolates of *Pseudomonas syringae* on winter wheat. *Phytopathology.* 1977; 67(1): 22–26.
20. Guillorit C, Samson RA. Note: Serological study of four pathovars of *Pseudomonas syringae*: *Ps. syr. aptata*, *Ps. syr. tabaci*, *Ps. syr. morsprunorum* and *Ps. syr. phaseolicola*. *J Appl Bacteriol.* 1993; 74(6): 683–687.
21. Ertugrul D, Güven K. Serological properties of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolates collected from Eskisehir. *Turk J Biology.* 1998; 22:189–195.
22. Zdorovenko GM, Solyanik LP, Yakovleva LM. Characterization of O-antigens from different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biochemistry (Mosc).* 1997; 62(1): 36–46. Russian.
23. Zdorovenko GM, Varbanets LD, Zdorovenko EL, Vinarskaia NV, Yakovleva LM. [Chemical and biological characterization of lipopolysaccharides from the *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* IMV 381 collection culture and its dissociant]. *Mikrobiologiya.* 2004; 73(6): 790–801. Russian.
24. Zdorovenko GM, Zdorovenko EL, Varbanets LD. [Composition, structure, and biological properties of lipopolysaccharides from different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*]. *Mikrobiologiya.* 2007; 76(6): 774–89. Russian.
25. Zdorovenko GM, Zdorovenko EL. [Lipopolysaccharides of *Pseudomonas syringae*. Structure and immunologic and chemical characteristics as a basis for the strain classification]. *Mikrobiologiya.* 2010; 79(1): 52–62. Russian.

Отримано 10.04.2018