

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Буценко Людмила Миколаївна

УДК: 633.11:[574.4:631.5]:[632.35:
579.841.004.12]:57.04(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ І МІКРОБНО-РОСЛИННІ
ВЗАЄМОДІЇ ЗБУДНИКА БАЗАЛЬНОГО БАКТЕРІОЗУ
АГРОФІТОЦЕНОЗУ ПШЕНИЦІ**

03.00.07 – Мікробіологія

091 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело


_____ Л.М. Буценко

Науковий консультант Пасічник Лідія Анатоліївна, доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Буценко Л.М. Біологічні властивості і мікробно-рослинні взаємодії збудника базального бактеріозу агрофітоценозу пшениці. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 «Мікробіологія» (091 – Біологія). – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, 2020.

Дисертацію присвячено комплексному дослідженню біологічних властивостей і взаємодії з рослиною збудника базального бактеріозу пшениці, на основі чого сформульовано наукову концепцію про відсутність спеціалізації збудника й здатність уражувати широке коло рослин в агрофітоценозі, де застосування пестицидів посилює гетерогенність його популяції і є одним із чинників зростання шкідливості, та встановлено негативний вплив *P. syringae* pv. *atrofaciens* на геном рослин, що визначає науково обґрунтовані підходи для розроблення методів діагностики і контролю патогена.

За обстеження посівів пшениці у Київській, Полтавській, Черкаській областях України реєстрували наявність рослин із характерними для базального бактеріозу ураженнями вегетуючих частин на усіх полях. Загалом із ураженої бактеріозом пшениці виділено 28 штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, більшість з них є високо (30% штамів) та середньо (50% штамів) агресивними щодо пшениці. Із рослин пшениці без ознак ураження було ізольовано також епіфітні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які є вірулентними для пшениці. Встановлено постійну присутність збудника базального бактеріозу пшениці у посівах цієї культури.

Із бур'янів агрофітоценозу пшениці (мак польовий, осот польовий) ізольовано штами бактерій, які належали до виду *P. syringae* та були вірулентними для пшениці. За штучної інокуляції пшениці штамми *P. syringae*, що були виділені з бур'янів, розвивалися характерні для ураження збудником базального бактеріозу симптоми.

Усі досліджені штами бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* проявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів II, IV, V, VI серологічних груп *P. syringae*. Враховуючи це, нами було запропоновано використання полівалентної антисироватки до чотирьох серологічних груп для виявлення збудника базального бактеріозу.

Усі штами бактерій, незалежно від джерела їх виділення, є подібними за якісним складом жирних кислот, а саме, містять додеканову, тетрадеканову, гексадеканову, октадеканову, *cis*-9-гексадеценнову, *cis*-11-октадеценнову, *cis*-9,10-метилгексадеканову, *cis*-9,10-метилоктадеканову жирні кислоти. Виявлено важливі для ідентифікації *P. syringae* оксизаміщені (3-гідроксидеканову, 2-гідроксидодеканову і 3-гідроксидодеканову) жирні кислоти, що підтверджує їх належність до цього виду.

Для визначення генетичної гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу в Україні було застосовано метод RAPD-ПЛР із праймером ОРА-13. За використання цього праймеру отримано спектри ампліфікованих фрагментів, які були подібними для всіх штамів. Діапазон поліморфних локусів становив від 500 до 1300 т.п.н. Для всіх штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* домінуючим продуктом був фрагмент ДНК з розміром близько 700 т.п.н. Усі штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, незалежно від географічного регіону виділення, належності до серогрупи та агресивності, утворили споріднену групу, отже, є генетично однорідною групою.

У результаті RAPD-ПЛР аналізу встановлено високий ступінь спорідненості штамів *P. syringae*, які ізольовано нами із маку польового і осоту польового, і колекційних штамів, виділених із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, зі збудником базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що є найпоширенішим на зернових культурах.

Методом ДСН-ПААГ електрофорезу білків цілих клітин бактерій було показано, що штами бактерій, які належать до одного патовару, *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 мають ідентичні профілі білків зовнішньої мембрани. Штами *P. syringae* 6846, 662г,

650a, 560a, 646a, які ізольовано з бур'янів у посівах пшениці, мали ідентичні ДСН-ПААГ профілі білків. Їхні білкові профілі були ідентичні до профілю неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011 і білкових профілів штамів збудника базального бактеріозу, ізольованих в Україні. До ДСН-ПААГ профілі білків цілих клітин входили білки із молекулярною масою від 17 до 98 кДа (домінуючими були білки з молекулярною масою 30 і 45 кДа).

Вперше на основі вивчення вірулентних, серологічних властивостей, RAPD-ПЛР аналізу з праймером ОРА-13 і ДСН-ПААГ профілів білків встановлено, що штами, виділені із уражених бактеріозами бур'янів із агрофітоценозу пшениці, належать до *P. syringae* pv. *atofaciens*.

За оцінки впливу пестицидів як одного із найбільш значущих абіотичних факторів агрофітоценозів на збудника базального бактеріозу встановлено, що переважна більшість пестицидів не мають значущої антибактеріальної дії стосовно *P. syringae* pv. *atofaciens* й інших фітопатогенних бактерій, зокрема, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas vesicatoria*. Лише препарати, які містять манкоцеб, характеризуються антибактеріальною активністю щодо всіх досліджених фітопатогенних бактерій і можуть бути використані для контролю збудників бактеріальних хвороб. Альтернативою хімічним препаратам у контролі фітопатогенних бактерій *P. syringae* можуть стати мікробні препарати на основі *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* та *Pseudomonas aureofaciens*, які характеризувалися антагоністичною активністю.

Встановлено, що трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил та беноміл, тіофанат-метил, флудіоксоніл спричинюють збільшення кількості Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atofaciens*. Найбільшу мутагенну активність має трибенурон-метил + трифенсульфурон-метилу, який збільшував кількість Str^R мутацій *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 у 4,7 – 6,5 рази. Беноміл, тіофанат-метил, флудіоксоніл проявляють слабку мутагенну активність, підвищуючи кількість Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atofaciens* у 1,8 – 2,4 рази. Тіофанат-метил та

флудіоксоніл виявляють також слабку мутагенну активність в тесті Еймса з тест-культурою *S. typhimurium* TA98.

Вперше встановлено, що альфа-циперметрин і трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил збільшують у 2,3 – 3,6 рази частоту морфологічної дисоціації збудника базального бактеріозу пшениці у 10 – 100 разів з формуванням колоній видозміненої R-форми. Частота появи індукованих альфа-циперметрином R-форм залежала від штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Так, для штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 частота появи R-форм становила 5×10^{-2} , для *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 – 2×10^{-2} . Штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 виявився найбільш чутливим до дослідженого пестициду – частота появи R-форм становила 2×10^{-1} . Частота морфологічної дисоціації *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 за дії трибенурон-метил+трифенсульфурон-метилу становила 5×10^{-1} .

R-дисоціанти за фізіолого-біохімічними властивостями не відрізнялися між собою і мали незначні відмінності від вихідної S-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Усі R-дисоціанти *P. syringae* pv. *atrofaciens* взаємодіяли із штамоспецифічною антисироваткою. R-форми штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 спричинюють реакцію надчутливості на листках тютюну. За штучної інокуляції пшениці R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* зумовлюють появу типових симптомів базального бактеріозу, тобто зберігають свої вірулентні властивості.

Здатність формувати біоплівку важлива для успішної колонізації філосфери, а успішна колонізація цієї ніші фітопатогенними бактеріями є передумовою інфікування рослин. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* краще формують біоплівку порівняно з S-формою цього штаму. Так, маса біоплівки, індукованої альфа-циперметрином R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, була у 2,3 рази, а спонтанної R-форми – у 3,6 рази більшою порівняно з масою біоплівки, сформованої S-формою цього штаму. Маса біоплівки R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 була у 2,3 рази більша за масу біоплівки S-форми цього штаму.

На нашу думку, збільшення у популяції *P. syringae* pv. *atrofaciens* кількості особин, що характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівки, призводить до формування більших популяцій збудника на рослинах і посилювати ризик виникнення епіфітотій. Наявність R-форм у популяції збудника призводить до ускладнень при діагностиці базального бактеріозу.

Ліпополісахариди (ЛПС) фітопатогенних бактерій є одними із важливих чинників у взаємодії бактерій і рослин. Для вивчення біологічної активності отримано ЛПС штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* (УКМ В-1011, 9780, 9400), типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і штамів, які належать до патоварів, що уражують не зернові культури (цукрові буряки): *P. syringae* pv. *aptata* 8544; *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922. В ЛПС усіх досліджених штамів виду *P. syringae* концентрація білка була значною і становила від 10 до 24%. До складу ЛПС *P. syringae* входить від 3,1 до 11,7 % нуклеїнових кислот від сухої маси ЛПС. В усіх одержаних ЛПС виявлена КДО у кількості 0,56 – 1,50%. ЛПС *P. syringae* містили типові для цих біополімерів жирні кислоти. Виділені ЛПС є біологічно активними у серологічних реакціях і здатні запобігати реакції надчутливості на листках тютюну.

З метою оцінки фітопатогенних бактерій як факторів біологічного мутагенезу у взаємодії з рослинами досліджено їхню мутагенність з використанням бактеріальної і рослинної тест-систем. За культивування в лабораторних умовах *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 не утворюють сполуки із мутагенною активністю та не спричиняють активацію промутагену 3,3'-діамінобензидіну в тесті Еймса. ЛПС *P. syringae* не мають мутагенної активності. ЛПС усіх досліджених штамів *P. syringae* у концентраціях 5,0 і 0,5 мг/мл виявилися здатними зменшувати кількість індукованих біхроматом калію і N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідин His⁺ реверсій. Такою самою активністю щодо індукованого мутагенезу характеризувалися ЛПС штамів інших патоварів: *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. syringae* 7922. Отже, антимуtagenна дія є загальною властивістю усіх ЛПС *P. syringae*.

Встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 спричинюють збільшення кількості хромосомних аберацій в *Allium cepa*-тесті (за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 частота аберацій ана- і телофаз становила $11,1 \pm 0,6\%$, за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 $10,8 \pm 0,5\%$, у контролі – $4,8 \pm 0,2\%$). Отже, ЛПС фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* проявляють мутагенну активність в *A. cepa*-тесті у концентрації 5,0 мг/мл підвищуючи у 2,3 рази частоту хромосомних аберацій.

Зважаючи на зв'язок між мутагенною активністю і пухлиноутворенням, вивчено вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на утворення пухлин. Найбільшу протипухлинну активність спостерігали за оброблення експлантатів ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* до інокуляції суспензією клітин *A. tumefaciens*. На нашу думку, що ЛПС впливає на процеси прикріплення *A. tumefaciens* до рослинних клітин. Введення тваринам з відтвореними модельними системами пухлинного росту (асцитні і солідні форми різних за гістогенезом пухлин) ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 не має статистично достовірного впливу на перебіг пухлинного процесу.

Одним з перших етапів відповіді рослини на проникнення патогена є утворення активних форм кисню, зокрема, пероксиду водню і супероксиданіон-радикалу. Встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* підвищують пероксидазну активність проростків *A. cepa*. У проростках цибулі не спостерігали значної зміни каталазної активності за дії ЛПС, але виявляли значне збільшення кількості малонового альдегіду в екстрактах проростків цибулі. Одержані результати дають підстави вважати, що пошкодження хромосом у клітинах апікальної меристеми цибулі опосередковано оксидативним стресом, який індукується ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Встановлено, що інфікування збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* спричинює суттєве підвищення ферментативної активності компонентів антиоксидантного захисту – каталази і пероксидази, що свідчить про запуск механізмів клітинного захисту, але за цих умов вдвічі знижувався

вміст основних фотосинтетичних пігментів в листових пластинках, що могло бути спричиненом як зниженням рівня витрати асимілятів на біосинтетичні процеси, так і більш швидким руйнуванням пігментних комплексів в умовах окиснюваного стресу.

Інактивовані клітини (ІК) і ЛПС вірулентного штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 зумовлювали пригнічення поділу та проліферації калюсних клітин пшениці. Токсичний вплив на життєздатність калюсної культури пшениці виявляли навіть за низького вмісту в середовищі (0,4 % і 0,5 %) ІК та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 (виживання калюсних тканин становило 17,5–43,2 %). За дії ІК і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 збільшувалася пероксидазна активність у калюсних тканин пшениці. Встановлено можливість застосування ЛПС і ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* у концентрації максимального інгібування ІК₈₀ як селективного фактора для визначення стійкості ліній пшениці до збудника базального бактеріозу.

За реакцією калюсних клітин пшениці на фітотоксичні метаболіти *P. syringae* pv. *atrofaciens* сорти Подолянка і Столична є більш стійкими до збудника базального бактеріозу, тоді як сорти Фаворитка і Смуглянка – менш стійкі. Отже, селекцію на стійкість до збудника базального бактеріозу можна здійснювати для сортів Подолянка і Столична за сублетальної концентрації 0,8% ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, сорту Фаворитка – 0,6%, сорту Смуглянка – 0,4%. Запропоновано метод відбору стійких до збудника базального бактеріозу ліній пшениці та отримані стійкі здатні до регенерації калюсні лінії пшениці сортів Подолянка, Столична – перспективні для селекційної роботи зі створення сортів, стійких до *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, фенотипові і генотипові властивості, пестициди, морфологічна дисоціація, ліпополісахарид, фітотоксична дія, геномодулювальна активність, пшениця.

SUMMARY

Butsenko L.M. Biological properties and microbe-plant interactions of the causative agent of basal bacteriosis of wheat agrophytocenosis. – Qualifying scientific work with the manuscript copyright.

The dissertation for a doctoral degree in biological sciences by specialty 03.00.07 “Microbiology” (091 – Biology). – D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to a comprehensive study of the biological properties and interaction of the causative agent of wheat basal bacteriosis with a plant, on the basis of which it was formulated a scientific concept about the absence of specialization of the pathogen and the ability to infect a wide range of plants in agrophytocenosis, where the use of pesticides enhances the heterogeneity of its population and is one of the factors in the growth of its harmfulness, and the negative influence of *P. syringae* pv. *atrofaciens* on the genom of plants, which determines scientifically grounded approaches to the development of methods for diagnostics and control of the pathogen.

When wheat crops were examining in the Kyiv, Poltava, Cherkasy regions, plants with lesions of vegetative parts typical for basal bacteriosis were identified in all fields. In total 28 isolates of *P. syringae* pv. *atrofaciens* were isolated from wheat affected by bacteriosis. Most of these isolates are high (30% strains) and medium (50% strains) aggressive towards wheat. In addition, we isolated strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens*, which are virulent for wheat, from wheat plants without signs of damage (epiphytic strains). The constant presence of the causative agent of basal bacteriosis of wheat in wheat crops has been established.

From the weeds (*Sonchus arvensis* L., *Papaver argemone* L.) of wheat agrophytocenosis were isolated bacterial strains that belonged to the genus of *P. syringae* and were virulent for the wheat. After artificial inoculation of wheat with the *P. syringae* strains isolated from weeds, symptoms typical for the causative agent of basal bacteriosis were developed.

All studied strains of bacteria *P. syringae* pv. *atrofaciens* showed serological affinity with antisera against the II, IV, V, VI serological groups *P. syringae* strains. Taking this into account, we proposed the use of polyvalent antisera to four serological groups species to detect the causative agent of basal bacteriosis.

All isolated bacterial strains, regardless of the source of their isolation, have a similar qualitative composition of fatty acids and contain dodecanoic, tetradecanoic, hexadecanoic, octadecanoic, cis-9-hexadecenoic, cis-11-octadecenoic, cis-9,10-methylenehexadecanoic, cis-9,10-methylenehexadecanoic fatty acids. They also contain important for the identification *P. syringae* hydroxy-substituted fatty acids (3-hydroxydecanoic, 2-hydroxydecanoic, and 3-hydroxydecanoic) which confirms their belonging to the this species.

For the determent of the genetic heterogeneity of the basal bacteriosis pathogen population in Ukraine, the RAPD-PCR method was used with the primer OPA-13. With the use of this primer the spectra of amplified fragments were obtained which were similar for all strains (isolated both from wheat and rye). The range of polymorphic loci ranges from 500 to 1300 kb. For all strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens* the dominant product was a DNA fragment of about 700 kbp. All strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens*, regardless of the geographical region of isolation, serogroup affiliation, and aggressiveness, formed a related group, therefore, were a genetically homogeneous group.

RAPD-PCR analysis with the primer OPA-13 also revealed a high degree of affinity of the strains isolated by us from *Sonchus arvensis* L. and *Papaver argemone* L. with *P. syringae* strains from weeds of wheat agrophytocenosis, which are stored in the collection of the department, and also with the causative agent of basal bacteriosis *P. syringae* pv. *atrofaciens*, which is the most common in cereals.

With SDS-PAGE of proteins of the whole bacterial cells it was proved that bacterial strains that belonged to the same pathovar, *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1013 and *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011, had the identical protein profiles of the outer membrane. *P. syringae* 684b, 662g, 650a, 560a, 646a that were isolated from the weeds of wheat crops had the identical SDS-PAGE protein profiles.

Their protein profiles were identical to the protein profile of neopathotype strain *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 and protein profiles of the strains of the causative agent of basal bacteriosis which were isolated in Ukraine. SDS-PAGE profiles of the proteins of these cells contain proteins with molecular weight of 98 to 17 kDa (dominant proteins were ones with molecular weight of 30 kDa and 45 kDa).

For the first time, based on the study of virulent and serological properties, RAPD-PCR with OPA-13 and SDS-PAGE protein profiles, it was established that strains isolated from bacteriosis-affected weeds of wheat agrophytocenosis belong to *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Evaluating the effect of pesticides, as one of the most important abiotic factors of agrophytocenoses, on the pathogen of basal bacteriosis, it was established that the vast majority of pesticides do not have significant antibacterial action against *P. syringae* pv. *atrofaciens* and other phytopathogenic bacteria, in particular *P. syringae* pv. *aptata*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas vesicatoria*. It was found that only products that contain mancozeb are characterized by antibacterial activity against phytopathogenic bacteria and can be used to control the causative agents of bacterial diseases. Microbial preparations based on *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aureofaciens*, which were characterized by antagonistic activity, can be an alternative to chemical drugs in control of phytopathogenic bacteria *P. syringae*.

It was established that benomyl, thiophanate-methyl, fludioxonil, and tribenuron-methyl + trifensulfuron-methyl cause an increase in the number of Str^R mutations of *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Tribenuron-methyl + triphensulfuron-methyl has the greatest mutagenic activity, which increased the number of Str^R mutations of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 in 4.7– 6.5 times. Benomyl, thiophanate-methyl, fludioxonil show weak mutagenic activity, increasing the number of Str^R mutations in *P. syringae* pv. *atrofaciens* 1.8 – 2.4 times. Thiophanate-methyl, fludioxonil demonstrate mutagenic activity in the Ames-test with *S. typhimurium* TA98.

For the first time, it was established that alpha-cypermethrin and tribenuron-methyl + trifluralin-methyl increase in 2,3 – 3,6 times the frequency of morphological dissociation of the causative agent of basal bacteriosis of wheat by 10 – 100 times with the formation of modified R-shape colonies. The frequency of alpha-cypermethrin-induced R-forms depended on the strain of *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Thus, the R-form frequency of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 was 5×10^{-2} , and of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 – 2×10^{-2} . *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 was the most sensitive to the studied insecticide – the frequency of the occurrence of its R-forms was 2×10^{-1} . The frequency of the morphological dissociation of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 was 5×10^{-1} under the influence of tribenuron-methyl + trifluralin-methyl.

R-dissociants by physiological and biochemical properties did not differ from each other and had slight differences from the original S-form *P. syringae* pv. *atrofaciens*. All R-dissociants of *P. syringae* pv. *atrofaciens* interacted with strain-specific antiserum. R-forms of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 cause a hypersensitivity reaction on tobacco leaves. By artificial inoculation of wheat R-forms of *P. syringae* pv. *atrofaciens* cause the appearance of typical symptoms of basal bacteriosis, therefore retain their virulence properties.

The ability to form a biofilm is important for the successful colonization of the phyllosphere, and the successful colonization of this niche by phytopathogenic bacteria is a prerequisite for infecting plants. R-forms of *P. syringae* pv. *atrofaciens* formed a biofilm better than the S-form. Thus, the mass of the biofilm formed by the alpha-cypermethrin-induced R-form of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 was more than by 2 times heavier, and formed by the spontaneous R-form of this strain was more than by 3 times heavier compared to the mass of biofilm formed by the S-form of this strain. The mass of the R-form biofilm of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 was 2.3 times heavier to the mass of biofilm formed by the S-form of this strain.

In our opinion, the increase in the number of individuals which are characterized by an increased ability to form a biofilm in the population of *P. syringae* pv. *atrofaciens* can lead to the formation of the larger populations of this pathogen on

host plants and increase the risk of epiphytotics. The presence of R-forms in the population of the pathogen leads to complications in the diagnosis of basal bacteriosis.

Lipopolysaccharides (LPS) of phytopathogenic bacteria are one of the important factors in the interaction of bacteria and plants. To study biological activities were obtained LPS from the strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens* (UCM B-1011, 9780, 9400), the type strain *P. syringae* pv. *syringae* UCM B-1027, and strains that belong to pathovars which infect non-grain crops (sugar beets): *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922. In LPS of all studied strains of *P. syringae* protein concentration was significant and ranged from 10 to 24%. The LPS of *P. syringae* includes from 3.1 to 11.7% of nucleic acids per LPS dry weight. KDO in the amount of 0.56 – 1.50% was detected in all obtained LPS. The LPS of *P. syringae* contained fatty acids typical for these biopolymers. The extracted LPS biologically active in serological reactions and able to prevent hypersensitivity reactions on tobacco leaves.

In order to evaluate phytopathogenic bacteria as factors of biological mutagenesis in interaction with plants, they were studied in bacterial and plant test systems for mutagenicity. Under cultivation in the laboratory conditions *P. syringae* pv. *syringae* UCM B-1027 and *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 do not form compounds with mutagenic activity and do not cause activation of the promutagen 3,3'-diaminobenzidine in the Ames test. The LPS of *P. syringae* do not have mutagenic activity in the Ames test. At the concentrations of 5.0 mg/ml and 0.5 mg/ml, the LPS of all studied strains of *P. syringae* were able to reduce the amount of induced by potassium dichromate and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) His⁺-reversions in the Ames test. The LPS of the strains of other pathogens were characterized by the same activity against induced mutagenesis in the Ames test: *P. syringae* pv. *syringae* UCM B-1027, *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. syringae* 7922. Therefore, the antimutagenic activity is a common property of all LPS of *P. syringae*.

It was established that LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 and *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 cause an increase in the number of chromosomal aberrations in the *Allium cepa* test (under the action of LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 the frequency of aberrant anaphases and telophases was $11.1 \pm 0.6\%$, and under the action of LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 – $10.8 \pm 0.5\%$, in control – $4.8 \pm 0.2\%$). Thus, the LPS of phytopathogenic bacteria *P. syringae* pv. *atrofaciens* exhibit mutagenic activity in the *A. cepa* test at the concentration of 5.0 mg/ml increasing by 2.3 times the frequency of chromosomal aberrations.

Considering the relationship between mutagenic activity and tumor formation, the effect of the LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* on tumor formation was studied. The greatest antitumor activity was observed after the treatment of explants with the LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* before inoculation of the suspension of *A. tumefaciens* cells. We can assume that LPS affects the attachment of *A. tumefaciens* to plant cells. The injection of the LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011 to animals with reproduced tumor growth systems (ascites and solid forms tumors with different histogenesis) does not have a statistically significant effect on the tumor process.

One of the first stages of the plant response to pathogen penetration is the formation of reactive oxygen species, in particular, hydrogen peroxide and superoxide radical anions. It was established that the LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* increases the peroxidase activity of *A. cepa* seedlings. In onion seedlings, no significant change in catalase activity was observed under the action of LPS, but a significant increase in the amount of malonic aldehyde in onion seedlings was found. The obtained results let us suggest that chromosome damage in the cells of the onion apical meristem is mediated by oxidative stress induced by the LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

It was found that infection with the pathogen of basal bacteriosis *P. syringae* pv. *atrofaciens* causes a significant increase in the enzymatic activity of the components of antioxidant protection – catalase and peroxidase, which indicates the start of plant defense mechanisms, but under these conditions the content of basic

photosynthetic pigments in leaf blades decreased by 2 times, which could be caused both by a decrease in the level of consumption of assimilates for biosynthetic processes and by faster destruction of pigment complexes under conditions of oxidative stress.

The inactivated cells (IC) and the LPS of the virulent strain *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 caused the inhibition of the division and proliferation of wheat callus cells. The toxic effects on the viability of wheat callus culture were exhibited even at a low content in the medium (0,4% and 0,5%) of the IC and the LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 (callus tissue survival was 17,5-43,2%). Under the actions of the IC and the LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 the peroxidase activity of wheat callus tissue increased. The possibility of using the LPS and the IC of *P. syringae* pv. *atrofaciens* at the concentration of maximum inhibition IC_{80} as a selective factor for determining the resistance of wheat lines to the causative agent of basal bacteriosis is established.

According to the reaction of wheat callus cells to the phytotoxic metabolites of *P. syringae* pv. *atrofaciens* the “Podolianka” and “Stolychna” varieties are more resistant to the causative agent of basal bacteriosis, while the “Favorytka” and “Smuglianka” varieties are less resistant. Thus, the selection for resistance to the causative agent of basal bacteriosis can be carried out for the “Podolianka” and “Stolychna” varieties at the sublethal concentration of 0.8% IC of *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, the “Favorytka” variety – 0.6%, the “Smuglianka” variety – 0.4%. A method testing for resistance to the pathogen of basal bacteriosis is proposed and capable of regeneration resistant callus lines of the wheat varieties “Podolianka”, “Stolychna” are obtained. The callus lines of the “Podolianka” and “Stolychna” varieties are perspective for selection work to create varieties that are resistant to *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, phenotypic and genotypic properties, pesticides, morphological dissociation, lipopolysaccharide, phytotoxic action, genomodulation activity, wheat.

СПИСОК ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – особистий внесок здобувача, ** - прізвище Ващенко змінено на Буценко)

Монографії

1. Патица ВП, Пасічник ЛА, Гвоздяк РІ, Петриченко ВФ, Корнійчук ОВ, Буценко ЛМ, Житкевич НВ, Данкевич ЛА, Литвинчук ОА, Кириленко ЛВ, Мороз СМ, Гуляєва ГБ, Гнатюк ТТ, Калініченко АВ, Хархота МА. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. Монографія. Том. 2. За ред. В.П. Патики. Вінниця: «Віндрук», 2017. 432 с. (** – опрацьовано та проаналізовано наукову літературу та результати власних експериментальних досліджень, описано методика дослідження мутагенних властивостей метаболітів фітопатогенних бактерій, ПЛР із довільними праймерами та електрофорезу білків фітопатогенних бактерій, підготовлено до друку відповідні розділи*).
2. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Гуляєва ГБ, Токовенко ІП, Курченко ІМ, Сирчін СО, Юр'єва ОМ, Снігур ГО, Шевченко ОВ, Будзанівська ІГ, Кириленко ЛВ, Сушанович Д, Калініченко АВ, Демченко ОА, Патица ВП. Хвороби пшениці. За ред. Л.А. Пасічник. Монографія. Вінниця: «Віндрук», 2019. 139 с. (** – опрацьовано та проаналізовано наукову літературу та результати власних експериментальних досліджень, підготовлено до друку розділ «Бактеріальні хвороби пшениці»*).
3. Patyka VP, Pasichnyk LA, Butsenko LM, Petrychenko VF, Zubachov SR, Dankevych LA, Gnatiuk TT, Hulciaieva NB, Tokovenko IP, Kalinichenko AV, Suszanowich D, Kurash P, Patyka TI, Karpenko VP, Kirilenko LV, Demchenko AA. Express diagnostics of phytopathogenic bacteria and phytoplasmas in agrophytocenosis. Monograph. Opole (Poland): Publisher Wydawnictwo I Drukarnia Świętego Krzyża; 2019. 78 p. (** – опрацьовано та проаналізовано наукову літературу та результати власних експериментальних досліджень, описано методику штучної інокуляції пшениці фітопатогенними бактеріями та розроблено шкалу обліку штучного*

зараження, описані методики ідентифікації збудника базального бактеріозу за фізіолого-біохімічними ознаками, обґрунтовано використання тест-систем *api*, *micro-la-test* для прискорення ідентифікації збудника, підготовлено до друку відповідні розділи).

Статті у фахових виданнях

4. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гуляєва ГБ, Патица ВП. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фотосинтетичний апарат пшениці. Вісник аграрної науки. 2019; 11: 48–54. (* – запропоновано ідею дослідження, отримано і охарактеризовано ЛПС та клітини *P. syringae* pv. *atrofaciens* для здійснення досліджень, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).
5. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ. Сучасні методи контролю збудників бактеріальних хвороб зернових і овочевих культур виду *Pseudomonas syringae*. Захист і карантин рослин. 2019; 9-10: 1–5. (* – запропоновано ідею дослідження, вивчено вплив мікробіологічних препаратів на збудників бактеріальних хвороб зернових культур, визначено стійкість сортів пшениці до збудника базального бактеріозу, підготовлено статтю до друку).
6. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ. Генотоксична дія ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* у *Allium cepa*-тесті. Біологічні системи: теорія та інновації. 2019; 10(3): 44–54. (* – запропоновано ідею дослідження, отримано ЛПС та визначено їхні характеристики, здійснено дослідження ЛПС штамів 9780 та УКМ В-1011 у *Allium cepa*-тесті, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).
7. Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ. Клітинна селекція калюсних культур *Triticum aestivum* L. на стійкість до збудника базального бактеріозу. Наукові доповіді НУБіП України. 2019; 4(80). Режим доступу: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/issue/view/511>. (* –

запропоновано ідею дослідження, отримано біомасу *P. syringae* pv. *atrofaciens* для здійснення дослідження, вивчено вплив бактерій на калюсні клітини сортів пшениці, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).

8. Буценко ЛМ. Геномодулювальна активність *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Біоресурси і природокористування. 2019; 11(3-4): 31–40.
9. Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ. Вплив фітопатогенних бактерій та їхніх ліпополісахаридів на калюсні клітини пшениці. Біологічні системи: теорія та інновації. 2019; 10(2): 17–24. (* – отримано ЛПС та бактеріальні клітини для здійснення дослідження, визначено морфологічні показники калюсів, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).
10. Kolomiets YV, Grygoryuk IP, Butsenko LM, Kalinichenko AV. Biotechnological control methods against phytopathogenic bacteria in tomatoes. Applied ecology and environmental research. 2019; 17(2):3215–3230. (Indexed in Scopus) (* – отримано дані щодо впливу пестицидів на колекційні штами *Pseudomonas syringae*, підготовлено статтю до друку).
11. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА. Генетична гетерогенність штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на основі RAPD-ПЛР аналізу. Мікробіол журн. 2018; 80(5): 48–62. (* – запропоновано ідею дослідження, проведено експерименти, здійснено аналіз RAPD профілів *P. syringae*, підготовлено статтю до друку).
12. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ. Серологічні особливості бактерій *Pseudomonas syringae* агроєкосистем зернових культур. Мікробіол журн. 2018; 80(4): 41–54. (* – отримано експериментальні дані, здійснено аналіз серологічної приналежності штамів збудника базального бактеріозу та підготовлено статтю до друку).
13. Пастошук АЮ, Сківка ЛМ, Буценко ЛМ, Патица ВП. Вплив збудника базального бактеріозу на пшеницю різних сортів. Мікробіологія і

- біотехнологія. 2018; 2: 39–48. (* – запропоновано ідею дослідження, відібрано і охарактеризовано для дослідження штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, отримано біомасу бактерій).
14. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Савенко ОА, Патика ВП. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів *Pseudomonas syringae*, ізольованих з агрофітоценозу зернових культур. Мікробіол журн. 2017; 79(3): 56–64. (* – визначено склад жирних кислот штамів патоварів *P. syringae*, проаналізовано отримані дані та підготовлено статтю до друку).
15. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Булеца НМ, Патика ВП. Вплив інсектициду Альфа супер на фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* агрофітоценозу пшениці. Вісник аграрної науки. 2017; 3: 18–22. (* – вивчено властивості індукованих інсектицидом R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані і підготовлено статтю до друку).
16. Patyka V, Buletsa N, Pasichnyk L, Zhitkevich N, Kalinichenko A, Gnatiuk T, Butsenko L. Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. Ecol Chem Eng S. 2016; 23(2): 311–31. (Indexed in Scopus) (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено планування експериментів, вивчено вплив пестицидів на *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані).
17. Буценко ЛМ. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фізіолого-біохімічні процеси у клітинах *Allium sera*. Мікробіол журн. 2016; 78(5): 65–74. (Indexed in Scopus).
18. Булеца НМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Патика ВП. Фізіологія росту *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* за впливу пестицидів. Мікробіол журн. 2016; 78(3): 52–60. (Indexed in Scopus) (* – запропоновано ідею дослідження, вивчено вплив пестицидів на морфологічну дисоціацію колоній *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані та підготовлено статтю до друку).

- 19.Патика ВП, Гуляєва ГБ, Буценко ЛМ, Щербина ТМ, Осипенко БО, Пасічник ЛА. Антиоксидантна і фотохімічна активність фотосинтетичного апарату пшениці ярої за дії *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Вісник аграрної науки. 2016; 1: 27–31. (* – запропоновано ідею дослідження, підготовлено штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, здійснено штучне зараження рослин пшениці та визначено каталазну і пероксидазну активність, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).
- 20.Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів. Вісник аграрної науки. 2015; 9: 31–35. (* – розроблено методику проведення експериментів, вивчено вплив пестицидів на штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані, підготовлено статтю до друку).
- 21.Булеца НМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Патика ВП. Чутливість фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів. Мікробіол журн. 2015; 77(6): 62–69. (Indexed in Scopus) (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено планування експериментів, вивчено вплив пестицидів на *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані, підготовлено статтю до друку).
- 22.Петриченко ВФ, Корнійчук ОВ, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Житкевич НВ, Гнатюк ТТ, Патика ВП. Бактеріальні хвороби сільськогосподарських рослин і пестициди. Вісник аграрної науки. 2013; 4: 21–26. (* – вивчено антибактеріальну дію пестицидів на *P. syringae* pv. *atrofaciens*, здійснено аналіз експериментальних даних і підготовлено статтю до друку).
- 23.Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва Ю. Антибактеріальна та мутагенна дія деяких фунгіцидів на *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Агроєкологічний журнал. 2010; 4: 71–79. (* – отримано експериментальні дані щодо мутагенної дії пестицидів, здійснено аналіз експериментальних даних та підготовлено статтю до друку).

24. Гвоздяк РІ, Пасічник ЛА, Ващенко** ЛМ, Покинсьброда ТЯ, Карпенко ОВ. Синтез сурфактантів штамами *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Мікробіол. журн. 2009; 71(3): 10–14. (Indexed in Scopus) (* – підібрано та охарактеризовано штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* для здійснення дослідження, проаналізовано експериментальні дані).
25. Буценко ЛМ. Генотулювальна активність культуральної рідини та ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2008; 22: 80–83.
26. Ващенко** ЛМ, Коломієць ЮВ, Гвоздяк РІ. Антимутагенна дія ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* та *Pseudomonas wieringae*. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2007; 20: 226–229. (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено вивчення антимутагенної активності ЛПС у тесті Еймса, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).

Статті в інших виданнях

27. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ, Дуб'янська СА. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в агрофітоценозі пшениці. Миронівський вісник. 2019; 8: 91–107. (* – запропоновано ідею дослідження, проведено експерименти, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).
28. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА. Фітопатогенні бактерії в агрофітоценозах України. Пропозиція. 2018; 11: 116–119. (* – здійснено аналіз поширення фітопатогенних бактерій в агрофітоценозах України, підготовлено статтю до друку).
29. Butsenko L, Pasichuk L. Opportunistic bacteria in agroecosystems of Ukraine. Internat J of Med and Med Res. 2018; 4(1): 78–82. (* – запропоновано ідею дослідження, проведено серологічні дослідження, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку).

30. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Булеца НМ, Патица ВП. Протипухлинна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* PDDCC 4394 в рослинній і тваринній тест-системах. В: Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку; гол. ред. В.В. Моргун. К.: Логос; 2017: с. 61–68. (* – здійснено планування експериментів, вивчено протипухлинну дію ЛПС у рослинній тест-системі, проаналізовано дані, підготовлено статтю до друку).
31. Patyka VP, Butsenko LM, Pasichnyk LA. Application of commercial test-systems to identify gram-negative facultatively anaerobic bacteria. Agricultural science and practice. 2016; 1: 43 – 48. (Indexed in WoS) (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено експерименти, проаналізовано дані, підготовлено статтю до друку).
32. Пасичник ЛА, Савенко ЕА, Буценко ЛН, Патыка ВФ, Калиниченко АВ. *Pseudomonas syringae* в агрофітоценозе пшениці. Наука и мир. Международный научный журнал. 2014; 4(8): 52–56. (* – здійснено планування експериментів та визначено властивості і здійснено ідентифікацію виділених із пшениці бактерій *P. syringae* pv. *atropaciens*).
33. Патица ВП, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ. Бактеріальні хвороби пшениці та рису. Таврійський вісник аграрної науки. 2013; (1): 51–56. (* – проаналізовано поширення фітопатогенних бактерій в агрофітоценозах пшениці, підготовлено статтю до друку).
34. Патица ВП, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ. Бактеріальні хвороби зернових культур та заходи боротьби з ними. Посібник українського хлібороба. К.: 2013; (1): 202–208. (* – запропоновано на основі експериментальних даних використання манкоцебу для контролю фітопатогенних бактерій в агрофітоценозах пшениці, підготовлено статтю до друку).
35. Буценко ЛН, Пасичник ЛА, Патица ВФ, Терещук ЕА. Фунгициды и бактериоз: идет борьба в лаборатории. Зерно. 2013; (1): 148–151. (* – проаналізовано можливості застосування пестицидів у контролі фітопатогенних бактерій, підготовлено статтю до друку).

- 36.Пасичник ЛА, Ходос СФ, Буценко ЛН, Патыка ВФ. Бактериальные болезни пшеницы. Зерно. 2011; (2): 72–81. (* – визначено роль фітопатогенних бактерій у формуванні урожаїв пшениці, підготовлено статтю до друку).
- 37.Коломієць ЮВ, Буценко ЛМ. Вплив бактеріального стресу на ізоферментний спектр пероксидази пшениці і цукрових буряків. Науковий вісник НУБіП України. 2009; 134(3): 56–64. (* – здійснено планування експериментів, визначено ізоферментний спектр пероксидази пшениці, проаналізовано отримані дані, підготовлено статтю до друку).
- 38.Ващенко** ЛМ, Пасичник ЛА, Ходос СФ, Карєва Ю. Ефективність фунгіцидів для боротьби з бактеріозом зернових культур. Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення. 2009;13(53): 200–208. (* – здійснено планування експериментів, отримані і проаналізовані експериментальні дані, підготовлено статтю до друку).

Патенти

- 39.Пат. на корисну модель UA 1364416 U Експрес-діагностика збудника базального бактеріозу пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* / Пасичник ЛА, Буценко ЛМ, Патыка ВП. Опубл. 27.08.2019. Бюл. № 16.
- 40.Пат. на корисну модель UA 139621 U Спосіб відбору стійких до збудника базального бактеріозу клітинних ліній пшениці / Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ, Пасичник ЛА, Калініченко АВ, Патыка ВП. Опубл. 10.01.2020. Бюл. № 1.

Підручник

- 41.Буценко ЛМ, Пирог ТП. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник. Київ: Ліра-К, 2018. 346 с.

Методичні рекомендації

- 42.Патыка ВП, Пасичник ЛА, Данкевич ЛА, Мороз СМ, Буценко ЛМ, Житкевич НВ та ін. Діагностика фітопатогенних бактерій. Методичні рекомендації. За ред. В.П. Патыки. Київ, 2014. 76 с.

43. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Калініченко АВ, Патица ВП. Діагностика і контроль збудників бактеріальних хвороб пшениці. Методичні рекомендації. К.: ФОП ЯМЧИНСЬКИЙ, 2019. 37 с.

Тези доповідей

44. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Богдан ЮМ, Хархота МА. Жирнокислотні профілі ізольованих із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. В: Збірник тез VII Міжнарод. наук.-практичн. онлайн конференції «Біотехнологія: звершення та надії»; 15 листопада 2019: Київ, Україна. Київ, 2019. с. 42–43.

45. Буценко ЛМ, Дуб'янська СА. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9780 на мітотичний індекс у *Pisum sativum*. В: Матеріали наукової конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології»; 5 листопада 2019: Київ, Україна. Вінниця: Нова Книга, 2019. с. 34–35.

46. Буценко ЛМ. Біотехнологічні препарати у контролі збудника базального бактеріозу пшениці. В: Програма та тези матеріалів VIII міжнарод. науково-технічна конф. «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції»; 5-6 листопада 2019: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2019. с. 62–64.

47. Буценко ЛМ. Екологічні наслідки дії пестицидів на фітопатогенні бактерії. В: Збірник наукових праць VII-го Всеукраїнського з'їзду екологів з міжнародною участю; 25 – 27 вересня 2019: Вінниця, Україна. Вінниця, 2019. с. 120.

48. Буценко ЛМ. Активність пероксидази у проростках пшениці за дії *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. В: Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції «Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі»; 26 червня 2019: Умань, Україна. Умань, 2019. с. 8–9.

49. Дуб'янська С, Буценко Л. Індукція хромосомних аберацій у клітинах *Allium cepa* L. за дії ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

9780. В: Матеріали 85 міжнарод. наук. конф. молод. учених, асп. і студ. «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»; 11–12 квітня 2019: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2019. Ч.1. с.496.
50. Дуб'янська С, Буценко Л. Методи тестування на мутагенність чинників зовнішнього середовища. В: Матеріали II всеукраїнської науково-практичної інтернет конференції «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи»; 21 березня 2019: Кропивницький, Україна. Кропивницький, 2019. с. 220–221.
51. Буценко Л., Дуб'янська С, Коломієць Ю. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на калюсні клітини пшениці. В: Матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»; 15 листопада 2018 р: Київ, Україна. Київ: НУХТ, 2018. с. 45.
52. Дуб'янська С, Буценко Л. Характеристика ліпополісахаридів фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780. В: Матеріали 84 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»; 23–24 квітня 2018: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2018. Ч.1. с. 477.
53. Кукол К, Буценко Л. Реакція бур'янів у посівах цукрових буряків на штучне зараження збудниками бактеріозів. В: Тези доп. XII Всеукр. наук.-практ. конфер. мол. наук. і студ. «Екологічна безпека держави»; 19 квітня, 2018: Київ, Україна. К.: НАУ, 2018. с. 169–170.
54. Буценко ЛМ. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* – збудник базального бактеріозу пшениці. В: Матеріали Всеукраїнської наукової конференції «Інноваційні агротехнології»; 28 березня 2018; Умань, Україна. Уманський НУС: Редакційно-видавничий відділ, 2018. с. 40–42.
55. Butsenko L, Pasichnyk L, Patyka V. SDS-PAAG protein profiles of *Pseudomonas syringae* strains, isolated from segetal plants in wheat agrophytocenosis. В: Тези

- доповідей III-ї Міжнародної наукової конференції "Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті"; 19-20 квітня 2018; Київ, Україна. Київ, 2018. с. 30.
56. Коломієць ЮВ, Буценко ЛМ. Можливості використання пестицидів для контролю збудників бактеріальних хвороб. В: Міжнародна науково-практична конференція "Пермакультура та екологічно безпечне землеробство"; 24 – 25 лютого 2018: Ужгород, Україна. Ужгород: Вид-во УжНУ «Говерла», 2018. с. 75–77.
57. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гуляєва ГБ. Ліпополісахариди *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* та їх вплив на сільськогосподарські рослини. В: Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України; 11-15 вересня 2017: Одеса, Україна. Львів: СПОЛОМ; 2017. с. 123.
58. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Щербина ТМ. Бактеріози рослин і органічне землеробство. В: Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України; 11-15 вересня 2017: Одеса, Україна. Львів: СПОЛОМ; 2017. с. 81.
59. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА. Морфологічна дисоціація фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* за дії пестицидів. В: Матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017»; 20-22 квітня 2017: Тернопіль, Україна. Тернопіль, 2017. с. 171–175.
60. Buletsa NM, Butsenko LM, Pasichnyk LA, Patyka VP. Dissociation of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* under the effects of pesticides. In: Abstract book II International scientific conference «Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century»; 14-15 april 2016: Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2016. p. 28–29.
61. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА, Патица ВП. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів. В: Збірник тез IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів

- та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 21–22 травня 2015: Київ, Україна. Київ: ВЦ НУБіП України, 2015. с. 171–172.
62. Butsenko L. Genotoxicity of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. In: Congress NEEFood – 2013; 26 – 29 may 2013; Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2013. p. 209.
63. Буценко ЛМ, Терещук ОО. Протипухлинна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1011. В: Тез. доп. VII Всеукраїнської науково-практичної конф. «Біотехнологія XXI століття»; 24 квітня 2013: Київ, Україна. К.: НТУУ «КПІ», 2013. с. 21 – 22.
64. Butsenko LM, Olishevsky SV. Biological activities of the *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* UKM В-1011 lipopolysaccharide. В: Тези доповідей XIII з'їзду Товариства мікробіологів України; 1-6 жовтня 2013: Ялта, Україна. Ялта, 2013. с.60.
65. Терещук ОО, Буценко ЛМ. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* ІСМР 4394 на пухлиноутворення спричинене *Agrobacterium tumefaciens*. В: Збірник матеріалів конференції daRostim 2012 "Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє"; 19–22 листопада 2012: Київ, Україна. Київ, 2012. с. 313–314.
66. Патыка ВФ, Пасичник ЛА, Буценко ЛН. Бактериальные болезни зерновых культур. В: Материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений – проблемы и перспективы»; 30-31 октября 2012: Кишинев, Молдова. Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2012; 41: 18–21.
67. Буценко ЛН, Пасичник ЛА, Патыка ВФ. Использование коммерческих пестицидов для защиты от возбудителей бактериозов зерновых культур. В: Материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений – проблемы и перспективы»; 30-31 октября 2012: Кишинев, Молдова. Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2012; 41:357–360.
68. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасичник ЛА. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* на фізіологічний стан *Allium cepa* L. В: Матеріали Міжнародної

- конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 9-13 серпня 2011; Березне, Україна; Київ, 2011. с. 163–164.
69. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Дзяман ХЗ. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на хромосомні аберації у *Allium cepa* L. В: Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 21-25 вересня 2010: Ялта, Україна. Сімферополь, 2010. с. 177–178.
70. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ, Богдан ЮМ, Гвоздяк РІ. Використання RAPD-типування для вивчення гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу в Україні. В: Тези доповідей XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; 25-30 травня 2009: Ужгород, Україна. Ужгород: «Патент», 2009. с. 291.
71. Буценко ЛН, Гвоздяк РІ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ, Парий МФ. Генетический полиморфизм *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* и *P. syringae* pv. *coronafaciens*. В: Материалы Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии»; 2–6 июня 2008: Минск, Беларусь. Минск, 2008. Т.1. с. 63– 65.
72. Ващенко** ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва Ю. Використання комерційних пестицидів для боротьби із збудниками бактеріозів зернових культур. В: Тезиси докладов Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей»; 11–14 сентября 2007: Одесса, Украина. Одесса, 2007. С.62.
73. Ващенко** ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва Ю. Вплив фунгіцидів на деяких збудників бактеріозів зернових культур. В: Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції «Сучасні методи захисту рослин від шкідливих організмів»; 2–5 жовтня 2006; Київ, Україна. Київ, 2006. с.32–33.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	35
ВСТУП.....	37
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
<i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> В АГРОФІТОЦЕНОЗІ ПШЕНИЦІ: АДАПТАЦІЯ ДО УМОВ СЕРЕДОВИЩА ТА ВЗАЄМОДІЯ З РОСЛИНОЮ-ХАЗЯЇНОМ.....	46
1.1 Характеристика поширених в агрофітоценозі пшениці фітопатогенних бактерій <i>Pseudomonas syringae</i>	46
1.1.1 Симптоми і шкодочинність базального бактеріозу	47
1.1.2 Таксономічне положення і біологічні властивості збудника базального бактеріозу пшениці.....	49
1.2 Пестициди як фактор абіотичного стресу в агроценозі	55
1.2.1 Мутагенна дія пестицидів на мікроорганізми ризосфери і філосфери.....	60
1.3 Морфологічна дисоціація мікроорганізмів як спосіб адаптації до умов середовища.....	64
1.4 Вплив фітопатогенних бактерій <i>Pseudomonas syringae</i> на рослини	66
1.4.1 Фактори вірулентності <i>Pseudomonas syringae</i>	67
1.4.2 Ліпополісахариди <i>Pseudomonas syringae</i> і їхня біологічна активність.....	72
1.4.3 Активність ліпополісахаридів фітопатогенних бактерій у взаємодії з рослинами.....	78
1.4.4 Індукція фітопатогенними бактеріями захисних реакцій у рослин.	80
1.5 Геномодулювальна активність мікроорганізмів.....	84
1.5.1 Сполуки з мутагенною активністю, що утворюються в клітині хазяїна за інфікування.....	86
1.5.2 Антимутагенна активність мікроорганізмів та їхніх глікополімерів	97

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	103
2.1 Характеристика використаних в роботі бактерій.....	103
2.2 Методи вивчення біологічних властивостей <i>Pseudomonas syringae</i> ..	105
2.2.1 Мікробіологічні методи.....	105
2.2.2 Серологічні методи.....	107
2.2.3 Вивчення патогенних властивостей <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	109
2.2.4 Визначення здатності до утворення біоплівки.....	111
2.2.5 RAPD – ПЛР аналіз <i>Pseudomonas syringae</i>	112
2.2.6 Електрофорез білків <i>Pseudomonas syringae</i>	113
2.2.7 Визначення складу жирних кислот.....	115
2.3 Виділення ліпополісахаридів із клітин <i>Pseudomonas syringae</i>	116
2.3.1 Екстрагування ліпополісахаридів розчином хлориду натрію.....	117
2.3.2 Водно-фенольне екстрагування ліпополісахаридів.....	117
2.3.3 Очищення ліпополісахаридів.....	117
2.4 Методи встановлення хімічного складу ліпополісахаридів	118
2.4.1 Визначення вмісту вуглеводів.....	118
2.4.2 Визначення вмісту білків.....	118
2.4.3 Визначення вмісту нуклеїнових кислот.....	119
2.4.4 Визначення вмісту 2-кето-3-дезоксиктонової кислоти.....	119
2.5 Методи вивчення впливу ліпополісахаридів та пестицидів на бактерії.....	120
2.6 Методи дослідження фіто токсичності.....	121
2.6.1 Визначення ферментативної активності в рослинах.....	122
2.6.2 Вивчення функціонального стану фотосинтетичного апарату рослин.....	122
2.7 Дослідження геномодулювальної активності в тесті Еймса.....	123
2.7.1 Визначення мутагенної активності.....	125
2.7.2 Визначення антимутагенної активності.....	125

2.8 <i>Allium cepa</i> – тест.....	126
2.9 Метод оцінки дії пестицидів на <i>Pseudomonas syringae</i>	127
2.9.1 Характеристика досліджуваних пестицидів.....	128
2.9.2 Визначення мутагенної активності пестицидів.....	128
2.9.3 Визначення впливу пестицидів на морфологію колоній <i>Pseudomonas syringae</i>	131
2.10 Методи визначення впливу ліпополісахаридів на фізіолого- біохімічні процеси у рослин.....	132
2.11 Аналіз впливу ліпополісахаридів на пухлиноутворення у рослин та тварин	132
2.11.1 Вплив на індуковане <i>Agrobacterium tumefaciens</i> пухлиноутворення	133
2.11.2 Вивчення дії ліпополісахариду на експериментальні моделі пухлиноутворення у мишей.....	134
2.12 Дія <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> та їхніх ліпополісахаридів на калюсні клітини пшениці.....	136
2.13 Аналіз експериментальних даних.....	138
РОЗДІЛ 3 ПОШИРЕННЯ В АГРОФІТОЦЕНОЗІ ПШЕНИЦІ І ВЛАСТИВОСТІ <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>ATROFACIENS</i>	140
3.1 Біологічні властивості штамів <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> , виділених із рослин пшениці.....	140
3.2 Біологічні властивості штамів <i>Pseudomonas syringae</i> , виділених із сегетальної рослинності в посівах пшениці.....	152
3.3 Серологічна гетерогенність популяції збудника базального бактеріозу пшениці в Україні.....	159
3.3.1 Серологічна діагностика збудника базального бактеріозу пшениці	169
3.4 Жирнокислотний склад клітинних ліпідів <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> , ізольованих із агрофітоценозу пшениці.....	171
3.5 Гетерогенність штамів <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> на основі RAPD - ПЛР аналізу	181

3.5.1 RAPD - ПЛР аналіз ізольованих із рослин пшениці штамів <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	183
3.5.2 RAPD- ПЛР аналіз <i>Pseudomonas syringae</i> , виділених з бур'янів в агрофітоценозі пшениці.....	195
3.6 Білкові профілі штамів <i>Pseudomonas syringae</i> , які ізольовано із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці.....	198
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ПЕСТИЦИДІВ НА <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>ATROFACIENS</i>	205
4.1 Антибактеріальна активність пестицидів щодо фітопатогенних бактерій.....	205
4.1.1 Чутливість штамів збудника базального бактеріозу пшениці до пестицидів.....	206
4.1.2 Дія пестицидів на фітопатогенні бактерії, що спричинюють хвороби інших сільськогосподарських культур.....	212
4.2 Мутагенна здатність пестицидів.....	216
4.2.1 Мутагенна активність деяких пестицидів в тесті Еймса.....	217
4.2.2 Методологічні аспекти вивчення мутагенної активності пестицидів щодо фітопатогенних бактерій.....	219
4.2.3 Індукція мутацій резистентності до стрептоміцину у <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> за дії пестицидів.....	220
4.3 Морфологічна дисоціація <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> за дії пестицидів.....	224
4.3.1 Біологічні властивості R-форм <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	228
РОЗДІЛ 5 ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i>	237
5.1 Хімічний склад ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i>	237
5.2 Серологічна активність ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i>	240
5.3 Жирнокислотний склад ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i>	243
5.4 Вплив ліпополісахаридів на індукцію реакції надчутливості на	

листках тютюну.....	247
РОЗДІЛ 6 ГЕНОМОДУЛЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ТА ВПЛИВ НА ПУХЛИНОУТВОРЕННЯ <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i>	250
6.1 Активність бактерій виду <i>Pseudomonas syringae</i> в тесті Еймса.....	250
6.2 Ліпополісахариди <i>Pseudomonas syringae</i> в тесті Еймса.....	255
6.2.1 Вплив ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i> на спонтанний мутагенез у тест-штамів.....	257
6.2.2 Протекторна активність ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i> щодо індукованого мутагенезу у тест-штамів.....	262
6.3 Частота хромосомних аберацій у <i>Allium cepa</i> за дії ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atofaciens</i>	273
6.4 Ліпополісахариди <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> і пухлиноутворення.....	279
6.4.1 Протекторний ефект ліпополісахаридів щодо спричиненого <i>Agrobacterium tumefaciens</i> пухлиноутворення	280
6.4.2 Активність ліпополісахариду <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> УКМ В-1011 щодо формування модельних пухлини у мишей.....	283
РОЗДІЛ 7 ВПЛИВ ЗБУДНИКА БАЗАЛЬНОГО БАКТЕРІОЗУ ПШЕНИЦІ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ В РОСЛИННИХ КЛІТИНАХ.....	289
7.1 Перебіг фізіолого-біохімічних процесів у рослинах пшениці за взаємодії із збудником базального бактеріозу	289
7.2 Зміни функціонального стану фотосинтетичного апарату та активності оксидоредуктаз пшениці за дії ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atofaciens</i>	296
7.3 Вплив ліпополісахаридів <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> на активність антиоксидантного захисту у <i>Allium cepa</i>	303
7.4 Ріст калюсних клітин і тканин пшениці за дії <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atofaciens</i>	306
7.5 Відбір стійких до збудника базального бактеріозу калюсних	

культур озимої пшениці.....	314
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	322
ВИСНОВКИ.....	346
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	349
ДОДАТКИ.....	407

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	–	активні форми кисню
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕК ₅₀	–	ефективна концентрація, яка інгібує ріст тест-об'єкта на 50%
ЖК	–	жирні кислоти
C12:0	–	додеканова
C14:0	–	тетрадеканова
C 16:0	–	гексадеканова
C18:0	–	октадеканова
C16:1	–	<i>cis</i> -9-гексадецена
C18:1	–	<i>cis</i> -11-октадецена
C17:0 <i>cyclo</i>	–	<i>cis</i> -9,10-метилгексадеканова
C19:0 <i>cyclo</i>	–	<i>cis</i> -9,10-метилоктадеканова
3-ОН C10:0	–	3-гідроксидеканова
2-ОН C12:0	–	2-гідроксидодеканова
3-ОН C12:0	–	3-гідроксидодеканова
ІК	–	інактивовані клітини
ІК ₈₀	–	інгібуюча концентрація, за якої гинуть 80% калюсних клітин
ІФХ	–	індукція флуоресценції хлорофілу
КА	–	картопляний агар
КАБАК	–	кількість аберацій на аберантну клітину
КБ	–	картопляний бульйон
КДО	–	2-кето-3-дезоксиктонова кислота
кор-ОС	–	коровий олігосахарид
КУО/мл	–	колонієутворювальні одиниці в 1 мл
КР	–	культуральна рідина
ЛПС	–	ліпополісахарид
МА	–	малоновий альдегід

MI	–	мітотичний індекс
MNHГ	–	N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідин
MПА	–	м'ясо-пептоновий агар
MПБ	–	м'ясо-пептоновий бульйон
МС	–	середовище Мурасіге-Скуга
О-ПС	–	О-специфічний полісахарид
РНЧ	–	реакція надчутливості
СФМ	–	спонтанний фон мутацій
СТЖ	–	середня тривалість життя
ЗТЖ	–	зниження тривалості життя
ФСКР	–	фільтрат сконцентрованої культуральної рідини
ЧААТ	–	частота аберантних анафаз і телофаз
RAPD	–	довільно ампліфікована поліморфна ДНК (Random Amplified Polymorphic DNA)
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
ДСН	–	додецилсульфат натрію
ПААГ	–	поліакриламідний гель
Str ^R	–	резистентність до стрептоміцину
6-БАП		6-бензиламінопурин
2,4-Д		2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота

ВСТУП

Актуальність теми. На сьогодні у всьому світі відмічається все більш загрозливе розповсюдження і зростання агресивності фітопатогенних бактерій [93, 411, 494]. Така тенденція спостерігається і в Україні [443], зокрема, щодо збудників бактеріальних хвороб пшениці. Незважаючи на повідомлення про бактеріальні хвороби пшениці. Незважаючи на поширеність бактеріальних хвороб пшениці, вивчення їхніх збудників залишається обмеженим, а дані щодо розповсюдження бактеріальних хвороб досить часто не відповідають реальному стану речей, оскільки базуються лише на спостереженні за симптомами без ізолювання і вивчення збудника [179, 512].

Pseudomonas syringae є одним із найпоширеніших патогенів рослин і представляє науковий й практичний інтерес, з точки зору значних економічних збитків, які завдає рослинництву [258, 383]. Дослідження цього виду бактерій не втрачає актуальності і в наш час [198, 250, 411, 517, 531, 542]. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* впродовж багатьох років залишається одним з основних збудників бактеріальних хвороб пшениці [115, 131, 512]. Дослідження біологічних властивостей цього збудника, закономірностей формування популяції і механізмів, які дозволяють впливати на ці процеси, спеціалізації і взаємодії з рослиною-хазяїном має важливе фундаментальне і практичне значення. При цьому одним із факторів зростання кількості бактеріальних хвороб може бути використання пестицидів, які часто спричинюють незворотні зміни мікробних ценозів ґрунту і рослин [261, 345]. Дія пестицидів на сапротрофні бактерії у ґрунті і філосфері рослин інтенсивно вивчається [294, 493], однак їхній вплив на фітопатогенні бактерії майже не досліджено.

Розглядаючи агрофітоценози як комплексні системи, необхідно зазначити, що у цих екологічних нішах не лише фітопатогенні бактерії зазнають селективного тиску, а й самі вони є фактором впливу на рослини. Взаємодія бактерій з рослинами є складним процесом [235, 404], багато аспектів якого вивчено у обмеженої кількості модельних рослин. Одним з недосліджених аспектів такої взаємодії є здатність фітопатогена впливати на генетичний

матеріал рослини, яка встановлена для патогенних для ссавців мікроорганізмів [129, 352, 389, 464, 524]. Вважають, що здатність індукувати пошкодження геному макроорганізму патогенними бактеріями обумовлена дією їхніх ліпополісахаридів (ЛПС) [351, 352]. Адже їм притаманна токсична й імуномодулювальна дія щодо макроорганізмів [256]. ЛПС є факторами патогенності і *P. syringae* [48, 455]. У літературі майже відсутні дані про геномодулювальну активність фітопатогенних мікроорганізмів, яка є важливою з огляду на можливість їхнього впливу на рослини, збереження властивостей сортів, використання для створення генетичного різноманіття і відбору стійких до збудника форм рослин [382].

У відділі фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України впродовж багатьох років сформувалася наукова школа з вивчення бактеріальних хвороб зернових культур і біологічних властивостей їхніх збудників (д.б.н. К.Г. Бельтюкова, к.б.н. І.Б. Корольова, д.б.н. Р.І. Гвоздяк, д.б.н. Л.А. Пасічник). Створено колекцію культур фітопатогенних бактерій, що дає можливість на сучасному науковому рівні здійснювати подальше вивчення збудників бактеріальних хвороб пшениці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відповідності із напрямком науково-дослідних робіт, визначених програмою фундаментальних і прикладних досліджень Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України в межах бюджетних тематик відділу фітопатогенних бактерій «Екологічна роль фітопатогенних бактерій у формуванні збалансованого агрофітоценозу» (ДР № 0107U002577, 2007–2011 рр.), «Моніторинг та генетичне різноманіття фітопатогенних бактерій в системі органічного землеробства» (ДР № 0112U002751, 2012–2016 рр.), «Біосинтетична активність і функціональна роль фітопатогенних бактерій і мікоплазм при взаємодії з рослинами в агроєкосистемах» (ДР № 0117U004513, 2017–2019 рр.), Гранту Президента України для молодих вчених GP/F11/008 «Мутагенний вплив пестицидів на бактерії *Pseudomonas syringae*, патогенні для зернових культур»

(ДР № 0106 U004959, 2006 р.) і проекту Державного фонду фундаментальних досліджень F18/008 «Дослідження генетичного різноманіття фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*» (ДР № 0107U008386, 2006–2007 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є встановлення поширення збудника базального бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в агрофітоценозі пшениці і чинників, що призводять до посилення його шкідливості, та здатності патогена і його ліпополісахаридів спричинювати пошкодження генетичного матеріалу рослини за їх взаємодії.

Для досягнення мети дослідження необхідно було вирішити такі завдання:

- Виявити збудника базального бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в агрофітоценозі пшениці та охарактеризувати його біологічні властивості;
- Визначити ступінь спорідненості штамів збудника базального бактеріозу пшениці зі штамми *Pseudomonas syringae*, що ізольовані із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці;
- Оцінити токсичний і мутагенний вплив пестицидів на *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* й вивчити біологічні властивості фітопатогенних бактерій після дії пестицидів;
- Отримати й охарактеризувати ліпополісахариди представників виду *Pseudomonas syringae*;
- Дослідити геномодулювальну активність фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* і їхніх ліпополісахаридів у бактеріальній і рослинній тест-системах та встановити вплив на пухлиноутворення у рослинній і тваринній моделях;
- Вивчити вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на активність ферментів антиоксидантного захисту у рослинного тест-об'єкта *Allium cepa* і пшениці;

– Обґрунтувати можливість застосування ліпополісахаридів і інактивованих клітин *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* для відбору стійких до патогена форм пшениці *in vitro*.

Об'єкт дослідження – функціонування збудника базального бактеріозу в агрофітоценозі пшениці і його взаємодія з рослинами.

Предмет дослідження – фенотипові і генотипові властивості *P. syringae* pv. *atropaciens*, фітотоксична і геномодулювальна дія патогена.

Методи дослідження. Задля виконання поставлених завдань було застосовано мікробіологічні (ізолювання збудників із рослинних матеріалів, вивчення морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей бактерій, вивчення впливу на ріст бактерій пестицидів та ін.), серологічні (реакція аглютинації і подвійної дифузії в агар), біохімічні (виділення ліпополісахаридів і визначення їхнього хімічного складу, визначення ферментативної активності рослин), молекулярно-біологічні (RAPD – ПЛР аналіз, електрофорез білків зовнішньої мембрани бактерій) методи. Геномодулювальну активність вивчали у загальноприйнятих тест-системах: тесті Еймса і *Allium cepa*-тесті. Вплив на пухлиноутворення досліджено з використанням як рослинної (*Agrobacterium tumefaciens* – експлантати картоплі), так і тваринних (карциноми Ерліха і саркома 37 у мишей) моделей пухлиноутворення. Для дослідження впливу ліпополісахаридів на калюсні клітини пшениці застосовано біотехнологічні методи.

Наукова новизна одержаних результатів.

У дисертаційній роботі реалізовано системний підхід до вивчення збудника базального бактеріозу пшениці, вирішено актуальну наукову проблему – визначення факторів, що призводять до збільшення його шкідливості та науково обґрунтовано нові підходи до вдосконалення діагностики і контролю цього збудника.

Уперше встановлено, що *P. syringae* pv. *atropaciens* є поліфагом, який уражує пшеницю і сегетальну рослинність у її посівах. Показано однорідність популяції збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atropaciens*.

Вперше встановлено, що пестициди, які використовують в посівах пшениці (альфа-циперметрин, трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил), збільшують частоту утворення морфологічних дисоціантів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що ускладнює ідентифікацію патогена. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризуються підвищеною здатністю до утворення біоплівки за збереження вірулентності, що покращує здатність збудника виживати у філосфері і призводить до збільшення шкідливості базального бактеріозу. Виявлено, що трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил та беноміл, тіофанат-метил, флудіоксоніл проявляють мутагенну дію щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens*, спричинюючи збільшення кількості мутацій стійкості до стрептоміцину.

Здійснено комплексний аналіз геномодулювальної активності фітопатогенних бактерій *P. syringae*. Виявлено, що загальною властивістю ліпополісахаридів патоварів *P. syringae* є антимуутагенна активність у бактеріальній тест-системі. В рослинній тест-системі з *A. cerea* ЛПС збудника базального бактеріозу індукують підвищення частоти хромосомних аберацій.

Встановлено, що *P. syringae* pv. *atrofaciens* на початковому етапі розвитку патологічного процесу підвищує активність ферментів антиоксидантного захисту рослин пшениці – каталази і пероксидази, знижує вміст основних фотосинтетичних пігментів, пригнічує процеси фотосинтезу.

Вперше продемонстровано токсичну дію ліпополісахаридів та інактивованих клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* на калюсні клітини пшениці та обґрунтовано їх застосування для оцінки стійкості сортозразків пшениці до збудника базального бактеріозу в умовах *in vitro*.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані експериментальні результати покладено в основу експрес діагностики збудника базального бактеріозу пшениці з використанням високоспецифічної антисироватки до представників чотирьох серогруп *P. syringae* pv. *atrofaciens* (Пат. на корисну модель UA № 1364416 U Експрес-діагностика збудника базального бактеріозу пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. 27.08.2019.).

Результати вивчення властивостей *P. syringae* pv. *atrofaciens* використано при підготовці методичних рекомендацій з діагностики фітопатогенних бактерій та з виявлення й ідентифікації збудника базального бактеріозу пшениці. На основі даних щодо вивчення впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії і *P. syringae* pv. *atrofaciens*, зокрема, підготовлено рекомендації щодо контролю збудників бактеріальних хвороб.

Запропоновано спосіб оцінки стійкості до збудника базального бактеріозу клітинних ліній пшениці на основі даних токсичності ліпополісахаридів *P. syringae* pv. *atrofaciens* для калюсних клітин пшениці і мутагенності в рослинній тест-системі (Пат. на корисну модель UA № 139621 U Спосіб відбору стійких до збудника базального бактеріозу клітинних ліній пшениці. 10.01.2020.).

Результати роботи увійшли до лекційних курсів та практичних робіт з дисциплін «Біотехнологічні методи захисту рослин», «Фітосанітарний моніторинг», «Інтегрований захист рослин», «Екологія шкідників та збудників хвороб» для бакалаврів і магістрів у Національному університеті харчових технологій, Національному університеті біоресурсів і природокористування України, Полтавській державній аграрній академії. Матеріали дисертаційної роботи використано під час підготовки до видання підручника: Буценко Л.М., Пирог Т.П. Біотехнологічні методи захисту рослин. К.: Видавництво Ліра-К, 2018. 346 с. (Рекомендовано Вченою радою Національного університету харчових технологій, протокол № 3 від 31 жовтня 2018 р.).

Особистий внесок здобувача. Викладені у дисертаційній роботі наукові результати, положення, висновки і рекомендації виконано здобувачем особисто і є його науковим доробком. Здобувачу належить постановка проблеми, визначення мети і задач дослідження, розроблення методичних підходів для мікробіологічних, біохімічних і молекулярно-генетичних досліджень збудника базального бактеріозу і його ліпополісахаридів. У роботах, які опубліковано у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає у визначенні завдань, виборі методів, проведенні досліджень, інтерпретації та обговоренні результатів,

узагальненні даних, формулюванні висновків і написанні статей. Здобувачем самостійно здійснено аналіз теоретичних і практичних положень, підготовлено текст дисертації й науково обґрунтовано положення роботи.

Планування основних напрямів роботи, обговорення концепції роботи та експериментальних даних, ізолювання і вивчення серологічних властивостей штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, впорядкування структури дисертаційної роботи здійснено із науковим консультантом д.б.н., с.н.с. Пасічник Л.А.

Експериментальні дослідження фізіолого-біохімічних змін у рослинах пшениці за дії штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* та їхніх ЛПС здійснено спільно із к.б.н. Гуляєвою Г.Б. Дослідження впливу альфа-циперметрину і трибенурон-метилу+трифенсульфурон-метилу на кількість Str^R мутацій і морфологічну дисоціацію штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 виконано разом із Булецою Н.М. Вивчення впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на розвиток карциноми Ерліха та саркоми у мишей здійснено у співпраці з к.б.н. Олішевським С.В. (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України). Вплив бактерій і їхніх ЛПС на калюсні клітини пшениці вивчено спільно із д.с.-г.н. Коломієць Ю.В. (Національний університет біоресурсів та природокористування України). Зазначені співробітники є співавторами відповідних публікацій.

Автор висловлює щирю вдячність д.б.н., проф. Гвоздяку Р.І. і завідувачу відділу фітопатогенних бактерій, академіку НААН України, д.б.н. Патиці В.П. за сприяння у проведенні досліджень за темою дисертації.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи було представлено на Всеукраїнській науковій конференції «Сучасні методи захисту рослин від шкідливих організмів» (Київ, 2006), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей» (Одесса, 2007), VI Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2008), XII, XIII, XV з'їздах Товариства мікробіологів України (Ужгород, 2009; Ялта, 2013; Одеса, 2017),

Міжнародній конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології” (Ялта, 2010), Міжнародній конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології” (Березне, 2011), Международном симпозиуме «Защита растений – проблемы и перспективы» (Кишинев, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції daRostim-2012 «Микробные биотехнологии: актуальность и будущее» (Київ, 2012), Congress NEEFood – 2013 (Київ, 2013), VII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2013), IV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2015), II, III International scientific conference «Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century» (Київ, 2016, 2018), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017» (Тернопіль, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції «Пермакультура та екологічно безпечне землеробство» (Ужгород, 2018), Всеукраїнській науковій конференції «Інноваційні агротехнології» (Умань, 2018), XII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих науковців і студентів «Екологічна безпека держави» (Київ, 2018), 84, 85 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів “Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті” (Київ, 2018, 2019), II Міжнародній науково-практичній інтернет конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (Київ, 2018). VIII Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (Київ, 2019), VII Всеукраїнському з’їзді екологів з міжнародною участю (Вінниця, 2019), Науково-практичній конференції «Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі» (Умань, 2019), II Всеукраїнській науково-практичній інтернет конференції «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи» (Кропивницький, 2019), Науковій конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології» (Київ, 2019), VII

Міжнародній науково-практичній онлайн конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2019).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 73 наукові праці, з них 35 статей, у тому числі 23 – у фахових виданнях, 7 – у виданнях, що включені до міжнародних баз даних Scopus і WoS, 2 патенти України на корисні моделі, 3 розділи у монографіях, 1 підручник, 2 методичні рекомендації, 30 тез доповідей.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 432 сторінках друкованого тексту і складається із «Вступу», розділів «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», 5 розділів власних досліджень, а також аналізу і узагальнення результатів, висновків і додатків. Список використаних джерел містить 559 посилань, з яких 381 англійською мовою. Дисертаційна робота містить 67 таблиць і 54 рисунки.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

***PSEUDOMONAS SYRINGAE* В АГРОФІТОЦЕНОЗІ ПШЕНИЦІ: АДАПТАЦІЯ ДО УМОВ СЕРЕДОВИЩА ТА ВЗАЄМОДІЯ З РОСЛИНОЮ- ХАЗЯЇНОМ**

В останні роки дослідники відмічають збільшення шкідливості бактеріальних хвороб як за рахунок зростання агресивності відомих патогенів, так і у зв'язку із появою нових [93, 94, 179, 494]. Така ситуація вимагає всебічного дослідження цих фітопатогенних мікроорганізмів. При цьому найбільшу увагу привертають патогени стратегічно важливих культур, якою для нашої країни є пшениця [120]. Одним із першочергових завдань, що забезпечує отримання високих урожаїв цієї культури, є контроль збудників хвороб пшениці [262].

Незважаючи на численні повідомлення про бактеріальні хвороби пшениці в усьому світі вивчення бактерій, що спричиняють ці хвороби, залишається обмеженим, а кількісна інформація, наприклад, про втрати врожаю та епідеміологію захворювання часто є недоступною [262, 512]. Крім того, дані щодо поширення бактеріальних хвороб досить часто не відповідають реальному стану речей, оскільки базуються лише на спостереженні за симптомами без ізолювання збудника і підтвердження його ідентичності [179, 262].

1.1 Характеристика поширених в агрофітоценозі пшениці фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae*

Найпоширенішими збудниками бактеріальних хвороб пшениці в світі є *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* [67, 172, 262, 384, 512]. В Україні найчастіше як збудник бактеріальних хвороб зернових культур трапляється *P. syringae* pv. *atrofaciens* [131]. Він також є основним збудником бактеріальних хвороб пшениці в Росії

[394], Болгарії [193, 519], Центральній Європі [208, 499], Новій Зеландії [538], Ірані [339].

1.1.1 Симптоми і шкодочинність базального бактеріозу

Хвороба, яку спричинює *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 на пшениці, отримала назву базальний бактеріоз пшениці, базальна гниль лусочок, базальна плямистість лусочок, гниль колоска, «basal glume rot».

З часу відкриття збудника базального бактеріозу є декілька підтверджених повідомлень про зумовлені ним епіфітотії. У Південній Дакоті (США) впродовж семи років спостерігали епіфітотію, спричинену збудником базального бактеріозу, поширеність збудника становила 75% і більше [432]. У Німеччині на заболочених ґрунтах втрати урожаю, заподіяні *P. syringae* pv. *atrofaciens*, становили не менше 50% [395]. Епіфітотійне поширення бактеріальних хвороб, спричинених *P. syringae*, виявлено в Краснодарському краї Російської Федерації [111]. У Єгипті, Мексиці і Бразилії зважаючи на небезпеку цього збудника у 2018 році його було включено до списку карантинних (<https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAT/categorization>). У природі збудник базального бактеріозу також уражує жито. Окрім втрат урожаю пшениці, *P. syringae* pv. *atrofaciens* спричинює погіршення якості її зерна [395, 521].

Залежно від зони вирощування пшениці й погодних умов, сприятливих для розвитку бактеріозу, це захворювання може уражувати 10-80% колосків під час епіфітотії. В регіонах Центральної Чорноземної зони поширення базального бактеріозу становить від 1 до 30-50% (при розвитку хвороби від 0,3 до 25,3%) залежно від сорту та умов вирощування пшениці. Деякі сорти можуть уражуватися на 72% [115].

Характерною ознакою базального бактеріозу є ураження нижньої частини лусочки. Однак, трапляється ураження верхньої її частини і плямистості різних частин рослин у стадії вегетації. Частіше базальний бактеріоз розвивається на лусочках і листках, рідше на зерні, кореневій шийці й інших частинах пшениці.

На початку розвитку хвороби на листях у фазі сходів утворюються прозорі, водянисті, маслянисті, коричневі, білуваті чи жовті витягнуті плями. З часом вони видовжуються, підсихають, буріють, а по їхньому краю з'являється коричнева, коричнево-бура або червоно-бура облямівка [262, 384]. Також спостерігається утворення темних штрихів, які при злитті забарвлюють нижню частину стебла в темний колір. При загниванні вузла кущіння на нижній частині стебла і листях з'являються некротичні бурі плями, тканина яких мацерується, що призводить до в'янення окремих листків або всієї рослини [512]. У фазу наливу зерна на різних частинах рослин утворюються бурі, коричневі, бежеві чи чорні витягнуті плями і штрихи. Іноді на лусочках утворюються плями, які переходять на остюки. Найчастіше і найсильніше уражуються колоскові і квіткові лусочки, на зовнішній і внутрішній поверхні яких з'являються окремо розташовані дрібні плями чорного або коричневого кольору [262].

Уражене збудником зерно пшениці на зародковому або базальному кінці має плями від світло-коричневого до вугільно-чорного кольору. Хоча цей симптом є характерним для ураження *P. syringae* pv. *atrofaciens*, він не є специфічним і може спостерігатися за ураження зерна іншими збудниками, такими як *Bipolaris sorokiniana* та *Alternaria alternata* [172]. Загалом необхідно зазначити, що подібність симптомів спричинених бактеріями і мікроміцетами хвороб призводить до відсутності достовірної інформації про поширення бактеріозів та застосування некоректних заходів для контролю збудників [384].

Базальний бактеріоз активно розвивається в прохолодні і вологі роки, особливо за холодної вологої весни. Його поширенню сприяє знижена температура (15-18 °C) в період від початку колосіння до досягання, а також підвищена вологість повітря (понад 60-65%) і велика кількість опадів перед наливом зерна. Оптимальною температурою для розвитку базального бактеріозу є 23-25 °C [115, 518].

P. syringae pv. *atrofaciens* трапляється як епіфіт на насінні пшениці і жита [135]. Також збудника в епіфітній фазі можна виявити на незернових культурах [476] та однорічних і багаторічних бур'янах, де він перебуває, не спричинюючи

видимих ознак ураження [495]. На думку Duveiller et al., оскільки патоген завжди присутній як епіфіт на пшениці, то лише сприятливі для розвитку патогена погодні умови є вирішальними для виникнення епіфітотій [262].

1.1.2 Таксономічне положення і біологічні властивості збудника базального бактеріозу пшениці

Збудник базального бактеріозу пшениці належить до виду *P. syringae*, який є широко розповсюдженим патогеном багатьох рослин. Спочатку, беручи до уваги патогенні властивості бактерій виду *P. syringae*, вони були розділені на 40 патоварів [547, 548]. Згодом використання новітніх методів дослідження дозволило встановити існування так званого ‘*P. syringae* complex’, який налічує до десяти видів *Pseudomonas* і 60 патоварів *P. syringae* [546]. Представники трьох із них здатні спричинювати ураження пшениці: *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *japonica*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [263].

P. syringae pv. *atropaciens* – грамнегативні неспоротвірні аеробні рухливі палички. На лакмусовій сироватці утворюють луг, пептонізують молоко, утворюють флуоресціюючий пігмент, не утворюють індолу і сірководню, переважна більшість – розріджують желатин. Бактерії в аеробних умовах використовують як єдине джерело вуглецевого живлення глюкозу, манозу, арабінозу, сахарозу, манітол, сорбітол, інозитол, і не ферментують лактозу, рамнозу, дульцитол, саліцин, інулін, мальтозу [212].

При вивченні великої кількості ознак фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* було виділено п’ять, які можуть бути успішно використані для диференціації цих бактерій на групи: утворення левану, активність оксидази, здатність мацерувати картоплю, утворення аргініндигідролази та реакція надчутливості (РНЧ) на листках тютюну (так званий LOPAT-тест). За цими ознаками фітопатогенні бактерії роду *Pseudomonas* розділено на п’ять видових груп. Види, що характеризуються відсутністю оксидази та аргініндигідролази, нездатністю мацерувати картоплю, здатністю індукувати РНЧ віднесено до

ЛОРАТ 1 групи. Подальші дослідження довели, що ці види розрізняються за патогенністю, але їх не можна розділити за використання біохімічних та фізіолого-культуральних тестів. Ці види було об'єднано в один вид *P. syringae* з розділенням на патовари [546].

Багато дослідників вказують на близьку спорідненість патоварів *P. syringae* за біохімічними, фізіологічними та навіть генетичними ознаками. В останні роки в літературі з'являються роботи, які свідчать що генетична спорідненість в середині виду *P. syringae* не співпадає з його розподілом на патовари [244, 296, 546]. Так, Barta T. M. та Willis D. K. у своїй роботі [206] з вивчення збудників бактеріальних хвороб вівса дійшли висновку про неправомірність розділення збудників виду *P. syringae* на патовари *coronafaciens*, *striafaciens*, *garcae*.

За отриманими методом ДНК-ДНК гібридизації даними фітопатогенні *Pseudomonas* було розділено на 9 геномовидів [284]:

1 геномовид включає патовари виду *P. syringae*: *syringae*, *aptata*, *lapsa*, *rapulans*, *pisi*, *atrofaciens*, *aceris*, *panici*, *dysoxyli*, *japonica*;

2 геномовид включає патовари: *phaseolicola*, *ulmi*, *mori*, *lachrymans*, *sesami*, *tabaci*, *morsprunorum*, *glycinea*, *ciccaronei*, *eriobotryae*, *mellea*, *aesculi* та види *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas meliae*;

3 геномовид включає патовари: *tomato*, *maculicola*, *viburni*, *apii*, *delphinii*, *ribicola*;

4 геномовид включає: вид “*Pseudomonas coronafaciens*” та патовари виду *P. syringae*: *porri*, *garcae*, *striafaciens*, *oryzae*, *zizaniae*;

5 геномовид – *P. syringae* pv. *tremae*;

6 геномовид – *Pseudomonas viridiflava*;

7 геномовид – *P. syringae* pv. *tagetis* і *P. syringae* pv. *helianthi*;

8 геномовид – *P. syringae* pv. *these* і *Pseudomonas avellanae*;

9 геномовид – *P. syringae* pv. *cannabina*.

Отже, розділення виду *P. syringae* на патовари не співпадає з даними вивчення геномів представників цього виду [258, 447, 546]. На сьогодні важко

передбачити чи буде в подальшому таксономія виду *P. syringae* базуватися на дослідженні фенотипових ознак, чи буде враховувати лише дані щодо послідовності нуклеїнових кислот у геномах [366, 546] та чи буде збережено таку таксономічну одиницю як патовар у межах виду *P. syringae*.

При вивченні генетичного поліморфізму фітопатогенних бактерій, ізольованих з різних рослин, вченим вдавалося об'єднувати досліджувані штами у групи за спільною рослиною-хазяїном [343, 401]. Також, за дослідження бактерій *Xylella fastidiosa*, встановлено, що відсоток генетичного різноманіття за рахунок географічного походження є меншим, ніж відсоток відмінностей, пов'язаний з різноманіттям рослин, з яких виділений збудник [402].

Відомо, що вивчення складу білків зовнішньої мембрани може надати важливу інформацію для характеристики, класифікації та ідентифікації мікроорганізмів. Електрофорез білків зовнішньої мембрани бактерій у поліакриламідному гелі (ПААГ) є досить чутливим методом. За даними деяких авторів електрофорез у ПААГ дає відповідь щодо спорідненості штамів бактерій на рівні ДНК:ДНК гібридизації [266, 379, 435, 515, 523, 552].

Наприклад, у білковому профілі *P. syringae* pv. *pisi* незалежно від приналежності до певної раси, серогрупи, біохімічних ознак присутні білки з молекулярною масою 60, 65 и 150 кДа. Наявність цих білків відрізняє *P. syringae* pv. *pisi* від *P. syringae* pv. *syringae* (білки з такою молекулярною масою відсутні), *P. syringae* pv. *glycinea* (відсутній білок 60 кДа) та *P. syringae* pv. *aptata* [379]. У профілі білків умовно-патогенних штамів *Pseudomonas* та штамів *Burkholderia* (*B. mallei*, *B. cepacia*) визначено від 35 до 45 білкових фракцій розміром від 19 до 130 кДа. На основі порівняльного аналізу білкових профілей було здійснено групування досліджуваних бактерій: група I була сформована видом *Burkholderia*, який раніше належав до другої групи *Pseudomonas* за RNA-DNA гомологією, до групи II увійшли досліджені види *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. testosterone*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. mendocina*) [222]. За аналізу профілю цільноклітинних білків 210 штамів роду *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. agarici*, *P. alcaligenes*, *P. amygdali*,

P. caricapapayae, *P. chlororaphis*, *P. cichorii*, *P. coronafaciens*, *P. corrugata*, *P. ficuserectae*, *P. fragi*, *P. mendocina*, *P. pertucinogena*, *P. tolaasii*, *P. viridiflava*) показана як значна гетерогенність профілів для різних видів цього роду, так і однорідність профілів білків всередині видів [515]. Три досліджені штами комплексного виду *P. syringae* групуються в одному кластері [515]. Отримані дані показали цінність вивчення білкових профілів для ідентифікації бактерій *P. syringae*.

Щодо збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, показано його близьку спорідненість до *P. syringae* pv. *syringae* за патогенними властивостями, здатністю до утворення токсинів, профілем жирних кислот та профілем білків [323, 324].

Важливе значення для ідентифікації і діагностики збудника базального бактеріозу пшениці має вивчення його серологічних властивостей. Незважаючи на те, що дослідники намагались розробити схеми серотипування фітопатогенних видів бактерій роду *Pseudomonas* [217, 372, 430, 433, 434, 467], до теперішнього часу немає єдиної загальноприйнятої схеми.

За схемою серогрупування фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, яку було розроблено Пастушенко Л.Т. і Симонович І.Д [140, 141] та якою до сьогодні користуються дослідники, штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які виділено із пшениці, належать до серогруп II, IV, V і VI. Штами серогруп I і V мають лише специфічні для цих груп антигени, а штами серогрупи II, IV, VI, крім специфічних, мають спільні міжгрупові антигени [140]. Для ідентифікації збудника базального бактеріозу пшениці необхідно використовувати поліштамову сироватку до представників чотирьох серогруп *P. syringae* pv. *atrofaciens* [140, 141].

В дослідженнях Пасічник Л.А. було підтверджено та розширено уявлення про серологічні властивості *P. syringae* pv. *atrofaciens* [441]. Зокрема встановлено, що 46% штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які ізольовані із рослин жита, належать до серогрупи I, 30% – до другої, 10% – до четвертої, 14% – до п'ятої та 10% – до шостої серогруп. Серед штамів, які було ізольовано із

пшениці, не було виявлено штамів, які належать до першої серогрупи. Більшість штамів (59%) належали до IV серогрупи, 20% – до II серогрупи, 10% – до V, 11% – до VI [140, 141, 443].

Дослідники відмічають не лише приуроченість серогруп до рослини, яку уражують бактерії, але й зв'язок між регіоном виділення штаму та його приналежністю до певної серогрупи (табл. 1.1) [130].

Необхідно зазначити, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які належать до серогрупи I, виділяли лише із жита в Україні. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані в Болгарії за даними [135] належали до II, IV, VI серогруп. Ізольовані у Британії штами віднесено до серогрупи III. У Греції виділяли штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* серогруп III та II, у США – II і V, Новій Зеландії – II і IV [135].

Таблиця 1.1 – Серологічні властивості *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених із жита в різних регіонах України [130]

Регіон, у якому було ізольовано збудника	Серогрупа				
	I	II	IV	V	VI
Київська обл.	+	+	+	-	+
Закарпатська обл.	+	+	+	-	-
Житомирська обл.	+	-	-	-	-
Черкаська обл.	+	-	-	-	-
Волинська обл.	+	+	-	+	-

Необхідно зауважити, що зв'язок між серологічними властивостями штамів та рослиною, яку вони уражують, відмічається також для *P. syringae* pv. *coronafaciens*. Показано, що штами цього патовару, які виділено із уражених рослин вівса, належать до серогруп I і V. А штами, які ізольовано із сегетальних рослин, належать до серогруп I і II.

Штами *P. syringae* pv. *syringae*, виділені з різних видів рослин різних регіонів Ірану, за результатами агарпреципітації було об'єднано в сім серологічних груп [342]. На відміну від цих результатів J. Otta [430] згрупував фітопатогенні ізоляти *P. syringae*, виділені з понад 30 видів рослин з різних

країн світу, у 10 серотипів. Ізоляти *P. syringae*, виділені з пшениці, кукурудзи, сорго і щетинника, було згруповано у шість серотипів [431]. Але деякі дослідники, вивчаючи антигенні властивості штамів патоварів *P. syringae*: *aptata*, *tabaci*, *morsprunorum*, *phaseolicola*, показали, що кожен з цих патоварів формує однорідні серогрупи [268, 295].

За серологічною схемою, розробленою М. Saunier із співавторами, штами *P. syringae* розподілені на 23 серологічні групи [467]. Шістнадцять штамів *P. syringae* рв. *atrofaciens* із пшениці ними розподілені на чотири серологічні групи (SYR1, SYR2, MOP2, APTPIS), а дев'ять штамів *P. syringae* рв. *coronafaciens* – на три (RIB, SYR2, PERSAVTOM2). Штами *P. syringae* серогруп SYR1, APTPIS, і SYR2 відповідають штамам серогруп II, IV, VI (відповідно) схеми серогруповання, розробленої Л.Т. Пастушенко і І.Д. Симонович [140, 141].

Штами *P. syringae* рв. *atrofaciens* з інших зернових культур не представлені в схемах Л.Т. Пастушенко, І.Д. Симонович [140, 141] та М. Saunier із співавторами [467]. При аналізі штамів *P. syringae* рв. *atrofaciens* із жита в Україні додатково виявлено бактерії, які віднесено до серогрупи I [130], яка відповідає серогрупі PERSAVTOM2 за класифікацією М. Saunier та ін.[467].

З моменту створення схеми серогруповання [140, 141] 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 ліпополісахаридів (ЛПС) [86, 87]. Високий ступінь серологічної спорідненості між штамми бактерій виявляють тільки при наявності в складі ЛПС повністю ідентичних О-ПС ланцюгів [89].

В той же час запропоновано схему серогруповання [434] на основі серогрупових і 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 03c [434].

Отже, збудник базального бактеріозу є одним із найрозповсюдженіших бактеріальних патогенів пшениці. Він спричинює хвороби зернових культур і, зокрема, пшениці у багатьох країнах світу та може зумовлювати епіфітотії. Однак, залишається дискусивним питання таксономічного статусу цього збудника. Адже вчені відмічають високу спорідненість цих бактерій і *P. syringae* pv. *syringae*. Разом із тим дані щодо серологічних і генотипових характеристик збудника є обмеженими. В науковій літературі немає даних щодо вірулентності цього збудника для незернових культур і, зокрема, бур'янів у посівах зернових культур, що не дозволяє оцінити значення останніх у циркуляції фітопатогена.

1.2 Пестициди в агроценозі як фактор абіотичного стресу

Одним із важливих аспектів вивчення збудників хвороб є дослідження функціонування їхніх популяцій у сучасних агроценозах за впливу пестицидів. Адже за даними багатьох досліджень значна частка цих хімікатів діє на на ґрунтові мікроорганізми та бактерії у філосфері рослин та має мутагенну активність [50, 110, 261, 294, 493].

Сучасне інтенсивне сільське господарство ґрунтується на використанні великої кількості агрохімікатів, які дають змогу значно підвищити урожайність та захистити рослини від шкідників і збудників хвороб [99]. Однак, крім позитивних, більшість агрохімікатів мають і свої негативні риси [50, 99]. Особливо це стосується хімічних препаратів для контролю збудників хвороб та шкідників.

До основних екологічних проблем, що виникають в результаті застосування пестицидів, належать [99, 118, 168]:

– поява нових шкідників. Вона спостерігається, коли розповсюдження виду шкідливих комах, яких раніше стримували ентомофаги, набуває загрозливих розмірів після різкого скорочення останніх унаслідок хімічного захисту рослин. Класичний приклад – масове розмноження червоного павутинного кліща після загибелі його природних ворогів, що викликане застосуванням ДДТ.

– розвиток резистентності. При регулярному застосуванні пестицидів може виникнути необхідність у поступовому збільшенні норм витрати для забезпечення певного рівня ефективності, до того ж у деяких випадках навіть це не призводить до бажаних наслідків. Причиною є селекція резистентних особин у кожному поколінні шкідників [316]. Наприклад, резистентність *Botrytis cinerea* до азоксистробіну, іпродіону, піриметанілу та тіофанат-метилу спостерігається у 87,5, 76,6, 23,4 та 92,2% ізолятів із звичайних полів та 31,4, 22,9, 14,3 і 51,4% ізолятів із органічних полів відповідно [201].

– накопичення в харчових продуктах залишків пестицидів, що перевищують допустимі норми, загальне забруднення навколишнього середовища [122, 474]. Необхідно зазначити, що залишки пестицидів виявляються навіть у тих регіонах, де їх не використовували, наприклад, в Антарктиді. Це пояснюється тим, що пестициди можуть досягати верхніх шарів атмосфери, переноситись вітром і опадами та випадати на значній відстані від місць застосування [398].

– знищення дикої фауни і флори. Пригнічуючи певні види комах, інсектициди впливають на ланцюг живлення. Зазначалось, наприклад, що інтенсивне використання пестицидів на зернових призводить до різкого скорочення чисельності куропаток унаслідок зменшення кількості комах, якими птахи живляться. Гербіциди завдають шкоди дикій фауні, знищуючи рослини, що служать кормом для того чи іншого виду тварин.

Отже, застосування хімічних засобів призводить до цілого ряду негативних наслідків, але відмовитись від їх використання у теперішній час просто неможливо, оскільки воно є складовою частиною сучасних технологій вирощування сільськогосподарських культур.

В агрофітоценозах пестициди впливають не лише на цільові організми, а й інших мешканців цієї екологічної ніші [261, 377]. Так, фунгіциди, що широко використовуються для контролю грибних патогенів, впливають на бактерії у філосфері рослин [294]. Результати PCR-DGGE аналізу свідчать про суттєву зміну структури мікробіому у філосфері пшениці після застосування фунгіциду еностробурину. Якщо у мікробіомі контрольних рослин виявляли бактерії роду *Pseudomonas*, то у оброблених еностробурином зразках збільшувалася кількість бактерій роду *Pantoea*, хоча кількість бактерій роду *Pseudomonas* теж залишалася на високому рівні [294].

Ще однією небезпекою використання пестицидів є феномен перехресної стійкості до пестицидів та антибіотиків [247]. На думку вчених стійкість до пестицидів сприяє розвитку антибіотикорезистентності [456]. Збільшення резистентності до антимікробних речовин є головною проблемою громадської охорони здоров'я та значною екологічною загрозою. Вона обмежує можливості лікування бактеріальних інфекцій, що призводить до підвищення показників захворюваності, смертності та дорогих витрат на медичні послуги [247].

Учені всього світу наполегливо працюють над розробкою більш безпечних засобів захисту рослин, але використання хімічних засобів на найближчий час залишається одним з головних у захисті рослин від шкідливих організмів. Тому в таких умовах важливим завданням спеціалістів аграрного профілю є опрацювання усіх можливих прийомів, спрямованих на запобігання і зменшення негативної післядії препаратів, які застосовуються у сільському господарстві. Необхідно дотримуватись регламентів їх використання, категорично забороняється використовувати препарати, які не дозволені відповідними державними установами. Основними заходами, що дозволяють зменшити шкоду від застосування пестицидів є суворе дотримання рекомендацій та строків внесення пестицидів, зменшення дози та кратності застосування пестицидів, використання біотехнологічних препаратів замість хімічних.

Таким чином, запобігання забрудненню навколишнього середовища хімічними засобами є однією з важливих проблем сучасного інтенсивного землеробства.

Серед досліджених на мутагенність пестицидів щонайменше 50% виявляють генотоксичну активність в різних тест-системах [81].

Мутагенною активністю у дослідях *in vivo* щодо соматичних і статевих клітин ссавців характеризуються етилендибромід, гідразин, паракват та, у меншому ступені, ендосульфат, манкоцеб, фосфорорганічні і хлорорганічні та інші пестициди [57, 332, 341]. Мутагенні властивості виявлено у ліндану, малатіону, метациду в дослідях з мишами і дрозофілою [356]. В культурі СНL-клітин мікроядра утворювалися за дії етил- і метилазинофосу, диметоату, хлорпирифосу, етіону, паратіону, фозаіону та інших сполук [419].

Численні дослідження мутагенної активності фунгіцидів було здійснено за використання різноманітних тест-об'єктів. У цих дослідженнях встановлено, що фунгіцид беноміл (фундазол) індукує утворення мікроядер в клітинах кісткового мозку мишей після одноразового перорального введення в дозі 2500 мг/кг, що свідчить про його кластогенну активність [466]. В той же час беноміл, його комерційні препарати Фундазол 50WP і Бенлат 50WP, метил-2-бензімідазолу карбамат за тестування у тест-системі з *Salmonella typhimurium* TA100, TA1530, TA1535 і TA1950, як із метаболічною активацією і без неї, не виявляли значимої мутагенної активності [273]. У дослідженнях з клітинами кісткового мозку мишей антифунгальний антибіотик ауреофунгін у дозі 30 мг/кг спричинював збільшення кількості домінантних летальних мутацій [408]. Токсичні ефекти тіраму, зіраму та дитану М-45 виявлено за дослідження статевих клітин мишей [306]. Генотоксичну активність тіраму у дозі 25 – 50 мг/кг відмічено також за врахування мікроядер в клітинах кісткового мозку мишей [246]. Металаксил і фунгіциди, що є похідними хлоралкілтіодикарбоксіму, характеризуються цитогенетичною активністю в умовах *in vitro* [319, 451].

Гербициди амбуш, трефлан, блазер, раундап, 2,4-Д-амін, кросбоу, галекрон, прамітол, пондмастер проявляли мутагенну активність у дослідях з дрозозфілою [335]. Показана мутагенна активність гербицидів похідних дифенілового ефіру в тесті з *S. typhimurium* YG1026, *S. typhimurium* YG1021 [425].

За дослідження пестицидів Актара, Моспілан, Пенкоцеб, Фастак, що найбільш часто використовують для обробки посадок картоплі, не було виявлено мутагенної дії в тесті Еймса з *S. typhimurium* TA 100 [101]. Гербицид Зенкор в концентрації 1 мкг/чашка індукував більш ніж дворазове перевищення числа колоній His⁺ ревертантів над спонтанним фоном мутацій тест-штаму, що свідчить про його слабку мутагенну активність [101]. Показано, що водний екстракт листя рослин картоплі, оброблених пестицидом Зенкор, проявляє слабкий мутагенний ефект в тесті Еймса. Отже, накопичення даного пестициду в рослинах в кількостях, що викликають генні мутації, може становити потенційну небезпеку для навколишнього середовища, в тому числі і для людини [100].

Хімічні фунгіциди на основі беномілу (Фундазол 503П) та тираму (Вітавакс 200ФФ) спричинюють збільшення кількості мутацій у тест-штамів *S. typhimurium* TA98, *S. typhimurium* TA100, *E.coli* WP2 [97].

Інсектициди дельтаметрин у дозах більших за 32,5 мг/кг і пириметамін у дозі 40 мг/кг індукують утворення мікроядер у клітинах кісткового мозку мишей [429, 437]. Суперметрин спричинював збільшення кількості хромосомних аберацій в клітинах кісткового мозку мишей [257]. Добре відомі мутагенні властивості інсектициду ДДТ, який нині заборонено до використання [482, 529]. Фосфорорганічні інсектициди диметоат і дихлорвос індукують хромосомні аберації в клітинах кісткового мозку щурів [410]. При оцінці мутагенної активності ендосульфана та лямбда-цигалотрину в тесті з *S. typhimurium* TA100 та TA98 з метаболічною активацією і без такої показано дозозалежне збільшення кількості ревертантних колоній у обох тест-штамів для обох речовин. Однак, достовірний мутагенний ефект встановлено лише для

ендосульфану у дослідженнях із *S. typhimurium* TA98 з метаболічним активуванням. В той же час виявлено достовірну мутагенність комбінації ендосульфану і лямбда-цигалотрину навіть у нижчих ніж окремі речовини дозах. Тобто, за певних умов навіть сублетальні дози пестицидів можуть призводити до мутагенного ефекту, цитотоксичності і, зрештою, канцерогенності [463].

Використання пестицидів призводить до зростання кількості пошкоджень ДНК в лімфоцитах периферійної крові людей, які з ними професійно контактують [330]. Дослідження підтверджують також потенційну небезпеку для людини навіть залишкових кількостей пестицидів у продуктах харчування [57, 81].

Необхідно зазначити, що мутагенною активністю характеризуються не лише хімічні препарати, що використовуються в сільському господарстві, а й сполуки, які утворюються під час деградації [393].

1.2.1 Мутагенна дія пестицидів на мікроорганізми ризосфери і філосфери

Більшість пестицидів, що використовують в сільському господарстві, мають широкий спектр дії. З одного боку це забезпечує можливість застосування цих речовин для контролю широкого кола патогенів та шкідників. З іншого боку це обумовлює їхній вплив на нецільові організми.

Переважає більшість пестицидів (як тих, що використовують для оброблення насіння та ґрунту, так і тих, що застосовують для оброблення рослин в період вегетації) зрештою потрапляє в ґрунт і впливає на нецільові мікроорганізми в ризосфері [493]. Відомо, що використання пестицидів призводить до зміни мікробного ценозу ґрунту та його біологічної активності, негативних змін у молекулярно-масових характеристиках гумінових кислот [145]. Особливо чутливими до дії пестицидів є мікроорганізми, що здійснюють біологічне перетворення целюлози та нітрифікацію [479].

Проблема взаємодії мікробних угруповань ґрунту та пестицидів має два аспекти: негативний вплив пестицидів на мікробіоту ґрунту та трансформація їх ґрунтовими мікроорганізмами [145].

Встановлено, що оброблення тетраконазолом змінювало структуру мікробного угруповання ґрунту, зменшувало генетичне різноманіття мікроорганізмів у ньому [493].

Відомо, що гексахлорциклогексан та продукти його деструкції культурами *P. putida* 9 і *S. maltophilia* ІМВ В-7288 мають токсичну і мутагенну дію на природні мікробні угруповання ґрунту, знижуючи їх виживання на 6,9 - 21,7% від вихідного рівня і діючи на рівні слабких мутагенів. Використання ґрунтового ценозу як тест-системи для оцінки дії інсектициду дало можливість отримати детальну картину токсичних і мутагенних властивостей гексахлорциклогексану і продуктів його деструкції [178].

Відомо, що гексахлорбензол (ГХБ), який використовувався як фунгіцид під злакові культури, а також міститься у викидах при одержанні гербіцидів атразину, пропазину, симазину, характеризується високим біоаккумуляційним потенціалом і тривалим періодом напіврозпаду (2,7-5,7 років). На полігоні захоронення ГХБ (м. Калуш) встановлено порушення структури і функцій мікробного ценозу ґрунту полігону: чисельність олігонітрофілів, амоніфікуючих, фосфатмобілізуючих, амілолітичних, педотрофних мікроорганізмів знизилася у 15–1000 разів порівняно з ґрунтом за його межами. Порушення у функціональній активності виявлялися у підвищенні базального дихання (БД) – в 1,6-1,9 рази, і зниженні інтенсивності субстрат індукованого дихання (СІД) порівняно з контрольним варіантом. Підвищення СІД у ґрунті полігону перевищувало БД лише у 2,3–2,5 рази, тоді як у ґрунті за межами полігону СІД зростало лише у 4,7 рази порівняно з БД [177].

В той же час саме мікроорганізми, які здатні пристосовуватися до нових умов середовища та регулювати власний метаболізм для споживання нових субстратів, є основою для розроблення технологій очистки ґрунтів від залишків пестицидів та інших ксенобіотиків [358].

На разі в науковій літературі значна кількість робіт присвячена вивченню впливу пестицидів на ризосферні мікроорганізми [327]. В той же час вплив пестицидів на мікроорганізми філосфери залишається поки майже повністю поза увагою дослідників [448].

Варто зауважити, що і сам мікробіом філосфери є мало вивченими, оскільки тривалий час дослідники приділяли увагу лише фітопатогенним мікроорганізмам та спричинюваним ними хворобам. Разом з тим філосфера є однією із найбільших екологічних ніш на Землі [527]. У цій еконіші знаходиться велика кількість найрізноманітніших мікроорганізмів. Про існування частини з них дослідники можуть судити лише спираючись на дані вивчення генетичного різноманіття тому, що вони є некультивованими формами [545]. Поверхня листя рослини або філосфера вкрита гіперрізноманітними мікробними угрупованнями. Вони опосередковують функціональні властивості листя, впливають на фітосанітарний стан та сприяють функціонуванню рослини, включаючи надходження поживних речовин та води. Вчені визначають чотири основні процеси, що формують мікробіоти філосфери: розсіювання, еволюційна диверсифікація, відбір та дрейф [301, 511]. На ці процеси впливають рослинохазяїни, умови довкілля та мікробні взаємодії [392, 511]. При цьому рослинахазяїн є одним із визначальних факторів у формуванні власного мікробного ценозу [275, 527]. Показано, що таксономічний склад епіфітних бактерій на листках пшениці і ячменю змінюється в процесі вегетації. На молодому листі домінують псевдомонаси і артробактер, які змінюються при старінні листя міксобактеріями і бацилами. Представники міксобактерій виявлені в якості домінантів і на зернах в колосках пшениці та ячменю. Таким чином, у філосфері спостерігали заміну екрісотрофів, що живляться виділеннями рослин, на бактерії гідролітичного блоку, здатні здійснювати деструкцію відмерлих рослинних тканин. Продуктивність сільськогосподарських рослин залежить від балансу і взаємодії між патогенними та корисними мікроорганізмами [416, 417]. Управління мікробними угрупованнями у філосфері може бути використано з

метою підвищення урожайності рослин. Однак, необхідною передумовою для цього є розуміння структури і динаміки цих утворень [275].

Відомо, що мікроорганізми у філосфері відчувають селективний тиск рослини-хазяїна, мікроклімату та господарської діяльності людини [275]. Мікроорганізми, що знаходяться у філосфері, зазнають впливу пестицидів, які застосовуються як безпосередньо для оброблення зелених частин рослини, так і тих, що були внесені в ґрунт [407]. Показано, що системні пестициди металаксил та імідаклоприд, мають незначний вплив на епіфітну грибну та бактеріальну мікробіоту. Єдиним винятком було застосування імідаклоприду для оброблення листків перцю, яке показало більш значний вплив на епіфітну грибну біоту. У своєму дослідженні Moulas et al. відмічають збільшення кількості бактерій родини *Enterobacteriaceae* після оброблення зелених частин рослин металаксиллом [407]. Ця родина об'єднує таких збудників як *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia* (які виявляють у свіжих салатах, призначених для споживання людиною [536]) та рослинні патогени, такі як *Erwinia* [407]. Виявлена стимуляція може бути пов'язана з участю бактерій родини *Enterobacteriaceae* у деградації металаксилу [407].

Дослідження Gu et al. [294] показали, що застосування фунгіциду еностробурину спричинює суттєві зміни в мікробному угрупованні пшениці. Після оброблення рослин еностробурином спостерігали появу бактерій роду *Pantoea*. Автори передбачають участь цих бактерій у деградації фунгіциду еностробурину в філосфері пшениці. Бактерії родів *Enterobacter* та *Klebsiella* демонструють підвищену здатність до зниження вмісту хлорпірифосу у філосфері [285, 480].

Встановлено, що засоби захисту рослин суттєво впливають на такі нецільові мікроорганізми, як дріжджі на поверхні зерна пшениці, які пригнічують розвиток патогенів. Відмічено пригнічення цієї групи мікроорганізмів за використання бензімідазолу, стробилурина, тріазолу і морфолінових фунгіцидів.

Вивчено вплив піретроїдного інсектициду циперметрину на мікробіоту філосфери огірка [557]. Аналіз жирних кислот фосфоліпідів (PLFA) показав, що застосування циперметрину призвело до значного збільшення бактеріальної біомаси та зниження вмісту грибною біомаси.

У польових дослідах з пшеницею та ячменем фунгіцид манкоцеб суттєво зменшував популяцію мікроміцетів на листі та не впливав на чисельність популяції бактерій. Автори відзначають, що після застосування манкоцебу епіфітні бактерії не колонізували екологічну нішу, яка стала вільною у результаті застосування фунгіциду. Через деякий час після використання фунгіцидів мікробні популяції відновлювалися до початкового рівня [484].

Отже, пестициди незалежно від способу застосування впливають на нецільові мікроорганізми філосфери сільськогосподарських культур. Хоча дані, щодо всебічного вивчення такого впливу та прогнозу наслідків дії пестицидів, в науковій літературі вкрай обмежені. Відсутні також дані щодо вивчення впливу пестицидів на нецільові патогенні організми.

1.3 Морфологічна дисоціація мікроорганізмів як спосіб адаптації до умов середовища

Ксенобіотики є стрес-фактором, адаптація до якого може супроводжуватися зміною певних властивостей мікроорганізмів. Пристосувальні реакції до дії пестицидів виявляються в різноманітній корекції біохімічних та фізіологічних процесів, що, відповідно, забезпечує їх подальше існування за умов такого антропогенного навантаження [72, 490].

Одним із варіантів адаптаційних змін бактерій є морфологічна дисоціація клітин і колоній, зумовлена перебудовою поверхневих структур клітин [123, 287].

Дисоціація – це особливий, властивий лише бактеріям тип мінливості, за якого відбувається розщеплення в межах одного виду на S- і R-форми. Це явище вперше досліджували Е.Вейль й А.Фелікс (1917 р).

В основу цього розподілу покладені генетичні перебудови, що призводять до зміни деяких властивостей (культуральних, антигенних, біохімічних). Так, S-форми (англ. Smooth - гладкий) частіше більш агресивні, володіють добре вираженими антигенними властивостями, мають капсулу, на середовищах утворюють гладкі блискучі колонії. R-форми (англ. Rough - грубий, нерівний) зазвичай менш агресивні, не мають капсули, формують великі шорсткі колонії [129]. Однак, S-форми є більш агресивними не для всіх видів бактерій. Збудники сибірської виразки, туберкульозу і чуми характеризуються вірулентними R-формами [129]. Дисоціація зазвичай протікає в одному напрямку: від S- до R-формі, іноді через проміжні стадії утворення слизових колоній.

На сьогодні вважають, що морфологічна дисоціація бактерій складається з двох процесів: виникнення дисоціантів в результаті зміни генетичних властивостей клітини і селекція утворених варіантів під впливом зовнішніх факторів. Виникнення нових генотипів відбувається на основі спонтанних мутацій, переносом генетичного матеріалу і перебудові геному всередині однієї клітини [124].

Тобто, дисоціація може відбуватися при перенесенні генетичного матеріалу в процесі кон'югації, трансформації, трансдукції чи фагової конверсії. Але у цих випадках, окрім акцепторної клітини, обов'язкова наявність донора чи ДНК іншої клітини або фага. Це може відбуватися у відкритих системах, які вивчає медична та ґрунтова мікробіологія. Однак, за вирощування чистих культур мікроорганізмів в лабораторних умовах також спостерігають процес морфологічної дисоціації. Вважають, що головна роль в таких випадках належить мігруючим генетичним елементам: транспозонам, плазмідам, помірним фагам [124]. Якщо мутації, які супроводжують процеси вбудовування в нуклеоїд транспозонів, інсерційних елементів та інше, порушують функцію оперонів, що відповідають за синтез ЛПС, утворюються R-форми бактерій. Поява R-форм може бути пов'язана з перебудовою в елементах клітинної стінки або полісахаридної капсули зі зміною або повною

відсутністю ферментів біосинтезу цих клітинних структур внаслідок мутації [270, 514]. Такі мутації вважаються плейотропними, оскільки, крім змін у морфології колоній, спостерігається зниження вірулентності та характеру серологічної реакції мутантних форм [472].

Утворення S- та R-форм найбільш вивчене для збудників інфекційних хвороб людини. Встановлено, що S- та R-форми *Mycobacterium abscessus* характеризуються відмінностями у характері взаємодії з імунними клітинами макроорганізму, що зумовлює необхідність пошуку лікарських засобів та стратегій, які спрямовані як на знищення внутріклітинної популяції збудника, так і на запобігання утворення ним позаклітинних структур, які дозволяють R формам *M. abscessus* уникати фагоцитозу [525].

Для фітопатогенних псевдомонасів також характерна природна мінливість популяції з розщепленням на різні морфотипи [127, 175]. Вважають, що у *P. syringae* спонтанна втрата плазмід (90 МДа) приводить до втрати вірулентності і зміни морфології колоній [124]. Різниця у вірулентних властивостях спонтанних S- та R-форм *P. syringae* не відмічали [127].

Значення дисоціації полягає в отриманні бактеріями селективних переваг, що забезпечують їх існування в організмі людини або в зовнішньому середовищі. Відомо, що S-форми більш стійкі до фагоцитозу. R-форми, у свою чергу, більш стійкі до факторів навколишнього середовища.

Отже, явище дисоціації сприяє гетерогенності бактеріальної популяції, підвищує її стійкість, розширює межі виживання виду. Адже дисоціанти відрізняються не лише морфологічно, а й можуть мати відмінності патогенних, вірулентних, біохімічних властивостей [123]. Утворення R-форм бактерій також ускладнює мікробіологічну діагностику хвороб [129, 242].

1.4 Вплив фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* на рослини

Бактерії виду *P. syringae* давно та добре відомі фітопатогени. Вони характеризуються здатністю спричинювати різноманітні типи уражень

(плямистості, штрихуватості, опіки, язви) на широкому діапазоні рослин-хазяїнів [271, 498]. Однак, окремі патовари *P. syringae* зазвичай уражують обмежене коло видів рослин і індукують реакцію надчутливості у стійких видів [204, 498].

1.4.1 Фактори вірулентності *Pseudomonas syringae*

P. syringae також добре відомий епіфіт. Він є звичайним мешканцем філосфери і демонструє добру адаптованість до виживання у цій екологічній ніші. Дослідники вважають, що саме великі епіфітні популяції *P. syringae* є первинним інокулюмом за інфікування рослин [313, 498]. Відомо, що однією із характеристик бактерій, які можуть ефективно колонізувати філосферу, є здатність до формування біоплівки на поверхні рослини [264, 381]. Встановлено, що вірулентність штамів *P. syringae* корелює із їх здатністю продукувати альгінат, який може бути основним компонентом біоплівки [359, 549]. Також важливим для утворення біоплівки є інший полісахарид, що утворюється штамми *P. syringae* – леван [359]. На думку вчених, відчуття кворуму й утворення біоплівки, разом із рухливістю і здатністю до хемотаксису забезпечує можливість акумулювання поживних речовин та води, що є передумовою успішної колонізації та існування бактерій у філосфері [203, 238, 365, 508, 509].

Навіть після проникнення всередину рослини-хазяїна через природні отвори чи пошкодження ці бактерії деякий час живуть у міжклітинному просторі тканин живих рослин як гемібіотрофи і лише згодом спричинюють симптоми хвороби [313, 498]. Така складна і різноманітна взаємодія бактерій виду *P. syringae* з рослинами очевидно вказує на існування у мікроорганізмів різноманітних факторів, що регулюють їхні відносини з макроорганізмом. Ці фактори можна розділити на ті, що забезпечують колонізацію рослини, та ті, що спричинюють у рослині патологічний процес.

Серед факторів, що сприяють колонізації рослини-хазяїна, добре відомі ефекторні білки, які є продуктами *hrp*-генів [221, 313]. Факторами патогенності

фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* є ліпополісахариди, токсини [210, 414, 540]. Як фактори вірулентності розглядають також екзополісахариди, гормони, сидерофори, адгезини, флагелін, пектолітичні ферменти [185, 190, 221, 255, 390, 397].

Hrp-гени та їх продукти. Імовірність розвитку багатьох хвороб рослин обумовлюється взаємодією сигнальних систем бактерій і рослин, яка визначає можливість виявлення патогенних властивостей бактерій і можливість захисту у рослин. За сучасними уявленнями взаємодія між патогеном та рослиною-хазяїном може відбуватися наступними шляхами:

- неспецифічна індукція захисних реакцій у рослини і їхнє специфічне пригнічення (супресія) паразитом;
- специфічна індукція захисних реакцій у рослин і її втрата внаслідок мутації гена авірулентності у паразита [82].

Специфічні індуктори захисних сил рослини отримали назву *еліситори*. Гени бактерій, під контролем яких вони утворюються, називають генами авірулентності (*avr*-гени). Гени, що контролюють синтез специфічних супресорів, називають генами вірулентності (*vir*-гени). Отже, продукти генів *avr* індують у рослинах захисні реакції (зокрема реакцію надчутливості, яка є наслідком взаємодії продуктів доміантних генів стійкості рослин та продуктів доміантних генів авірулентності фітопатогенів, синтез фітоалексинів тощо). Продукти *vir*-генів забезпечують захист патогена від імунної відповіді хазяїна [82].

При вивченні мутантних штамів фітопатогенних бактерій, які одночасно втратили вірулентність та здатність індукувати реакцію надчутливості у стійких рослин, було ідентифіковано ще одну групу генів, які регулюють взаємовідносини цих бактерій і рослин. Вони дістали назву *hrp*-гени (*hypersensitive response and pathogenicity*) [230, 363, 364]. З функціонуванням цих генів пов'язана здатність фітопатогенних бактерій уражувати чутливі до патогена рослини і індукувати реакцію надчутливості у стійких [334, 364].

Hrp-білки фітопатогенних бактерій характеризуються високою гомологією із протеїнами, які функціонують у системі секреції протеїнів III типу (ССТТ) зоопатогенів [230, 231, 249, 290, 364]. Таким чином, встановлено, що *hrp*-гени фітопатогенних бактерій безпосередньо пов'язані з ССТТ. Згодом за ССТТ фітопатогенних бактерій закріпилася назва Hrp-система секреції [364].

ССТТ забезпечує переміщення протеїнів патогенних грамнегативних бактерій до цитоплазми еукаріотичної клітини, де вони сприяють патогенезу взаємодіючи із системою трансдукції сигналів клітин-хазяїна і впливають на інші клітинні процеси [192, 281, 288, 406]. Перенесення протеїнів за допомогою ССТТ є полярним (білки здатні переміщуватися від патогенів до хазяїнів) і здебільшого контактзалежним [322]. ССТТ транслокуються різні незв'язані протеїни, які складають видоспецифічний фенотип патогена.

Для ураження рослин ССТТ використовують бактерії родів *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* [245, 322, 462, 550]. Секреція протеїнів III типу необхідна для прояву патогенності грамнегативних бактерій і визначення їхньої спеціалізації [230, 282]. Цікаво, що гени, які кодують ССТТ, були також ідентифіковані у *Rhizobium* ssp. [277], де вони залучені до сортоспецифічної модуляції бобових рослин, та у *Bradyrhizobium japonicum* [353].

За допомогою ССТТ у фітопатогенних бактерій секретується декілька класів білків: харпіни (harpin), ефекторні білки та білки авірулентності [191].

Харпіни – це багаті на гліцин, але позбавлені цистеїну, термостабільні білки, які здатні індукувати реакцію надчутливості (РНЧ) за інфільтрації у листки тютюну. На відміну від білків Avr, вони не транслокуються в рослинні клітини, а секретуються ССТТ на поверхню бактеріальної клітини. Генетичні дані показують, що харпіни, ймовірно, відіграють лише вторинну роль в індукції РНЧ бактеріями; але чи сприяють вони проведенню ефекторних та Avr-білків крізь рослинну клітинну стінку, залишається невідомим [191, 281, 369].

На відміну від харпінів, ефекторні білки за допомогою ССТТ доставляються безпосередньо у клітини рослин. За сучасною термінологією

ефекторні білки, що транслокуються у клітини рослин за допомогою ССТТ, прийнято позначати Нор (Hrp-dependent outer protein) [245, 368]. При цьому наступні три літери позначають назву бактерій. Наприклад, ефекторні білки, що транслокуються ССТТ, у *P. syringae* pv. *tomato* позначають як НорPto [368]. Варто зауважити, що фітопатогенні бактерії мають значну кількість ефекторних білків, однак функція більшості з них нез'ясована [449]. Проте, у деяких Нор протеїнів виявлено здатність пригнічувати захисні реакції рослин [303].

Було показано, що ефекторний білок НорPtoN транслокується у клітини томатів через ССТТ. Цей протеїн має здатність пригнічувати процеси, пов'язані із загибеллю рослинних клітин унаслідок взаємодії *P. syringae* pv. *tomato* з чутливими і стійкими рослинами [368]. Підтверджено також транслокацію безпосередньо в рослинні клітини НорPtoK, НорPtoC, Avr-PphE(Pto) протеїнів [471].

Білки авірулентності фітопатогенних бактерій, які визначають специфічність взаємодії бактерій і рослин відповідно до теорії „ген-на-ген”, також транслокуються ССТТ. Авірулентний фактор *P. syringae* pv. *tomato* Avr-Pto індукуює РНЧ у рослинах томатів у результаті прямого зв'язування з цитоплазматичною Pto-кіназою. AvrPto є невеликою (164 амінокислотних залишки) переважно гідрофільною молекулою. Хоча секрецію цього протеїну не було продемонстровано *in vitro*, AvrPto функціонально залежить від непошкодженого апарата ССТТ [322, 465].

Таким чином, ССТТ дозволяє грамнегативним бактеріям виділяти та вводити до цитоплазми еукаріотичних клітин протеїни патогенності (Avr та Нор білки). Різні грамнегативні бактерії використовують ССТТ як консервативний і разом з тим високо адаптований механізм вірулентності. Незважаючи на те, що механізм секреції належить до консервативних, протеїни, які секретуються за його допомогою, дуже різноманітні. У геномі *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, який включає кільцеву хромосому та дві плазмиди, було ідентифіковано 298 відомих та передбачуваних генів вірулентності, включаючи декілька кластерів

генів, що кодують 31 відомих та 19 прогнозованих ефекторних протеїнів - субстратів ССТТ [223].

Отже, водночас із гідролітичними ферментами, токсинами, гормонами та полісахаридами фітопатогенні бактерії продукують особливі білки патогенності, які необхідні для ураження рослини. Такі білки переносяться до рослинної клітини за допомогою ССТТ.

Токсини Pseudomonas syringae. Окрім продуктів *hrp*-генів одним з визнаних факторів вірулентності *P. syringae* є утворювані ними токсини [210]. Значна кількість патоварів цього виду бактерій продукують різноманітні за своєю хімічною природою токсини (табл. 1.2). У більшості випадків токсини мають унікальну структуру і продукуються лише одним або групою споріднених патоварів.

Таблиця 1.2 – Токсини бактерій виду *P. syringae*

Назва токсину	Патовари <i>P. syringae</i> , що продукують токсин	Хімічна природа токсину
Табтоксин	<i>pv. coronafaciens</i> <i>pv. tabaci</i> <i>pv. garcae</i>	β-Лактам
Коронатин	<i>pv. maculicola</i> <i>pv. tomato</i> <i>pv. glycinea</i> <i>pv. morsprunorum</i> <i>pv. atropurpurea</i>	Полікетид
Фазеолотоксин	<i>pv. phaseolicola</i> <i>pv. actinidiae</i>	Сульфодіамінофос фініл пептид
Тагетітоксин	<i>pv. tagetis</i>	Гемотіокеталь
Сирінгоміцин	<i>pv. syringae</i> <i>pv. aptata</i> <i>pv. atrofaciens</i>	Ліподепсинонапеп тид
Сирінготоксин	<i>pv. syringae</i>	Ліподепсипептид
Персікоміцин	<i>pv. persicae</i>	Жирна кислота

Більшість токсинів, що утворюються *P. syringae*, не є специфічними щодо рослини-хазяїна і спричиняють симптоми ураження у багатьох рослин, навіть

тих, які не інфікуються бактеріями, що утворюють даний токсин. Токсини *P. syringae* можуть спричинювати хлорози (коронатин, фазеолотоксин та табтоксин) або некроз (сирінгоміцин і сирінготоксин) [210].

Всі вірулентні штами *P. syringae* pv. *atropaciens* продукують *in vitro* подібні до сирінгоміцину речовини, які інгібують ріст *Geotrichum candidum* та є фітотоксичними для тютюну і пшениці [520]. За допомогою хроматографії ці токсичні речовини було ідентифіковано як сирінгоміцин Е, сирінгоміцин G, сирінгопептин 25А та сирінгопептин 25В. Утворення даних токсинів є характерним для *P. syringae* pv. *syringae* [520].

Токсини не є критично важливими для патогенності *P. syringae*, але вони значно посилюють патологічний процес [210].

Дослідження токсинів *P. syringae* важливе не лише з огляду вивчення механізмів патогенності бактерій, а й з метою ідентифікації та визначення спорідненості патоварів цього виду [225].

1.4.2 Ліпополісахариди *Pseudomonas syringae* і їхня біологічна активність

Відомо, що важливим фактором патогенності фітопатогенних грамнегативних бактерій є ліпополісахариди (ЛПС) [44, 48, 260, 413, 415]. ЛПС привертають велику увагу дослідників завдяки наявності в них широкого спектра біологічної активності, в тому числі їхньої здатності впливати на імунну систему макроорганізмів [45, 92, 260]. ЛПС фітопатогенних бактерій беруть участь в процесах впізнавання при інфікуванні рослин [297, 307]. Окрім впливу на макроорганізм ЛПС, як компонент зовнішньої мембрани клітин, визначає можливість існування за несприятливих умов зовнішнього середовища та захищає бактеріальні клітини від антимікробних компонентів рослини, сприяючи розвитку патологічного процесу [260].

Будова та склад ліпополісахаридів Pseudomonas syringae. ЛПС це складні молекули, які ідентифіковано лише у грамнегативних бактерій. У цих бактерій ЛПС разом із фосфоліпідами, білками, ліпопротеїнами є складовими частинами

зовнішньої мембрани клітинної стінки [49, 161, 214]. Зовнішня мембрана має асиметричну будову: фосфоліпіди локалізовано на внутрішній поверхні зовнішньої мембрани, а ЛПС лише на зовнішній [49, 555]. Таке розташування ЛПС визначає його важливе значення в процесах впізнавання та взаємодії з макроорганізмами і зовнішнім середовищем. ЛПС є термостабільними антигенами бактеріальних клітин.

За хімічною будовою ЛПС є амфіфільними макромолекулами, що мають три основні частини: ліпід А, коровий олігосахарид (кор-ОС), О-специфічний полісахарид (О-ПС) [49]. За такою схемою побудовано ЛПС усіх досліджених бактерій, в тому числі ЛПС *P. syringae*. Необхідно зазначити, що у деяких видів трапляється ЛПС, у якого відсутній О-ПС. Такий ЛПС отримав назву ЛПС R-хемотипу [46]. ЛПС характеризуються наявністю гідрофільних і гідрофобних груп. Гідрофобним кінцем ЛПС закріплюються у зовнішній мембрані бактерій, гідрофільна частина розміщується над клітинною стінкою [46, 49].

О-ПС (гідрофільна частина ЛПС) є ланцюгом, який містить від одного до восьми моносахаридних залишків. Компоненти О-ПС включають нейтральні моносахариди в піранозидній і фуранозидній формах (гексози, пентози, дезокси- і О-метильовані похідні) і заряджені моносахариди (аміногексози, амінопентози, гексуранові і гексозаміноуронові кислоти), які можуть мати низку замісників (аміноацильні, фосфорильні, гліцерильні, лактильні, ацильні групи) [45, 48]. Кількісний та якісний склад моносахаридів у О-ПС є надзвичайно різноманітним не лише на видовому, а й на рівні штаму.

Хімічний склад та будова повторюваних ланок О-ПС визначають серологічні властивості ЛПС і бактеріальних клітин, що їх містять. Ця частина молекули ЛПС не є обов'язковою для підтримання життєздатності бактерій і не виявляє токсичної дії на макроорганізми [86, 87, 89].

О-ПС ЛПС *P. syringae* є найбільш вивченими серед фітопатогенних бактерій. Одна з причин цього полягає у наявності серокласифікаційної схеми цих бактерій [48]. Встановлено, що у всіх досліджених на даний час штамів *P. syringae*, незважаючи на належність до патовару, О-ПС має за основу

рамнановий ланцюг із залишків D-рамнози або L-рамнози чи одночасно D- і L-рамнози (рис. 1.1) [48].

Всього у штамів *P. syringae* відомо вісім типів рамнану. У деяких штамів О-ПС представлено лінійним ланцюгом. У інших штамів в О-ПС є бокові замісники, приєднані в різних положеннях основного рамнанового ланцюга [48].

- (1) $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow$
- (2) $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow$
- (3) $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow$
- (4) $\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-L-Rha-(1}\rightarrow$
- (5) $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow$
- (6) $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow$
- (7) $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow$
- (8) $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow$

Рис. 1.1 Типи рамнану, які ідентифіковані як лінійна основа О-ланцюга ЛПС штамів *P. syringae* [48]

Будова О-ПС корелює з серологічними властивостями штамів *P. syringae* і не має кореляції з приналежністю до патовару. Наприклад, різні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* мають різну будову О-ПС (табл. 1.3) [87].

Гетерогенність розгалужених полісахаридів з D-рамнановим основним ланцюгом пов'язана з приєднанням бокових залишків D-Fuc та GlcNAc [48, 433]. У результаті в О-ПС розгалужені повторювані ланцюжки присутні поряд з лінійними.

Таблиця 1.3 – Будова О-ПС ланцюга у штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Штам	Повторювальний ланцюг О-ПС
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 8281 [554]	$\rightarrow 2)$ - α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow \uparrow 3 1 α -D-Fuc3NAc $\rightarrow 2)$ - α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow \uparrow 3 1 α -D-Fuc3NAc $\rightarrow 2)$ - α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow \uparrow 3 1 α -D-Fuc3NAc
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> IMV 7836 [433]	$\rightarrow 2)$ - α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rha-(1 \rightarrow
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> K-1025 [103]	$\rightarrow 2)$ - α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rha-(1 \rightarrow \uparrow 3 1 α -D-Rha
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> IMV 2399 [104]	$\rightarrow 2)$ - α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rha-(1 \rightarrow \uparrow 3 1 α -D-Fuc
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> IMV 2846 [433]	$\rightarrow 2)$ - α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rha-(1 \rightarrow \uparrow 4 1 ~10-100% β -D-GlcNAc
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> IMV 948 [891]	$\rightarrow 2)$ - α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow \uparrow 2 1 β -D-GlcNAc $\rightarrow 2)$ - α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow

Результати хімічних та серологічних досліджень підтверджують кореляцію між імуноспецифічністю штамів *P. syringae* та будовою їхніх О-ПС. В той же час для більшості патоварів виражена кореляція між будовою О-ПС та специфічністю стосовно рослини-хазяїна (патовару) відсутня. Штами одного патовару можуть мати різні не лише за структурою, але й складом О-ПС (табл. 1.3), у тому числі О-ПС з різною конфігурацією рамнози в основному ланцюзі. І навпаки, штами з однаковими О-ПС можуть належати до різних патоварів [48]. На думку дослідників [48, 260] відсутність такої кореляції може бути пояснена багатофакторністю механізмів впізнавання та вірулентності в системі рослина-фітопатогенні бактерії.

Необхідно зазначити, що для бактерій *P. syringae* встановлена кореляція між будовою О-ПС та розділенням їх на геномогрупи за допомогою ДНК-ДНК гідридизації [48, 284].

Коровий олігосахарид є центральною частиною макромолекули ЛПС, яка зв'язує між собою ліпід А та О-ПС. У коровому олігосахариді (кор-ОС) розрізняють зовнішній кор, до складу якого входять гексози і аміносахариди, та внутрішній кор, що включає гептози та 2-кето-3-дезоксиктонову кислоту (КДО), яка здійснює зв'язок ліпиду А з полісахаридом [48, 89]. Відомо, що КДО є обов'язковим компонентом молекули ЛПС, який є життєво необхідним для грамнегативних бактерій. Ліпід А – КДО це мінімальна структура, яка може забезпечити потреби бактерій, необхідні для організації і функціонування зовнішньої мембрани [47, 49]. У бактерій *P. syringae* характерними складовими кору є L-рамноза, D-глюкоза, N-ацетил-D-глюкозамін, N-ацетил-D-галактозамін, аланін і фосфор [88, 553].

Ліпід А є частиною ЛПС, що відповідає за його токсичний вплив на макроорганізми, пірогенність, летальну токсичність, реакцію Шварцмана, ад'ювантність, стимуляцію продукції цитокінів моноцитами чи макрофагами. Ліпід А – це найконсервативніша ділянка ЛПС, вона побудована за єдиною схемою у всіх бактерій роду *Pseudomonas*: дисахарид D-глюкозамін, жирні кислоти, етаноламін і залишки фосфорної кислоти (рис. 1.2) [49, 87].

Незважаючи на загальний структурний консерватизм, ліпід А характеризується також значною структурною гетерогенністю, яка може варіювати в залежності від різних факторів, включаючи бактеріальну адаптацію до умов оточуючого середовища, яке змінюється, неповний біосинтез та руйнуючі продукти і/або хімічну модифікацію як результат методу ізолювання ліпиду А, який був використаний. Тому більш прийнятним вважається розглядати ліпід А як родину структурно споріднених молекулярних видів з різним ацилюванням та фосфорилуванням, аніж як індивідуальні гомогенні молекули. Вивчення структурно-функціональних взаємовідносин ліпиду А свідчить, що активності різняться в залежності від: 1) кількості фосфорильних і ацильних залишків; 2) місця їх заміщення; 3) довжини ланцюга ацильних залишків; 4) конформації ліпиду А. Сучасні дослідження свідчать, що ліпід А та інтегральні білки зовнішньої мембрани, відповідальні за термінальну стадію транспорту ЛПС, є важливими у вирішенні проблеми стійкості бактерій до лікарських препаратів [49, 88, 89].

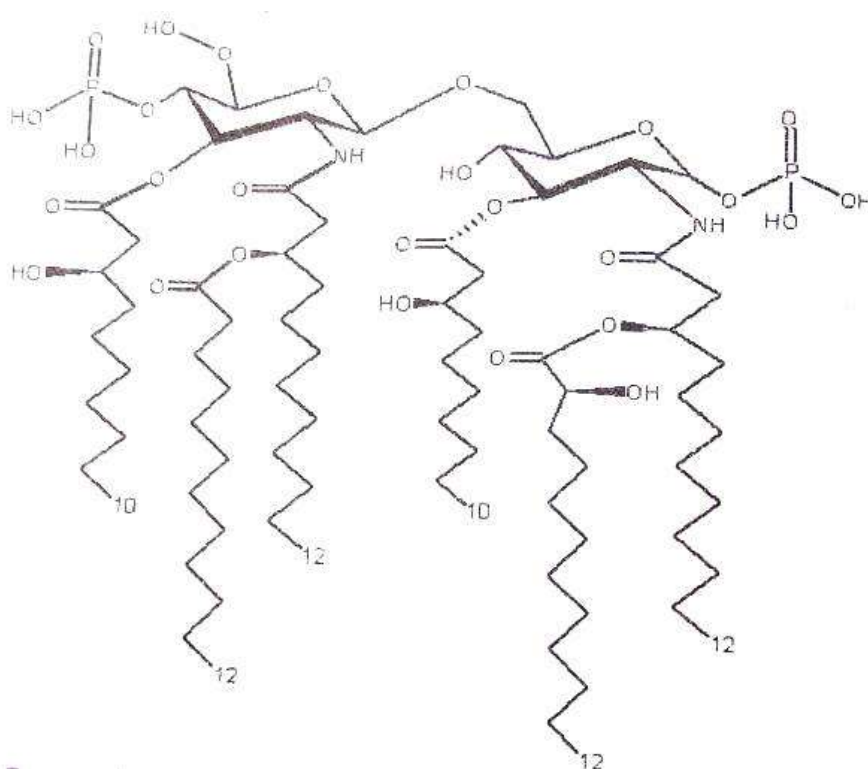


Рис. 1.2 Будова ліпиду А *P. syringae* [48, 49]

Вуглеводна частина ліпиду А *P. syringae* представлена β -(1 – 6) дисахаридом із залишків D-глюкозаміну. Обидва залишки глюкозаміну заміщені фосфатними групами. Вуглецевий скелет ліпиду А має гідроксильні групи, які в положенні С6' слугують місцем приєднання кору, в положенні С4 завжди залишаються вільними, в інших положеннях слугують місцем приєднання через етерні й амідні зв'язки довголанцюгових жирних кислот. Жирні кислоти, які безпосередньо приєднані до вуглеводного скелету, називають первинними. Первинними жирними кислотами у *P. syringae* є 3-гідроксильовані – N-зв'язана кислота 12:0 3-ОН і O-зв'язана 10:0 3-ОН, а вторинними – 2-гідроксильована кислота 12:0 2-ОН й негідроксильована 12:0 кислота [44, 88]. Будова ліпиду А у *P. syringae* відповідає будові цього компоненту ЛПС у всіх представників роду *Pseudomonas*, тобто будова ліпиду А є родоспецифічною ознакою [49]. Єдиною відмінністю ліпідів А штамів *P. syringae* від ліпідів А інших видів роду *Pseudomonas* є більш низький ступінь їх фосфорилування [88].

1.4.3 Активність ліпополісахаридів фітопатогенних бактерій у взаємодії з рослинами

Вивчення механізмів взаємодії в системі фітопатогенні бактерії – рослини є одним із найбільш активно досліджуваних напрямів у сучасній фітопатології [460]. Відомо, що визначальним етапом взаємодії є процеси розпізнавання, які відбуваються на початку такої взаємодії і визначають подальший перебіг подій: розвиток патологічного процесу чи реакції стійкості рослини. Механізми розпізнавання патогена поділяють на сприйняття консервативних еліситорів на периферії клітин і розпізнавання варіабельних еліситорів у цитоплазмі хазяїна [289].

Відомо, що рослини і мікроорганізми використовують глікани як компоненти клітинного розпізнавання. Показано, що під час взаємодії рослини та фітопатогенних бактерій поверхневі глікани, глікани клітинних стінок та глікопротеїни стимулюють сигнальні системи рослин [235]. Важливим гліканом

грамнегативних фітопатогенних бактерій, що бере участь в процесах розпізнавання, є ЛПС [235]. ЛПС у залежності від типу взаємодії між бактерією та рослиною здатні індукувати у рослинних клітинах низку біохімічних змін: утворення активних форм кисню, синтез NO, надходження іонів кальцію в клітини, зміни в клітинній стінці з утворенням калози і фенольних сполук, індукцію або пригнічення реакції надчутливості [173, 361, 414, 556].

Олігосахариди ЛПС діють як сигнальний фрагмент для індукції імунної відповіді рослини, а ліпід А розпізнається, навіть в пікомолярних концентраціях, як PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns – Патоген асоційовані молекулярні структури) різними зовнішньо- та внутрішньоклітинними ЛПС сенсорами [537]. PAMP представляють широкий спектр молекул, що включає вуглеводи, ліпіди, білки, пептиди, ліпополісахариди, гліколіпіди та глікопротеїни [219, 504].

Рецептором ЛПС в рослині є RLK LORE (Lipooligosaccharide-specific Reduced Elicitation), який належить до специфічного для рослин класу лектинів S-domain-1 kinases (SD-RLK). RLK LORE може сприймати ЛПС *Pseudomonas* як PAMP в *Arabidopsis* та інших хрестоцвітних, ініціюючи типові PTI (Pattern-Triggered Immunity) відповіді [455].

ЛПС-опосередковані захисні реакції добре охарактеризовані для ссавців, де такі реакції пов'язані з TLR4/MD-2 (toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2) та наступними активацією фагоцитоза, синтезом протизапальних цитокінів, інтерферонів та протимікробних пептидів [45, 48, 49, 92, 492, 543]. Запальний процес також може бути активовано за безпосереднього розпізнавання бактеріального ЛПС глікопротеїном CD14 ссавців. Однак, молекулярні механізми зв'язування та розпізнавання ЛПС в рослинних клітинах досі залишаються мало вивченими, тому вивчення впливу ЛПС фітопатогенних бактерій на рослину не втрачають своєї актуальності.

Встановлено, що оброблення томатів і огірків ЛПС *P. syringae* збільшує їхню стійкість до бактеріальних захворювань [554]. Реакція надчутливості у рослин, листки яких оброблено ЛПС *P. syringae* pv. *glycinea* R9, уповільнюється

на 2 дні. Як компонент зовнішньої мембрани клітин, ЛПС можуть захищати клітини від антимікробних компонентів рослини, сприяючи розвитку патологічного процесу [260].

Показано, що попередня обробка рослин арабідопсису ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* чинила модифікувальний вплив на чутливість рослин до бактеріального зараження, що залежав від походження ЛПС (із сапрофітного чи фітопатогенного штаму), хімічного стану (нативний чи оброблений фенолом) і генотипу рослини [173].

У патогенних для ссавців бактерій ЛПС також відіграють важливу роль у процесі інфікування та розвитку патологічних змін. ЛПС взаємодіють з клітинами макроорганізму, індукуючи синтез різних активних медіатів [92]. ЛПС фітопатогенних бактерій також активно діють на імунну систему ссавців. Показано, що ЛПС *Ralstonia solanacearum* виявляє інтерферогенну активність, аналогічну активності класичного інтерферогену, яким є ЛПС *E.coli* O55:B5. За інтерферогенну активність ЛПС відповідає ліпід А і королігосахарид [47].

Очевидно, що бактерії мають численні фактори патогенності з перехресною дією. Захисні механізми рослин також функціонують комплексно, і стійкість рослини до патогена рідко залежить від однієї ознаки. Тому дослідження взаємовідносин між патогеном та хазяїном не втрачають своєї актуальності.

1.4.4 Індукція фітопатогенними бактеріями захисних реакцій у рослин

Дані багатьох дослідників свідчать про опосередкованість впливу патогенних бактерій на геном хазяїна імунною системою останнього. Зокрема, основна роль в цьому процесі відводиться утворенню вільних радикалів в середині клітини хазяїна, яке індуковане патогеном чи його окремими структурами. Відомо, що утворення вільних радикалів, зокрема активних форм кисню рослинними клітинами у відповідь на абіотичні чи біотичні фактори є однією із перших реакцій рослини на стрес [108].

Активні форми кисню (синглетний кисень, супероксидний аніон-радикал, пероксид водню, гідроксил-радикал) утворюються в результаті аеробних метаболічних процесів і можуть бути як побічними продуктами такого метаболізму, так і важливими регуляторами росту, розвитку і захисних механізмів рослин [74, 237]. В останній час отримано чимало експериментальних даних щодо значення сигнальних молекул і іонів у формуванні адаптивних реакцій рослини на дію стресорів. До них належать іони кальцію, монооксиду азоту, активні форми кисню. АФК на сьогодні розглядають як «подвійні агенти». Вони безпосередньо асоційовані з інтенсивним окислювальним стресом, що супроводжується пошкодженням або загибеллю клітин і організму, або діють як сигнальні молекули, які індукують фізіолого-біохімічні реакції, що сприяє підвищенню стійкості рослин [108, 516]. АФК як сигнальні посередники беруть участь в процесах, що забезпечують формування перехресної стійкості рослин до стресових чинників різної природи. Сигнали АФК тісно інтегровані з сигналами так званих «стресових» фітогормонів, зокрема, етилену, абсцизової, саліцилової, жасмонової кислот, брассиностероїдів. Ці рослинні гормони прямо чи опосередковано можуть активувати НАДН-оксигеназу і сприяти посиленню генерації АФК [207].

Інтенсивне утворення активних форм кисню (АФК), що отримало назву «окиснювальний вибух», є однією з ранніх реакцій рослини на інфікування. Саме «окиснювальний вибух» є основою реакції надчутливості рослин, за якої відбувається вихід фенолів з вакуолей та їх окислення ферментами. Цей процес супроводжується утворенням АФК у високих концентраціях. І саме ці АФК є причиною загибелі клітин рослини і фітопатогена, який проникнув у рослину. Показано, що АФК за проникнення патогена в рослину більш активно утворюються у стійких рослинах, ніж у чутливих [164]. АФК постійно утворюються в клітинах за нормального перебігу метаболічних процесів (особливо в тих компартментах клітини, де інтенсивно відбуваються окисно-відновні процеси). Однак, за нормального перебігу метаболічних реакцій спостерігається збалансованість між утворенням і руйнуванням АФК. За дії

стресових факторів цей баланс порушується і кількість АФК в клітині різко збільшується [74]. На рисунку 1.3 наведено шляхи перетворення АФК в клітинах [74].

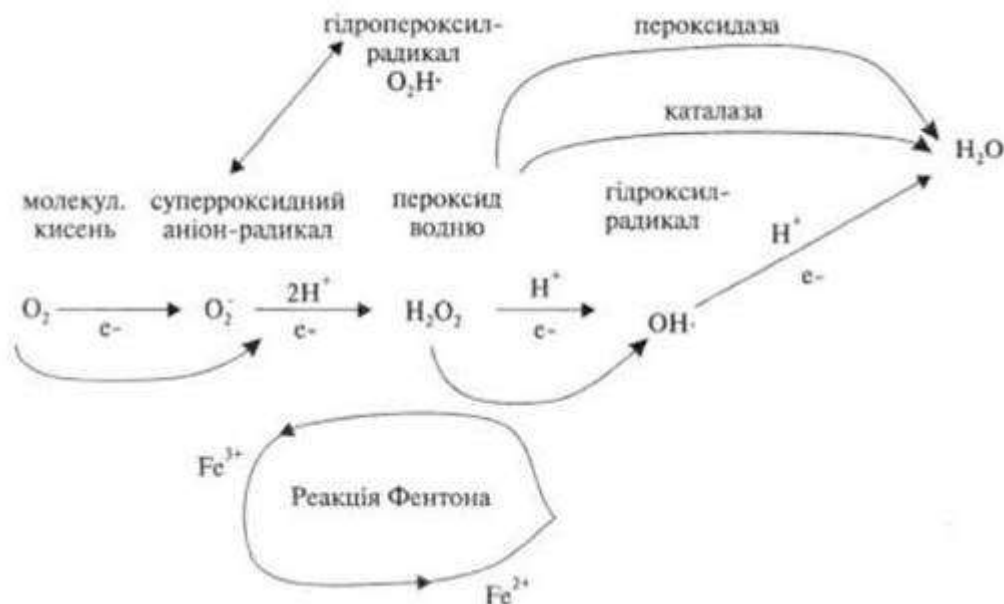


Рис. 1.3 Активні форми кисню та їх перетворення [74]

Супероксид-аніон радикал ($O_2^{\cdot-}$) не проникає через біологічні мембрани, але дуже швидко перетворюється на пероксид водню (H_2O_2). Реакція перетворення може бути спонтанною або каталізованою супероксиддисмутазою, яка міститься в цитозолі, хлоропластах і мітохондріях. $O_2^{\cdot-}$ може відновлювати хінони, Fe^{+3} , Cu^{+2} та змінювати у такий спосіб активність металовмісних ферментів. Паралельно з супероксид аніон-радикалом в клітинах існує гідропероксид-радикал (O_2H^{\cdot}), який може проникати крізь біологічні мембрани і прямо взаємодіяти з жирними кислотами у клітинах.

Пероксид водню – найбільш стабільна молекула АФК. Він може проникати через мембрани та досягати компартментів клітин, які віддалені від місця утворення пероксиду. У клітинах рослин пероксид водню може розкладатися на молекулярний кисень і воду за дії каталази, бути використаний пероксидазами для синтезу лігніну, знешкоджуватися аскорбатпероксидазою. Проте, за деяких умов у присутності значної кількості відновників H_2O_2

утворюється пероксидазами [74]. За прямої взаємодії H_2O_2 і O_2^- утворюється гідроксил-радикал, який є найбільш реакційно здатним серед АФК. Завдяки здатності ініціювати ланцюгові радикальні реакції гідроксил-радикал вважають основною формою активного кисню, яка відповідає за незворотні модифікації макромолекул клітини і пошкодження органел [74]. Якщо H_2O_2 досягає у значних концентраціях ядра клітини, він може реагувати з іонами металів і утворювати $\text{OH}\cdot$. Останній сайт специфічно фрагментує молекулу ДНК [470]. Таким чином, утворення АФК може призводити до значних пошкоджень як рослинних клітин, так і клітин патогена.

У захисті рослини від фітопатогенних бактерій значне місце посідає реакція надчутливості (РНЧ). РНЧ – це процес запрограмованої загибелі клітин рослини, внаслідок чого утворюються сполуки з антимікробною активністю та речовини, що обмежують поширення збудника в рослині [199]. РНЧ виникає у випадку несумісності між фітопатогеном і рослиною. Відомо, що фітопатогенні бактерії виду *P. syringae* здатні спричинювати РНЧ у листках тютюну, який стійкий до дії цих патогенів. РНЧ у листках тютюну може бути індукована також введенням флагеліну *Pseudomonas avenae*, *P. syringae* pv. *glycinea* та *P. syringae* pv. *tomato* [215]. РНЧ запускається після того, як ефекторні молекули мікроорганізмів розпізнаються генами стійкості рослини [253, 315, 422, 513].

Отже, після проникнення фітопатогена у середину рослини хазяїна мають місце такі події: швидке утворення АФК; руйнування мембран та втрата клітинної компартменталізації; активація протеїназ; інгібування каталази, продукування антимікробних білків захисту та антимікробних вторинних метаболітів (фітоалексинів) [253, 315, 422, 513]. Синтез АФК, зокрема пероксиду водню, супероксид-радикалу і гідроксильного радикалу, призводить до оксидативного стресу та утворення сигналів загибелі клітин. Баланс між концентраціями різних видів внутрішньоклітинних АФК може бути ключовою детермінантою РНЧ [315].

1.5 Геномодулювальна активність мікроорганізмів

Стабільність генетичного матеріалу є запорукою стабільного існування видів. Мінливість геному є джерелом появи нових ознак, які можуть забезпечити конкурентну перевагу організму, або стати причиною хвороб та загибелі організму [1, 81, 375]. В процесі розвитку популяцій в них з'являються клітини, що під впливом внутрішніх чи зовнішніх факторів змінюють свої властивості. Якщо нові ознаки забезпечують селективну перевагу клітинам, то вони закріплюються відбором і слугують основою еволюційного процесу. Оскільки мутації є джерелом генетичного різноманіття популяцій як необхідної умови їх розвитку і адаптації, еволюційно закріпився відносно постійний темп спонтанного мутування, який притаманний даному виду чи типу клітин [119].

В сучасному світі кількість мутагенних факторів постійно зростає. Це призводить до занадто швидкого накопичення мутацій, більшість із яких є шкідливими. Мутагенна дія абіотичних і біотичних факторів на рослинний геном у випадку сільськогосподарських культур призводить до зниження їх урожайності. З іншого боку мутагенна дія інфекційних агентів може бути використана для створення генетичного різноманіття і відбору стійких до збудника форм рослин у разі удосконалення розуміння процесів індукції мутацій у рослині фітопатогенами і процесів репарації в рослинних клітинах [382].

Всі відомі мутагенні фактори прийнято поділяти на фізичні, хімічні та біологічні.

Хімічні мутагени – це сполуки, які здатні змінювати структуру генів, безпосередньо взаємодіючи з ДНК чи реагуючи з ферментами, які контролюють метаболізм нуклеїнових кислот. До *фізичних мутагенів* належать такі фактори, як температура, гамма-промені, ультрафіолетові промені та ін. [129].

Біологічні фактори мутагенезу складають окрему досить велику групу. Ці фактори умовно можна розділити на власне мікроорганізми та токсичні речовини мікроорганізмів, що проявляють мутагенну дію, та фактори, які

утворюються безпосередньо в клітинах при перебігу метаболічних реакцій [129].

До першої групи факторів належать перш за все віруси: цитомегаловірус, вірус краснухи, вірус герпесу [70, 464], які можуть безпосередньо взаємодіяти з геномом клітинних організмів і пошкоджувати його [477]. Досить сильним мутагенним фактором є токсини мікроміцетів [85]. Серед токсинів грибів особливе місце займає афлатоксин В [524]. Афлатоксин проявляє мутагенну активність в прокаріотичних та еукаріотичних тест-системах. Екзогенні біологічні чинники індукують пошкодження ДНК регуляторно-інформаційним шляхом, діючи на системи підтримки генетичної стабільності. Молекулярні механізми індукованих ними мутацій такі самі, як і за спонтанного мутагенезу, але реалізуються за участі чужорідного генетичного матеріалу. Серед біологічних мутагенів особливе місце займають онковіруси і мобільні генетичні елементи як найсильніші дестабілізуювальні фактори, що контролюють процес злякисної трансформації соматичних клітин ссавців [375].

Вже досить тривалий час відомо, що інфекційні агенти спричинюють зміни геномів макроорганізмів [95, 351]. Таке явище отримало назву інфекційний мутагенез [95]. Причинами інфекційного мутагенезу можуть бути як токсичний (генотоксичний) вплив мікроорганізмів, що спричинюють інфекції, так і утворення деяких метаболітів в середині уражених клітин [95]. Нестабільність геному макроорганізмів за дії інфекційних агентів розглядають як одну з причин канцерогенезу [351].

Генетичне перепрограмування або зміна програм генної експресії при диференціюванні стовбурових клітин і клітин-попередників під впливом ростових факторів і цитокінів, ймовірно, також супроводжується мутаціями й рекомбінаціями [375].

1.5.1 Сполуки з мутагенною активністю, що утворюються в клітині хазяїна за інфікування

Перші дані про мутагенність вірусів були отримані в середині минулого століття і стосувалися мутацій, які спричинювали фаги у клітинах актиноміцетів. Велика кількість досліджень в наступні роки підтвердила, що зараження макроорганізмів вірусами (віруси герпесу, кору, вітряної віспи, герпесу Зостера, краснухи, інфекційного гепатиту, атипової чуми птахів, парагрипозного вірусу, аденовірусів) призводить до появи більшої кількості хромосомних аберацій [70]. При зараженні цими вірусами в клітинах хазяїнів спостерігаються хромосомні та хроматидні розриви, делеції, транслокації, фрагментація та розсіювання хромосом, анеуплоїдія, рідше поліплоїдія.

Ще у 1970-х рр. було виявлено, що онкогенні віруси можуть спричинювати генні мутації у клітинах ссавців. Це явище широко поширене і спостерігалось для усіх груп ДНК-вмісних вірусів та деяких ретровірусів. Мутагенний ефект вірусів на рівні генів не є специфічним. Віруси індукують точкові мутації, включаючи заміни пар основ, делеції та інсерції. Вважають, що процес інтеграції створює можливість появи мутацій на ранніх етапах інфікування. Мутації можуть бути індуковані і вже інтегрованим вірусом, але у значно меншому ступені. Вірус-індукований мутагенез може бути також пов'язаний з активацією клітин репараційної системи [119, 477].

Відомий мутагенний вплив не лише онковірусів й вірусів ссавців. Вірус смугастої мозаїки ячменю має мутагенний вплив на кукурудзу [485].

При вивченні токсичного впливу *Fusarium oxysporum* на рослини вовчка (*Orobanche* spp.), яка є паразитом кореневої системи багатьох рослин, методом RAPD-ПЛР було встановлено наявність генотоксичних ефектів [200]. Показано також суттєве збільшення кількості Mn-супероксиддисмутази, Zn-супероксиддисмутази, глутамінсинтетази. Отримані дані свідчать, що *F. oxysporum* (1) індукує окислювальний стрес у рослині вовчка; (2) спричинює значні пошкодження ДНК рослини; (3) порушує білковий обмін та (4) спричинює апоптоз [200].

Мутагенну активність виявлено у токсинів грибів *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Penicillium roqueforti* та інших видів [1, 85]. Встановлено здатність спор *Stachybotrys chartarum* та *Aspergillus versicolor*, як і їхніх токсинів трихотецену Т-2 і сатратоксину G зумовлювати окислювальні пошкодження ДНК [454].

Мутагенну дію відмічено також у бактеріальних токсинів. Так, токсифлавін, що утворюється бактеріями *Pseudomonas farinofementans*, характеризується мутагенною дією як в рослинній, так і в тваринній тест-системах [551]. Окрім безпосереднього ризику збільшення мутацій, спричиненого бактеріями та їхніми метаболітами, відмічена здатність бактерій активувати промутагени [181].

В науковій літературі жваво дискутується проблема взаємозв'язку між нестабільністю геномів макроорганізмів, яка спричинена інфекційними агентами, і виникненням онкологічних захворювань [352, 391, 440]. Інфекційні агенти, такі як віруси гепатиту В і С, вірус Епштейна-Барра, вірус папіломи людини, вірус імунодефіциту людини 1 типу, *Helicobacter pylori* та *Streptococcus bovis* сприяють патогенезу різних видів раку [391].

Вірусна інфекція може спричинювати геномну нестабільність та канцерогенез за допомогою багатьох механізмів. Серед них найважливішими є хронічне запалення, пряма трансформація клітин-хазяїна та імуносупресія. Вірус здатний інтегрувати свої гени в геном хазяїна, фізично пошкоджуючи гени-супресори пухлинних процесів або інтегруючись поблизу до регуляторних елементів генів проонкогенів чи генів супресорів, що веде до їх активації або інактивації [559]. Це явище прямої вірусної трансформації клітини-хазяїна призводить до нездатності клітини-хазяїна ефективно регулювати перебіг клітинного циклу, сприяючи пухлиногенезу.

Здатність бактерій індукувати канцерогенез залишається дискусивним питанням в науковій літературі. Встановлення причинно-наслідкового зв'язку між інфікуванням та розвитком пухлини досить складне. Коли бактеріальна інфекція є хронічною, як у разі інфікування *Helicobacter pylori*, такий зв'язок

прослідковується легше. У випадку гострої інфекції, особливо якщо між інфекційним процесом та канцерогенезом є значний проміжок часу, встановити зв'язок не завжди вдається. По-друге, для встановлення зв'язку між інфекцією і канцерогенезом інфекційний агент має бути знайдений на ділянці пухлини [344, 352].

Значним досягненням у розумінні значення бактеріальної інфекції в канцерогенезі стало відкриття *H. pylori* як джерела хронічної інфекції у шлунково-кишковому тракті хазяїна. Ця інфекція пов'язана із розвитком карциноми шлунку [439], лімфоми слизової оболонки [541]. Ці роботи дозволили стверджувати про канцерогенність *H. pylori*. Встановлено, що *H. pylori* є основним фактором ризику розвитку раку шлунка [502]. Їх онкогенна роль опосередкована хронічним запаленням, яке виникає в слизовій оболонці шлунка, за колонізації слизової оболонки шлунку цими бактеріями. Крім того, *H. pylori* впливає на цілісність генома за рахунок збільшення активності цитидиндезамінази. Ці різні стратегії, що виникають під час взаємодії між бактеріями-клітинами-хазяїнів, призводять до модифікацій нуклеотидів та нестабільності геному, визнаних як ранні події в процесі канцерогенезу та сприяють онкогенним властивостям *H. pylori* [502]. Проте не можна виключити наявність прямої генотоксичності *H. pylori* через дію бактеріального цитотоксину або внаслідок пошкодження ДНК. Toller et al. [501] у своєму дослідженні розглянули можливість прямої дії цього збудника на геном хазяїна. Отримані дані підтверджують, що інфікування *H. pylori* індукує дволанцюгові розриви ДНК (DSB) в первинних і трансформованих мишачих і людських епітеліальних клітинах. Утворення дволанцюгових розривів залежить від прямого контакту бактерій з клітинами ссавців. Для індукції DSB є необхідною бактеріальна адгезія (наприклад за допомогою антигензв'язуючого адгезину групи крові). Фактори вірулентності *H. pylori*: цитотоксин А, γ -глутамінтранспептидаза, «остров патогенності» є неважливими для індукції DSB. Не зважаючи на те, що більшість пошкоджень репарується, тривале

інфікування призводить до накопичення кількості хромосомних аберації і є причиною виникнення раку шлунку [501].

Причинно-наслідкові зв'язки між інфікуванням іншими бактеріями та канцерогенезом на сьогодні не можна вважати достовірно встановленими [352]. Тому будь-які дослідження, які допоможуть зрозуміти причини, механізми і наслідки мутагенної активності інфекційних агентів, зрештою можуть відкрити сфери досліджень для визначення оптимізації стратегій боротьби з онкологічними захворюваннями.

Дослідження останніх років показали, що інактивовані нагріванням патогенні та непатогенні штами *E. coli* є причиною геномної нестабільності в клітинах кишківника, печінки та селезінки мишей [350]. Виявлений ефект зберігався у разі застосування фільтрованих розчинів клітин бактерій, що вказує на індукцію епігенетичних змін не цілими клітинами, а їх окремими компонентами [350]. Пізніше було з'ясовано, що цей бактеріальний компонент – молекула ЛПС, або комбінація декількох молекул ЛПС. Саме розчини ЛПС, а не бактеріальної ДНК, РНК чи білків, спричинювали зміни кількості фосфорильованих гістонів H2AX, що є маркерами дволанцюгових розривів ДНК, та білків, що приймають участь у проліферації (PCNA), метилуванні ДНК (MeCP2, DNMT1, DNMT3A і 3B) чи репарації ДНК (APE1 і KU70), в клітинах печінки та селезінки мишей [351]. ЛПС виявилися компонентами бактеріальних клітин, які відповідають за індукцію геномних змін в хазяїні, впливають на проліферацію клітин і механізми внутрішньоклітинної передачі сигналів [374]. Вважають, що ЛПС здатні індукувати пошкодження геному використовуючи в основному два механізми [352]:

1) Повторюване оброблення клітин ЛПС спричинює запальну реакцію, наслідком якої є утворення активних форм кисню, що характеризуються пошкоджуючою дією на ДНК. Було продемонстровано, що дія навіть малих доз ЛПС приводить до значного збільшення рівня АФК [543].

2) Оброблення клітин ЛПС прискорює їх проліферацію. Проліферація клітин може бути викликана цитокінами, утворення яких є імунною відповіддю

клітини, яка індукована завдяки сигнальній функції ЛПС. Відомо, що такі цитокіни відіграють важливу роль у проліферації клітин, яка спричинена запаленням пригіперплазії.

Тобто, ЛПС індукують пошкодження ДНК через вільнорадикальний механізм або спричинюючи високий рівень проліферації. Залишається не з'ясованим питання щодо необхідності прямого фізичного контакту клітин-хазяїна з молекулами ЛПС бактерій задля індукції пошкоджень ДНК, надмірної проліферації чи генетичної нестабільності. Можливо індуковані ЛПС ефекти опосередковані сигнальними молекулами, що утворюються на рівні слизової оболонки кишківника. Адже у здорових тварин більшість бактерій, їх компонентів (ЛПС) навряд чи проникають у слизові оболонки кишківника [352].

В літературі описані бактеріальні токсини, які здатні впливати на клітинний цикл еукаріотичної клітини: токсин, який зумовлює загибель клітин – CDT, фактор інгібування клітинного циклу – Cif, цитотоксичний некротичний фактор – CNF. Токсини CDT та Cif блокують мітоз та пригнічують імунну систему. Токсин CNF має протилежну дію – стимулює проліферацію клітин та впливає на їхню диференціацію [376]. Ентеропатогенні бактерії *Escherichia coli* утворюють специфічний ефекторний білок (CDT) з родини цикломодулінів, який спричинює подвійні розриви ДНК та порушення клітинного циклу в клітинах епітелію хазяїна [423].

Токсин CDT продукується грамнегативними бактеріями, які спричинюють інфекції слизових оболонок. Зокрема, він був виявлений у *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter* spp., *Campylobacter jejuni* та *Shigella* spp. Токсин характеризується ДНКазною активністю, може проникати у клітини хазяїна, індукувати подвійні розриви ДНК та блокувати клітинний цикл у G2-фазі. Токсин CNF ініціює перехід клітини з фази G1 у фазу S та індукує реплікацію ДНК. При цьому не відбувається поділу клітини. Таким чином, у результаті дії вказаного токсину утворюються мультіядерні клітини [376].

Відомо, що ін'єкція щурам ЛПС у дозі 5 мг/кг спричинює збільшення вмісту 8-гідроксидезоксигуанозину, який є маркером оксидативного пошкодження ДНК, у клітинах печінки в 4 рази [180]. Дослідження інших вчених вказують на посилення синтезу АФК у клітинах тварин і людини за участю ЛПС, одержаних із клітин бактерій різних видів [205, 492]. Наприклад, зростання частоти мутацій у культурі клітин RAW264.7, яку спостерігали після оброблення препаратами ЛПС та γ -ІФН, автори пов'язують зі стимуляцією утворення оксиду азоту [473]. Також встановлено, що ЛПС *E. coli* у дозах 25 та 100 мкг/мл може підвищувати кількість аберантних метафаз у культурі клітин крові людини [280]. Крім того, ЛПС може виявляти генотоксичну активність щодо клітин крові та кісткового мозку щурів [473].

Встановлено, що опортуністичний патоген *Staphylococcus aureus* зумовлює пошкодження ДНК клітин ссавців опосередковане окислювальним стресом [234].

Відомі дані щодо здатності патогенних для рослин бактерій спричинювати дволанцюгові розриви ДНК (double-strand breaks (DSBs)) рослини-хазяїна [483]. Пошкодження ДНК, які реєстрували методом виявлення кількості фосфорильованих гістонів γ -H2AX та методом комет, виникали за декілька годин до утворення некрозу, індукованого *P. syringae* pv. *tomato*. Авірулентний варіант *P. syringae* pv. *tomato* за аналогічних умов не спричинював пошкоджень ДНК. Також не індукували пошкоджень ДНК сапрофітні *E. coli* і *Pseudomonas fluorescens*. Відомо, що утворення АФК є звичайним процесом у разі активації імунної системи рослини, а АФК відомі як пошкоджуючі ДНК агенти, індукований інфекційними агентами окислювальний стрес є причиною пошкоджень ДНК у клітинах тварин. Однак, авторами було виявлено, що утворення DSB у *Arabidopsis* у відповідь на інфікування *P. syringae* відбувається за відсутності окислювального вибуху, опосередкованого *AtrbohD* і *AtrbohF*. Стимулювання МАР (microbe-associated molecular pattern – рецептори рослинної клітини, які розпізнають консервативні компоненти бактеріальної клітини такі, як флагелін, ЛПС) рецептора у

Arabidopsis або застосування саліцилової та жасмонової кислоти не призводило до збільшення рівня DSB у разі відсутності патогена. Це свідчить про здатність збудника спричинювати пошкодження ДНК хазяїна, яка не опосередкована активацією захисних механізмів рослини. Кількість індукованих збудником DSB зменшувалася за допомогою саліцилової кислоти. Тобто, фітопатогенні мікроорганізми можуть спричинювати пошкодження ДНК рослин. Захисні реакції рослини, на думку авторів сприяють зменшенню, а не збільшенню пошкоджень ДНК, тим самим захищаючи цілісність геному у соматичних клітинах [483].

При вивченні впливу фітопатогенних штамів *Agrobacterium* на частоту різних соматичних мутацій у *Arabidopsis thaliana* не було виявлено мутагенного ефекту досліджених вірулентних і авірулентних штамів бактерій [475].

Необхідно зазначити, що нами було розпочато дослідження геномодулювальної активності фітопатогенних бактерій на початку 2000 років із вивчення таких характеристик у двох штамів, які спричинювали хвороби жита [51, 53]. Дані дослідження було продовжено у спільній роботі із Богдан Ю.М. [3, 4] та встановлено здатність двох штамів *P. syringae* pv. *atropaciens* 9400 і 9417 та їхніх ліпополісахаридів впливати на частоту спонтанних і індукованих мутагенами реверсій у тест-штамів в тесті Еймса і підвищувати частоту хромосомних аберацій у клітинах апікальної меристеми цибулі. Однак, недослідженими залишалися питання здатності представників інших патоварів цього збірного виду фітопатогенних бактерій проявляти геномодулювальну активність, механізмів геномодулювальної дії ліпополісахаридів як у бактеріальній, так і у рослинній тест-системах.

Сапротрофні мікроорганізми також можуть виявляти мутагенні властивості. При вивченні впливу культуральної рідини ґрунтових мікроорганізмів на фізіологічні та генетичні характеристики насіння сої, томатів, огірків, бавовнику, а також на дрозофілу та клітини дріжджів встановлено, що в культуральній рідині *Bacillus polymyxa* 57, *Pseudomonas putida* 27, *Pseudomonas fluorescens* 112 містяться вторинні метаболіти, які мають

виражену мутагенну активність стосовно геномів сої, дріжджів і дрозофіли [117].

Таким чином, накопичені значні експериментальні дані, які підтверджують мутагенний вплив патогенних мікроорганізмів на макроорганізм. Однак, механізми мутагенної активності патогенів все ще потребують дослідження.

Внутрішньоклітинні фактори біологічного мутагенезу пов'язують насамперед з утворенням в клітинах вільнорадикальних молекул. Вільні радикали – це самостійні молекули з неспареними електронами на зовнішній орбіталі. Така нестабільна електронна конфігурація обумовлює високу реакційну здатність і короткий період життя вільних радикалів. В біологічних системах разом з терміном вільні радикали часто використовують поняття «активні форми кисню» (АФК). АФК – поняття дещо ширше, ніж вільні радикали. Воно включає, окрім вільних радикалів кисню (супероксиданіон-радикалу O_2^- та гідроксил-радикалу $OH\bullet$), ще й пероксид водню, синглетний кисень (з електроном у синглетному стані - 1O_2 на відміну від нормального триплетного), озон, а також деякі «некласичні» АФК [160].

Біологічні джерела утворення АФК і фактори, які їх індукують, багаточисельні. Зокрема, супероксиданіон-радикал виникає в результаті реакцій, які каталізують НАДН-оксидази, альдегідоксидази, флавінові гідролази, циклооксигенази, ліпооксигенази, та ін., утворюються при автоокисленні біологічних сполук, адреналіна, тетрагідроптеринів, лейкофлавінів, фенолів, що мають окислювально-відновлювальний потенціал менший ніж у кисню [299]. Деякі клітини імунної системи (макрофаги, нейтрофіли, еозенофіли) знешкоджують чужорідні агенти саме за допомогою АФК [160]. Велика кількість АФК з'являється під час запальних процесів як результат діяльності клітин імунної системи. У процесах активації макрофагів беруть участь ферменти НАДН-оксидаза та мієлопероксидаза, що формують $OH\bullet$ -радикали та гіпохлорит, які причетні до знищення чужорідних агентів. Екзогенними стимуляторами утворення АФК можуть бути ультрафіолетові

промені, іонізуюча радіація, деякі хімічні речовини. За даними багатьох авторів у рослин утворення АФК і РНЧ є однією із перших реакцій на проникнення патогена [107, 253, 289, 315].

Специфічним ферментом, що захищає клітини від супероксиданіон-радикала є супероксиддисмутаза (СОД) [Halliwell, 1986]. За нормальних умов існування клітини пероксиди знешкоджуються глутатіонпероксидазами, каталазами, пероксидазами, а захист від оксидативного стресу забезпечується сукупністю природних антиоксидантів: токоферолу, феретину, каротиноїдів, аскорбінової та сечової кислот [160].

АФК є продуктами нормального клітинного метаболізму і, за фізіологічно нормального утворення в умовах функціонування антиоксидантного захисту, є безпечними для клітини [81]. Однак, за посилення утворення АФК (окислювальний стрес) під впливом інфекційних агентів, відмічають різноманітні цитотоксичні пошкодження [160].

При молекулярних дослідженнях взаємодії АФК з ДНК показано, що вільні радикали ініціюють поодинокі і парні розриви ДНК, які виникають внаслідок розщеплення дезоксирибози, здатні спричиняти порушення внутрішньонуклеотидних зв'язків, утворення апуринових і апиримідинових сайтів, зшивок ДНК-ДНК та ДНК-білок, тобто первинних пошкоджень ДНК, які лежать в основі генних і хромосомних мутацій [81, 160]. АФК в еукаріотичних клітинах індукують збільшення кількості хромосомних аберацій, зокрема хроматидних розривів. ОН-радикали реагують з дезоксирибозою з утворенням різних похідних (еритрози, 2-деокси-тетрадіальдози) (рис. 1.4) та розривів ланцюга, а з усіма типами азотистих основ – з утворенням сотен проміжних продуктів (рис. 1.5) [160, 259].

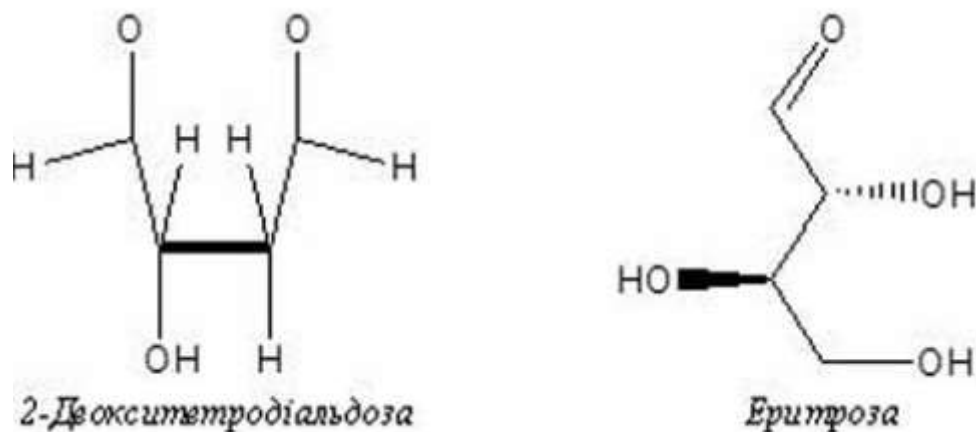


Рис. 1.4 Похідні дезоксирибози, утворені в результаті дії гідроксил-радикалу [160]

Концепція, що пояснює можливий механізм генотоксичної дії АФК, запропонована Halliwell і ін. [300] спирається на поняття окислювального стресу і передбачає два механізми реалізації генотоксичної дії АФК. Перший механізм: пошкоджуюча ДНК дія опосередкована утворенням гідроксильного радикала в результаті реакцій, які схожі з реакцією Фентона, безпосередньо в ядрі клітини. Така можливість визначається здатністю гідропероксида водню проникати крізь мембрани і наявністю в ядрі іонів металів з перемінною валентністю. Другий механізм пов'язаний зі збільшенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію за окислювального стресу і його здатністю активувати ендонуклеази. Обидва механізми не є альтернативними і можуть існувати в клітині паралельно. Вірогідно, що суттєву роль у цьому процесі мають продукти перекисного окислення ліпідів, які призводять до накопичення в клітині і організмі пероксидів і малонового діальдегіда. В багатьох роботах підтверджено мутагенну дію продуктів перекисного окислення ліпідів [216, 236].

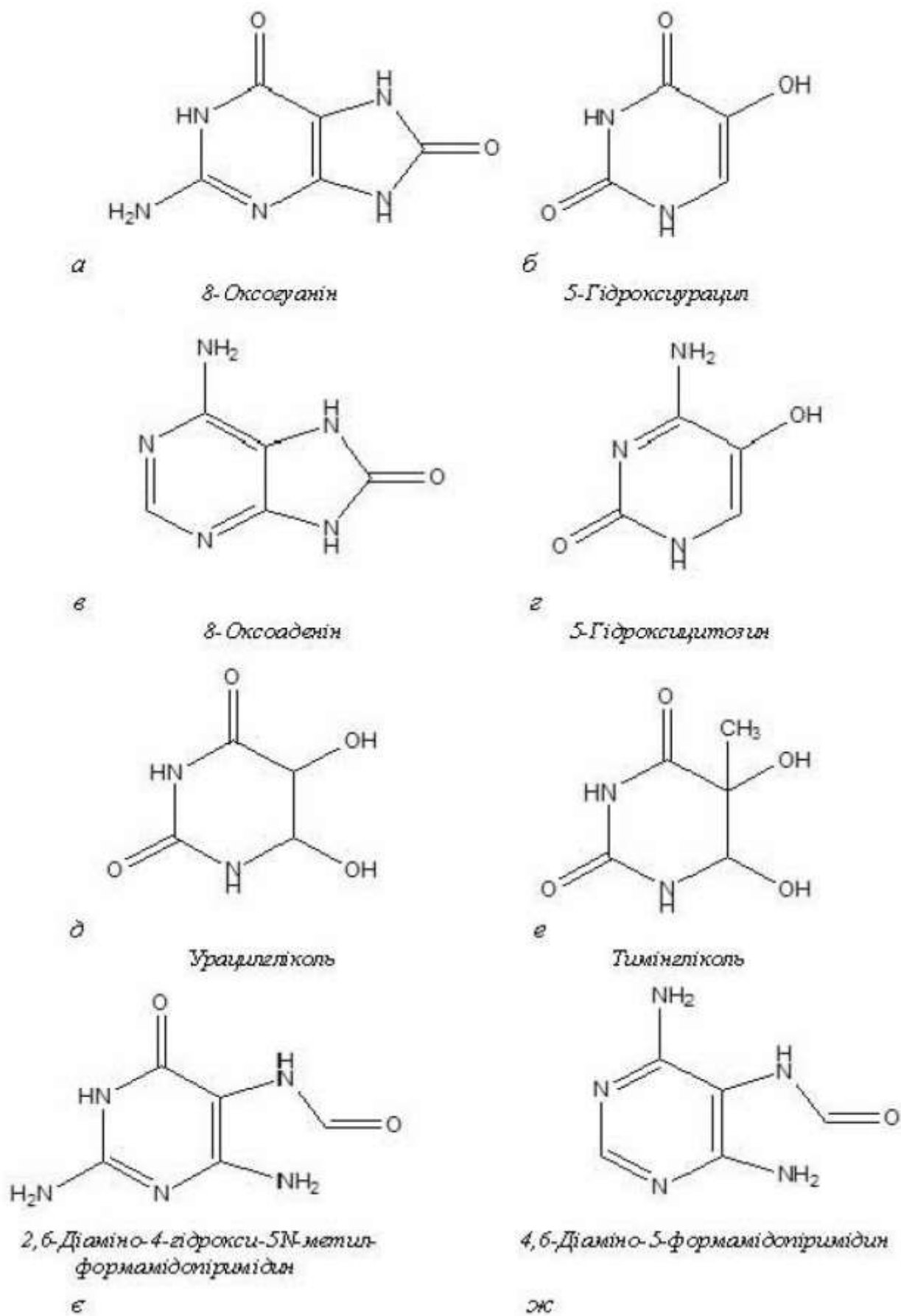


Рис. 1.5 Найпоширеніші модифікації азотистих основ, спричинені дією АФК [160]

Враховуючи мутагенність АФК і продуктів перекисного окислення ліпідів, всі речовини, які стимулюють їх утворення, можна розглядати як потенційні мутагени [81].

1.5.2 Антимутагенна активність мікроорганізмів та їхніх глікополімерів

Поруч із численними даними, які підтверджують мутагенну активність мікроорганізмів, в науковій літературі є дані, які свідчать про антимутагенні властивості бактерій та їх окремих метаболітів. Така ситуація не видається дивною, оскільки процеси мутагенезу і антимутагенезу (зокрема, репарації) завжди функціонують паралельно у біологічних системах, забезпечуючи належний рівень стабільності і мінливості геномів.

Антимутагенні властивості досліджені для великої кількості бактерій, які пов'язані із харчовими продуктами людини [528]. Встановлено, здатність молочнокислих бактерій зменшувати кількість мутацій, індукованих хімічними або фізичними мутагенами [59, 459].

Відома антимутагенна активність ферментованих молочнокислими та біфідобактеріями харчових продуктів [320, 321]. Встановлено, що молоко, яке зброжене кожним із 71 штама бактерій родів *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, характеризувалося антимутагенною активністю за сумісної дії з нітрозогуанідіном. Найбільша активність була визначена для *L. acidophilus* LA 106 [318]. 76 вивчених штамів молочнокислих бактерій в результаті ферментації молока надавали йому здатність інактивувати мутагенну дію піролізату триптофану [59]. Показана антимутагенна активність ферментованого *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* та біфідобактеріями *Bifidobacterium infantis*, *B. longum* соєвого молока проти мутагенезу, індукованого 4-нітрохінолін-N-оксидом та 3,2'-диметил-4-амінобіфенілом на *Salmonella typhimurium* TA 100 [59, 320]. Демутагенні та блокуючі ефекти були основними механізмами антимутагенності ферментованого соєвого молока проти використаних мутагенів [321].

Досить добре вивчені антимуtagenні властивості молочнокислих, пропіоновокислих, біфідобактерій і *Enterococcus faecalis* [59].

Одним із можливих механізмів антимуtagenних/антиканцерогенних властивостей, які властиві молочнокислим бактеріям *in vitro* та *in vivo*, є фізичне зв'язування мутагенів клітинами бактерій [302].

Пропіоновокислі бактерії *Propionibacterium shermanii*, *P. pentosaceum*, *P. thoenii*, *P. coccoides*, *P. acnes*, молочнокислих *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *S. faecalis*, *Bifidobacterium bifidum* і *E. coli* AB1166 та їх метаболіти значно знижують мутагенний вплив 4-нітрохінолін-1-оксиду на *S. typhimurium* TA101 [59]. Амтимуtagenна активність пропіоновокислих бактерій пов'язана з виділенням ними в середовище тіолових сполук.

В попередніх дослідженнях нами встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 в дозі 1000 мкг на чашку зменшує частоту спонтанних мутацій *S. typhimurium* TA98 на 31%, *S. typhimurium* TA100 на 16%. Досліджуваний ЛПС виявив антимуtagenні властивості і по відношенню до індукованих біхроматом калію мутаціям. Частота таких мутацій зменшувалася в залежності від дози ЛПС на 57 - 78 % для тест-штаму *S. typhimurium* TA98, та на 14 – 49% для *S. typhimurium* TA100 [53]. Механізм антимуtagenної активності ЛПС пов'язаний з перешкоджанням надходженню мутагену в клітину і може бути обумовлений властивостями полісахаридного ланцюга ЛПС [51].

Відомо, що екзополісахариди захищають клітини від згубного впливу шкідливих факторів. Для багатьох полісахаридів показана також антимуtagenна активність [310, 354, 355, 486, 505, 530].

β -(1-3)-D-глюкани, а саме карбоксиметилглюкан і сульфоетилглюкан з *Saccharomyces cerevisiae* та карбоксиметилхітинглюкан з *Aspergillus niger*, виявляють антимуtagenну дію стосовно індукованого офлоксацином та акридиновим оранжевим мутагенезу в ДНК хлоропластів *Euglena gracilis* [355].

Здатність зменшувати кількість пошкоджень ДНК хлоропластів *Euglena gracilis*, індукованих офлоксацином та акридиновим оранжевим, виявили також маннани *Candida utilis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* [354]. При

цьому антимуtagenна активність полісахаридів щодо індукованого офлоксацином мутагенезу пов'язана з їхньою антиоксидантною дією. Антимуtagenна дія стосовно акридинового оранжевого зумовлена абсорбційними властивостями глюканів та маннанів [354, 355].

З літератури відомо, що екзополісахаридам молочнокислих бактерій притаманна антимуtagenна активність. Встановлена антимуtagenна активність *Bifidobacterium longum* проти 3-аміно-1,4-диметил-5Н-піридо-[4,3-*b*]-індолу і 3-аміно-1-метил-5Н-піридо-[4,3-*b*]індолу. Активність підвищувалася із збільшенням тривалості ферментації і пов'язана із здатністю *B. longum* PS+ продукувати екзополісахариди [486].

Екзополісахарид *Pantoea agglomerans* захищає клітини від мутагенного впливу УФ опромінення [530].

Необхідно зазначити, що антимуtagenні властивості притаманні не лише бактеріальним полісахаридам. Рослинні вуглеводи, зокрема, ксилоглюкан, пектини та пектиноподібні рамногалактурунози, виявляють антимуtagenні властивості проти нітропірену. Вони інгібують мутагенез, зумовлений цією речовиною на 20 – 50% залежно від дози полісахариду. При цьому для захисту клітин від мутагенезу необхідний безпосередній контакт мутагену з полісахаридом [310].

Отже, бактерії можуть виявляти антимуtagenні властивості в різних тест-системах, які обумовлені як позаклітинними метаболітами, так і можуть бути пов'язані із структурами бактеріальної клітини. Протекторна активність часто притаманна гліканам та глікопротеїнам бактерій. При цьому механізм антимуtagenної дії полімерів найчастіше пов'язаний з перешкоджанням надходження мутагенів в клітину чи інактивацією мутагенів поза клітиною.

Таким чином, на основі аналізу даних літератури можна стверджувати, що патогенні мікроорганізми і, зокрема, бактерії за інфікування спричинюють пошкодження ДНК макроорганізмів. Для більшості патогенних для ссавців бактерій генотоксична активність є опосередкованою утворенням вільних радикалів у клітинах хазяїна у відповідь на проникнення патогена. Дані, щодо

індукції пошкоджень ДНК фітопатогенними бактеріями вкрай обмежені. Але наявні дані свідчать про існування інших механізмів пошкодження ДНК в системі фітопатоген-рослина. На думку Song J. та Bent A.F. [Song, 2014] утворення АФК при проникненні фітопатогенних бактерій в рослину є засобом обмеження патогена і захищає рослинні клітини від генотоксичного впливу бактерій. Разом з тим необхідно зазначити, що лише отримання достатньої кількості експериментальних даних з цього питання в майбутньому дозволить вирішити це питання.

Отже, *P. syringae* pv. *atrofaciens* є широко розповсюдженим патогеном пшениці, який виявляється в усіх регіонах вирощування цієї культури, та за сприятливих умов може спричинювати епіфітотії, що зумовлює необхідність постійного моніторингу збудника. Тривалий час дослідження збудника базального бактеріозу пшениці були сфокусовані виключно на його патогенних властивостях, тому здатність до епіфітного виживання та екологічні ніші *P. syringae* pv. *atrofaciens* все ще потребують здійснення більш широкого кола досліджень, особливо зважаючи на відомі на сьогодні дані, щодо вирішального значення епіфітної популяції збудника для розвитку патологічного процесу.

Хоча на сьогодні серед хвороб пшениці в більшості регіонів її вирощування переважають ті, що спричинені мікроміцетами, зміна технологій вирощування, глобальна зміна клімату, змінює спектр хвороб. Бактеріальні хвороби, які для багатьох сільськогосподарських культур були неважливими раніше, стають сьогодні новими загрозами. Таким патогеном, що несе приховану загрозу, є збудник базального бактеріозу. Зважаючи на здатність патогена тривалий час існувати на поверхні здорових рослин пшениці, лише сприятливі для розвитку патологічного процесу умови середовища є вирішальними для виникнення епіфітотій, спричинених *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Детальне дослідження *P. syringae* pv. *atrofaciens* дозволяє не лише отримати важливу інформацію фундаментального характеру, що дасть відповідь на питання сучасного систематичного статусу цього збудника, дозволить

встановити структуру популяції збудника в Україні, встановлювати та відстежувати поширення агресивних штамів, а й надасть важливу інформацію для селекціонерів щодо створення та впровадження сортів пшениці, стійких до бактеріозу.

За даними літератури *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризується наявністю багаточисельних факторів патогенності, до яких належать ефекторні білки, які є продуктами *hrp*-генів, ліпополісахариди, токсини, екзополісахариди, гормони, адгезини, флагелін, пектолітичні ферменти. Всі ці речовини забезпечують як здатність *P. syringae* pv. *atrofaciens* колонізувати рослину, так і можливість атакувати її. Одним з найбільш досліджуваних факторів вірулентності збудника базального бактеріозу є ліпополісахарид. ЛПС фітопатогенних бактерій здатні індукувати у рослинних клітинах низку біохімічних змін: утворення активних форм кисню, синтез NO, надходження іонів кальцію в клітини, зміни в клітинній стінці з утворенням калози і фенольних сполук, індукцію або пригнічення реакції надчутливості.

Перебуваючи в агроценозі пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які і інші епіфітні бактерії, зазнає впливу пестицидів, що широко використовуються в рослинництві. Проте, наслідки впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії є недослідженими. Відомо, що пестициди в агроценозах впливають на всі мікроорганізми, які там перебувають, призводячи до утворення і поширення резистентних форм мікроорганізмів, зростання агресивності патогенів, зміни мікробіому рослин, що сприяє поширенню нових патогенів. Значна кількість даних підтверджує можливість мутагенного впливу пестицидів на бактерії, та дані щодо мутагенного впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії відсутні, нами не було знайдено також даних щодо можливих адаптацій фітопатогенних бактерій до несприятливої дії пестицидів в агроценозах.

Агроекосистема пшениці є екологічною нішею, у якій тісно взаємодіють рослина, бактерії та абіотичні фактори. За дії специфічних (присутніх саме у цій ніші) абіотичних і біотичних факторів відбуваються процеси мутації та селекції, що приводить до мікроеволюційних змін як фітопатогенних бактерій, так і

рослини-хазяїна. Однак, на сьогодні все різноманіття взаємних впливів учасників агрофітоценозів важко навіть уявити. Залишається все ще багато прогалин у нашому уявленні про наслідки і механізми взаємного впливу рослин і патогенів в агрофітоценозах. Разом з цим вивчення взаємодій в агроценозах на молекулярно-біологічному рівні може стати основою практичного регулювання агрофітоценозів з метою збільшення їх продуктивності.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Характеристика використаних в роботі фітопатогенних бактерій

Ізолювання *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 із пшениці і сеgetальних рослин в посівах пшениці здійснювали в Київській, Полтавській, Чернігівській і Черкаській областях. В стаціонарному досліді ННЦ «Інститут землеробства НААН» обстежували пшеницю сортів Столична, Артеміда, Бенефіс, Царівна, Славна, Поліська 90, Краєвид, Веселка, Кесарія. На полях, де запроваджено органічне землеробство (Полтавська область, Шишацький район), обстежували сорти Левада, Подолянка, Косач, Кубус, Скайген, Смуглянка, Поліська, Артеміда, Подоляночка, Антонівка, Вільшана, Розкішна. В Черкаській області (дослідне господарство Уманського національного університету садівництва) обстежували сорт Гарна.

Ізолювання бактерій здійснювали шляхом висіву на пластини картопляного агару (КА) розтертих із 0,1 мл стерильної водогінної води шматочків рослин на межі здорових і уражених тканин [148]. Для здійснення досліджень за морфологічними ознаками і здатністю індукувати реакцію надчутливості на листках тютюну відбирали вірулентні ізоляти роду *Pseudomonas*. Властивості відібраних ізолятів вивчали за використання описаних нижче методик.

При вивченні гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу проаналізовано велику кількість штамів бактерій, які було ізолювано із уражених і здорових рослин пшениці та уражених сеgetальних рослин посівів пшениці у 2012 - 2019 роках, й штамів *Pseudomonas syringae*, які було ізолювано у попередні роки співробітниками відділу фітопатогенних бактерій

Інституту мікробіології і вірусології НАНУ і які підтримуються у колекції культур відділу. Характеристику досліджуваних штамів наведено безпосередньо в розділах роботи автора, що стосуються вивчення властивостей вказаних штамів.

Основна частина експериментальних досліджень з геномодулювальної активності фітопатогенних бактерій та вивчення мутагенного впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії здійснена за використання п'яти штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978:

УКМ В-1011 (PDDCC 4394) – неопатотиповий штам, ізольований із листа пшениці;

9400 – виділений з листа пшениці ярої сорту Рання 93 у фазі куціння (Київська область);

9417 – виділений з листа пшениці ярої сорту Рання 93 у фазі колосіння (Київська область), авірулентний для пшениці;

9780 – виділений із іржаво-бурих плям на листі пшениці сорту Подолянка (Полтавська область);

9747 – виділений із буро-коричневих плям на листі пшениці сорту Столична (Київська область).

Для порівняльних досліджень було використано штами бактерій, що належать до різних патоварів виду *Pseudomonas syringae* та інших близьких видів бактерій. Всі використані штами бактерій підтримуються в колекції культур мікроорганізмів відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Нижче наведено список використаних штамів:

- *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 типовий штам УКМ В-1027 (NCPPB 281);
- *P. corrugata* (Roberts and Scarlett 1981) Sutra et al. 1997 штам 9070;
- *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 штам 9024.
- *Pseudomonas fluorescens* штам 7769.

- *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) (Burkholder 1926) Gardan et al. 1992 патотиповий штам УКМ В-1123 (ICMP 2740, 9066);
- *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* штам УКМ В-1026 (ICMP 10444, 4012);
- *Pseudomonas syringae* (*Pseudomonas wieringae* (Elliot 1930) Savulescu 1947) штам 7922;
- *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Brown & Jamieson 1913) Young et al. 1978 штам 8544;
- *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* (Elliot 1920) Young et al. 1978 штам УКМ В-1154 (9030);
- *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith et Bryan 1915) Young et al. 1978 штам УКМ В-1039 (7595);
- *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf and Foster 1917) Young et al. 1978 штам 223;
- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young et al. 1978 штамми 140R, IZ28, IZ46;

2.2 Методи вивчення біологічних властивостей *Pseudomonas syringae*

Для вивчення властивостей фітопатогенних бактерій було використано морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні, серологічні, біохімічні та молекулярно-біологічні методи.

2.2.1 Мікробіологічні методи

Морфологію і структуру колоній бактерій, що вирости на картопляному агарі (КА) в чашках Петрі через кілька днів після посіву вивчали, спостерігаючи за допомогою лупи. Характеризували розмір колоній, форму, структуру і консистенцію, поверхню, профіль, краї, колір тощо [346].

Морфологію клітин визначали за допомогою світлового мікроскопа у препаратах, пофарбованих за методом Грама [149, 346]. Рухливість визначали у препараті «роздавлена крапля» при збільшенні у 1350 разів під мікроскопом Sigeta MB-201, використовуючи однодобову культуру бактерій, вирощену на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ).

Для вивчення здатності ізолятів бактерій засвоювати окремі вуглеводи як єдине джерело вуглецевого живлення їх культивували на середовищі Омелянського з індикатором бромтимоловий синій. Як джерела вуглеводів використовували: глюкозу, фруктозу, рамнозу, арабінозу, галактозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, рафінозу, інозитол, дульцитол, манітол, сорбітол, ксилол, саліцин, інουλін у концентрації 0,5%. Здатність споживати вуглеводи визначали за зміною кольору індикатора. Утворення газу враховували за його накопичення в поплавку [149, 346].

Для виявлення протеолітичних ферментів використовували білкові середовища – желатин, молоко, МПБ. При посіві на МПБ відмічали також здатність бактерій розщеплювати білок і пептон до продуктів глибокого розпаду – індолу, сірководню та аміаку [148, 149].

Утворення індолу визначали використовуючи смужки фільтрувального паперу, просочені гарячим насиченим розчином щавлевої кислоти. При наявності індолу смужки забарвлюються в темно-рожевий колір.

При утворенні сірководню смужки, що просочені насиченим розчином оцтовокислого свинцю набувають чорно-бурого забарвлення [148, 149].

Для визначення здатності редукувати нітрати до нітритів бактерії вирощували на МПБ, що містив 0,1 % азотнокислого калію. Про відновлення нітратів до нітритів свідчило яскраво-рожеве забарвлення культурального середовища після додавання 1 % розчину реактиву Гріса [69, 148].

При рості на лакмусовій сироватці спостерігали утворення луку – посиніння, або кислоти – почервоніння середовища [148, 149].

Наявність оксидази визначали за реакцією з 1% розчином N,N-диметил-*n*-фенілендіамін солянокислого. Позитивною оксидазною реакцією є забарвлення

маси бактерій у темно-червоний колір через 5 – 10 секунд [148, 149].

Пектолітичну активність визначали методом посіву бактеріальної маси однодобової культури на скибочки картоплі, які інкубували в стерильних умовах вологої камери [148, 149].

Для вивчення властивостей бактерій також використовували тест-систему API 20E (BioMérieux), яка включає тести на β -галактозидазу (ONPG), аргініндегідролазу (ADH), лізиндекарбоксілазу (LDC), орнітиндекарбоксілазу (ODC), використання цитрату (CIT), утворення H_2S (H_2S), уреазі (URE), дезамінування триптофану (ТДА), утворення індолу (IND), утворення ацетону (VP), желатинази (GEL) глюкози (GLU), маніту (MAN), інозиту (INO), сорбіту (SOR), рамнози (RHA), сахарози (SAC), мелібіози (MEL), амідгаліну (AMY), арабінози (ARA) та цитохромоксидази (OX) і представлена стрипом з 21 мікролункою, що містить зневоднені субстрати, які засіваються бактеріальною суспензією.

Готували суспензію клітин бактерій у фізіологічному розчині концентрацією $0,5 \times 10^9$ КУО/мл. Інокульовані бактеріальною суспензією стрипи API 20E інкубували при $28^\circ C$ упродовж 24 год. Результати фіксували відповідно до інструкції виробника й аналізували за допомогою баз даних, включених в програмне забезпечення APILAB Plus (BioMérieux).

2.2.2 Серологічні методи

Для вивчення серологічних властивостей фітопатогенних бактерій використовували методи аглютинації і преципітації в агаровому гелі. Мікроскопічний метод постановки реакції аглютинації, здійснювали на предметному склі, макроскопічний – у пробірках.

Антигенні властивості штамів бактерій *P. syringae* вивчали за реакціями аглютинації та преципітації [140, 141]. Для цього використовували антисироватки до штамів *P. syringae* п'яти серологічних груп: *P. syringae* pv. *atofaciens* 8281 – серогрупа I; *P. syringae* pv. *atofaciens* K-1025 – серогрупа II; *P. syringae* pv. *atofaciens* PDDCC 4394 – серогрупа IV; *P. syringae* pv. *atofaciens*

948 – серогрупа V; *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 – серогрупа VI. Антисироватки для проведення досліджень було надано д.б.н., с.н.с. Пасічник Л.А.

Для проведення реакції мікроаглютинації на предметне скло наносили краплю антисироватки в розведенні 1:10 чи 1:20 і краплю фізрозчину. У кожену краплю вносили невелику кількість бактерій, щоб утворилась ледь видима муть. Через 1 – 2 хвилин при позитивній реакції спостерігали склеювання бактерій у конгломерати. В контрольній краплі спостерігали лише рівномірну суспензію бактерій, без їх склеювання [148, 346].

Для проведення реакції аглютинації в пробірках готували розведення антисироватки (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200) в пробірках. Після цього в кожену пробірку вносили по 1-2 краплі (0,1 мл) суспензії клітин бактерій у концентрації 1×10^9 КУО/мл. Штатив з пробірками інкубували 18-20 год. при температурі 26-28°C. Наявність реакції аглютинації фіксували за допомогою аглютиноскопа. Реакція вважалася позитивною, якщо в дослідних пробірках утворився зернистий або пластівцевидний осад, а надосадова рідина стала прозорою, в той час як в контрольній пробірці рідина залишалася рівномірно мутною. За характером склеювання бактерій антитілами антисироватки аглютинація буває великопластівцевидна і дрібнозерниста.

Для визначення належності штамів до конкретних серологічних груп використали специфічну реакцію – подвійної дифузії в агарі (ПДА) [148, 346].

Реакцію преципітації здійснювали в 1,2% агаровому гелі, який містив у якості консерванта мертиолят (етилртуть-тіосаліцілат натрію, $C_9H_9HgNaO_2S$) (10 мг на 100 мл гелю). Для приготування агарових пластинок використовували скло, розмір якого залежить від кількості зразків бактерій, які необхідно дослідити. Агарова пластика повинна мати однакову товщину, тому пластинку перед нанесенням на неї гелю розміщують на вирівняну за рівнем поверхню.

Агаровий гель наносять на знежирену скляну пластинку так, щоб він не перелився через край. До застигання агару необхідно видалити із нього пухирці

повітря, для чого поблизу його поверхні проводять полум'ям пальника. В застиглій агаровій пластинці вирізають лунки для антигенів і траншеї для антисироватки.

Діаметр лунок і ширина траншей – по 2 мм. Відстань між лунками 10 мм, а між лунками і траншеєю – 7,5 мм. На агаровій пластинці можна розмістити по декілька рядів лунок і траншей. Для приготування агарових пластинок на склі використовують трафарети із оргскла.

При наявності серологічної спорідненості бактерій утворюються лінії преципітації в вигляді дуг, що являють собою осад, який випав в результаті взаємодії споріднених антигенів і антитіл. Результати дослідів враховують на 2-3 добу.

В реакціях ПДА використовували О- і ОН- антигени, отримані за модифікованим методом Грасе [148]. Для серогрупування штамів бактерій використовували відому схему серогрупування [140, 141].

2.2.3 Вивчення патогенних властивостей *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Патогенні властивості досліджуваних штамів в польових умовах вивчали шляхом штучної інокуляції рослин пшениці в фазу трубкування. В стебло рослини вводили 0,1 мл бактеріальної суспензії концентрацією 1×10^9 КУО/мл. В умовах теплиці проводили зараження сходів пшениці уколом крізь краплину бактеріальної суспензії. Про вірулентні властивості свідчив розвиток видимих ознак ураження. Результати штучної інокуляції враховували через 10-14 днів за 4-х бальною шкалою [154] і визначали середній бал прояву ознак ураження на десяти інокульованих рослинах:

- 1 бал – у місці інокулювання утворюється облямівка 1 – 2 мм бежевого або коричневого кольору. На колоскових лусочках видимих ознак ураження немає.

•2 бали – на стеблі утворюється бура, білувата або бежева поздовжня пляма, яка розтікається (до 1 см довжиною). Часто на колоскових лусочках і остюках з'являються бежеві плями-штрихи, іноді остюки повністю білуваті.

•3 бали – на стеблі розвивається бура, білувата або бежева поздовжня пляма завдовжки понад 1,5 см. На листі утворюються поодинокі коричневі плями-смуги. На колоскових лусочках – дрібні коричневі плями-смуги. Іноді розвивається деформований колос.

•4 бали – розвиваються поздовжні коричневі чи бурі плями на стеблі у місці інокулювання, які сягають декількох сантиметрів і більше. На листках утворюються білуваті водянисті, бурі або бежеві плями, які згодом зливаються в одну. Колос деформується, багато квіток стерильні, на колоскових лусочках з'являються бурі і коричневі плями. Іноді рослини не виколошуються, відстають у рості. Якщо колос розвивається, то в ньому утворюється плюскле, недорозвинене зерно з темним кінчиком.

Патогенні властивості ізолятів бактерій із сегетальної рослинності визначали шляхом штучної інокуляції відповідного виду рослин, з якого ізолят було виділено, використовуючи суспензію одно-дводобових клітин бактерій концентрацією 1×10^7 КУО/мл, яку наносили на поверхню листя з подальшим потрійним пораненням голкою або вводили в стебло шприцем. Як контроль використовували введену в рослину стерильну водогінну воду. Повторність дослідів 5–7-разова.

Облік ураження штучно інокульованих сегетальних рослин здійснювали за 6-бальною шкалою через 7 – 14 днів [63]. Ступінь ураження рослин (від нуля до п'яти балів) оцінювали за розмірами некрозів, що утворилися. 0 – відсутність ознак ураження; 1 – облямівка навколо місця уколу; 2 – розвиток плям невеликого розміру (5 мм); 3 – ураження $\frac{1}{2}$ частини листка чи міжвузля; 4 – ураження $\frac{2}{3}$ частини листка, всього міжвузля, ураження зерна, стебла, та листя; 5 – в'янення всього листка, почорніння 2-х чи 3-х міжвузлів, сильне ураження, стебла та листя, листя скручується і всихає, зерно плоске або взагалі не

утворюється (на пшениці і пирію). Агресивність розраховували як середній бал прояву ознак ураження після штучної інокуляції.

Здатність *P. syringae* індукувати реакцію надчутливості визначали за допомогою метода ін'єкцій-інфільтрацій на листках *Nicotiana tabacum* [346]. Для цього під епідерміс листків вводили суспензію клітин дводобових культур досліджуваних штамів бактерій концентрацією 1×10^7 КУО/мл. Суспензію клітин готували на стерильній водогінній воді. Як негативний контроль під епідерміс листків вводили стерильну водогінну воду. Наявність некрозів спостерігали через добу.

Для визначення стійкості сортів пшениці здійснювали штучну інокуляцію рослин в умовах вегетаційного будинку суспензією клітин *P. syringae* рв. *atrofaciens* УКМ В-1011. Об'єктами дослідження були сорти озимої пшениці Кубус, Патрас, Фаворитка, ярої пшениці Гренні, Печерянка. Результати штучного ураження обліковували за раніше розробленою шкалою [148].

2.2.4 Визначення здатності до утворення біоплівки

Для виявлення здатності бактерій до утворення біоплівки досліджувані штами культивували в 6-лункових поліпропіленових планшетах. В кожну лунку вносили 2 мл картопляного бульйону (КБ) та додавали 0,5 мл суспензії бактеріальних клітин концентрацією 10^6 КУО/мл. Через 48 год. відбирали суспензію планктонних клітин і спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм визначали накопичення біомаси. Біоплівку, що утворилася на дні лунки, обережно промивали 0,85 % розчином хлориду натрію та фіксували 96%-ним етанолом 10 хв. Фарбували біоплівку водним розчином кристалічного фіолетового. Для цього вносили у кожну лунку 2 мл розчину барвника і витримували 5 хв. Барвник зливали і промивали біоплівку 0,85 % розчином хлориду натрію. Планшет із забарвленою біоплівкою просушували 24 год. при кімнатній температурі та здійснювали лізис біоплівки заливаючи в кожну лунку по 2 мл розчину, який містив 0,1 н NaOH і 1% додецилсульфату натрію (ДСН). Витримували планшети 1,5 год. Інтенсивність формування біоплівки визначали

вимірюючи оптичну густина дослідного і контрольного зразків при довжині хвилі 592 нм [61].

2.2.5 RAPD-ПЛР аналіз *Pseudomonas syringae*

Визначення гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу, підтвердження приналежності штамів, які ізолювано із сеgetальної рослинності, та ідентифікацію бактерій після оброблення пестицидами здійснювали за використання Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) – ПЛР та електрофореzu білків зовнішньої мембрани бактерій у поліакриламідному гелі, які є загально визнаними і чутливими методами ідентифікації бактерій [401, 428, 515, 534, 539]. RAPD-ПЛР– це метод аналізу продуктів довільно ампліфікованої поліморфної ДНК з довільними праймерами [534, 539].

Виділення ДНК із бактеріальних клітин. Для виділення ДНК використовували 18 – 20 год культуру фітопатогенних бактерій, вирощену на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) при 28°C в умовах струшування (160 об/хв). Після культивування клітини осаджували центрифугуванням при 8000g 10 хв, ресуспендували у фізіологічному розчині і знову центруфугували в тому самому режимі [148]. Виділення ДНК здійснювали використовуючи набір реактивів «ДНК-сорб Б» («AmpliSens», РФ) за інструкцією виробника. Отриману ДНК зберігали в морозильнику при температурі -20°C.

Праймери для постановки ПЛР. Для постановки RAPD-ПЛР з різними штамми *P. syringae* ми використали чотири праймери. Два з них, ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3') і ОРД-13 (5'-GGGGTGACGA-3') добре зарекомендували себе в роботі з бактеріями роду *Pseudomonas* [296, 469]. Інші два праймери С-4 (5'-CCGCATCTAC-3') та С-13 (5'-AAGCCTCGTC-3') було вибрано враховуючи те, що їх послідовність має містити більш ніж 60 % [G+C] і мати довжину близько десяти нуклеотидів [388,539].

Умови здійснення ПЛР. Для ампліфікації з RAPD-праймерами готували суміш (25 мкл), що містила: 200 нг геномної ДНК; 25 пмоль праймеру; 2,5 Units SynTaq полімерази; 0,2 mM кожного дезоксинуклеотиду трифосфату; 2,5 мкл

10-ти кратного ПЛР буферу. Кожна реакційна суміш була ампліфікована у термоциклері Gene AТAQ Controller (Pharmacia LKB), за таким режимом: початкова денатурація 95 °С – 5 хв, 45 циклів: 94 °С – 1 хв, 38 °С – 1 хв, 74 °С – 1 хв, термінальна елонгація – 72 °С – 7 хв [469].

Аналіз продуктів ПЛР. Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом у 1,5 %-му агарозному гелі з додаванням етідіуму броміду (0,5 мкг/мл) у TBE буфері 40 хв за напруги 90 В. В якості маркерів використовували 100 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas) та 2000 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas).

Спорідненість одержаних профілів порівнювали візуально та аналізували за допомогою комп'ютерних програми Gel-Pro Analyzer, PAST ver.1.81. На основі отриманих результатів будували дендрограми спорідненості штамів *P. syringae*.

2.2.6 Електрофорез білків *Pseudomonas syringae*

Для здійснення роботи було використано методику електрофоретичного розділення бактеріальних білків у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ) вперше запропоновану Laemmli (1970) [346].

Приготування білкових зразків. Фітопатогенні бактерії культивували на КА 24 год при 28°C. Клітини змивали 0,85% розчином хлориду натрію та осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв 10 хв. 5 мг сирих бактеріальних клітин розчиняли в 0,2 мл буферу для зразків наступного складу:

Дистильована вода	19,2 мл
0,5М Трис-НСІ	4 мл
Гліцерин	3,2 мл
20% розчин ДСН	3,2 мл
Меркаптоетанол	1,6 мл
0,05% розчин бромфенолового синього	0,8 мл

Розчин кип'ятили на водяній бані продовж 15 хв та центрифугували при 5000 об/хв 10 хв. Надосадову рідину, яка містила білки, використовували для електрофорезу. Отримані зразки білків за необхідності зберігали при температурі -18°C до двох місяців. Для здійснення електрофорезу заморожені зразки необхідно ще раз прокип'ятити.

Підготовка гелю для електрофорезу. Електрофорез здійснювали у приладі для вертикального електрофорезу в пластинках поліакриламідного гелю (ПААГ). Нами було використано 5% 0,125М Трис, рН 6,8, концентруючий гель та 12% 0,375М Трис, рН 8,8, розділяючий гель (табл. 2.1).

Маркери для електрофорезу. Як маркери використовували суміш білків в буфері для нанесення фірми ООО «Хеліко». Суміш містила: фосфорилазу (97кДа), бичачий сироватковий альбумін (66,2кДа), овальбумін (45кДа), ангідраза вуглеводів (31кДа), інгібітор трипсину (21,5кДа), лізозим (14,4кДа). Маркерні білки наносили за інструкцією виробника (5 мкл на доріжку).

Таблиця 2.1 – Склад гелів для здійснення електрофорезу білків у ПААГ

Складові компоненти	12% 0,375М Трис, рН 8,8, розділяючий гель, мл	5% 0,125М Трис, рН 6,8, концентруючий гель, мл
Дистильована вода	3,4	3,1
1,5М Трис-НСl, рН 8,8	2,5	-
0,5М Трис-НСl, рН 6,8	-	1,25
20% розчин ДСН	0,05	0,025
Розчин акриламід/бісакриламід (30%/0,8%)	4,0	0,85
10% розчин персульфату амонію	0,05	0,05
ТЕМЕД	0,005	0,005
Загальний об'єм отриманого гелю	10,005	5,0

Умови електрофоретичного розділення білків. Для здійснення розділення білків фітопатогенних бактерій використовували 0,025М Трис – 0,192М гліциновий буфер, який містив 0,1% ДСН. В лунки для зразків вносили мікропіпеткою 20 мкл білкового зразка. Кількість білка в пробі має бути 5 – 50 мкг. В перші 5 – 10 хв. електрофорез здійснювали при силі струму 1,5 – 2,0 мА, потім збільшували силу струму до 4 – 5 мА. Розділення тривало від 3 до 4 годин.

Оброблення гелів після розділення. Електрофорез закінчували коли забарвлена смуга досягне нижньої частини гелю. Після завершення електрофорезу пластину ПААГ переносили в кювету з розчином барвника Кумасі R250. Фарбування гелю триває від 1 до 2 годин при кімнатній температурі. Надлишок фарби відмивали розчином, який містить 40% етанолу та 7% оцтової кислоти. Після завершення відмивки гелю здійснювали обробку електрофореграм. Визначали відстань, яку пройшов кожен білок від стартової лінії та визначали електрофоретичну рухливість.

2.2.7 Визначення складу жирних кислот

Жиринокислотний склад загальних клітинних ліпідів патоварів *P. syringae* та їхніх ліпополісахаридів вивчали методом газорідинної хроматографії метилових ефірів жирних кислот [84, 148].

Для одержання метилових ефірів жирних кислот сирі бактеріальні клітини, які вирости на КА, або наважку ліпополісахариду суспендували в метанолі, що містить 1,5% сірчаної кислоти. Метаноліз здійснювали в запаяних ампулах при температурі 80°C протягом 1 год. Метиліві ефіри жирних кислот тричі екстрагували 3 мл суміші ефір-гексан (1:1). Проби перемішували 3 хв та після їхнього розшарування відбирали верхню фракцію, яка містить метиліві ефіри жирних кислот. Екстракти упарювали під вакуумом.

Розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка HP-5MS 30 м × 0,25

мм × 0,25 мм, температурний режим – 150-270 °С з градієнтом у 4 °С, газ-носієм – гелій. Піки ідентифікували шляхом порівняння часу їх утримання з часом утримання стандартних зразків метилових ефірів жирних кислот фірми “Serva” (табл. 2.2), а також за інтегрованою базою даних мас-спектрів NIST 02. Вміст окремих жирних кислот визначали у відсотках від загальної площі піків.

Таблиця 2.2 – Жирні кислоти, ідентифіковані у досліджуваних бактерій

Назва кислоти	Умовне позначення	Час утримання
Насичені жирні кислоти		
додеканова	C12:0	5,29
тетрадеканова	C14:0	9,42
гексадеканова	C 16:0	14,10
октадеканова	C18:0	18,68
Ненасичені жирні кислоти		
<i>cis</i> -9-гексадеценнова	C16:1	13,60
<i>cis</i> -11-октадеценнова	C18:1	18,09
Циклопропанові жирні кислоти		
<i>cis</i> -9,10-метиленгексадеканова	C17:0 cyclo	16,07
<i>cis</i> -9,10-метиленоктадеканова	C19:0 cyclo	20,55
Гідроксикислоти		
3-гідроксидеканову	3-ОН C10:0	4,31
2-гідроксидодеканову	2-ОН C12:0	7,51
3-гідроксидодеканову	3-ОН C12:0	12,81

2.3 Виділення ліпополісахаридів із клітин *Pseudomonas syringae*

Ліпополісахариди (ЛПС) одержували двома методами: екстрагуванням 0,85% розчином хлориду натрію [90] та водно-фенольною екстракцією за Westphal [46].

В обох випадках виділення ЛПС здійснювали із сирих клітин бактерій, які вирощували на КА при 28°C протягом 24 год. Бактеріальну масу з поверхні КА

змивали фізіологічним розчином і осаджували центрифугуванням за 5000 об/хв протягом 30 хв і тричі промивали в тому самому режимі.

2.3.1 Екстрагування ліпополісахаридів розчином хлориду натрію

Метод, який запропоновано Здоровенко Г.М. [90], підходить для виділення нативних ЛПС фітопатогенних бактерій виду *P. syringae*, які характеризуються слабким утриманням у зовнішній мембрані.

Для виділення ЛПС 10 г вологих бактеріальних клітин заливали 100 мл 0,85% -ого розчину хлориду натрію та перемішували протягом 4 – 5 год на магнітній мішалці при температурі 4°C. Клітини осаджували центрифугуванням, надосадову рідину, яка мала слабку опалесценцію, збирали та для позбавлення від низькомолекулярних речовин діалізували 24 год проти дистильованої води (періодично перемішуючи та змінюючи воду). Екстракти ліофільно висушували.

2.3.2 Водно-фенольне екстрагування ліпополісахаридів

Бактеріальні клітини зневоднювали ацетоном та ефіром. Для екстрагування до 10 г підготовлених клітин додавали 170 мл води та нагрівали за постійного перемішування до 65°C. Потім, не припиняючи перемішування, додавали 170 мл 90% розчину фенолу (65°C). Отриману емульсію на крижаній бані охолоджували до 10°C і центрифугували 35 хв. при 2500 об/хв. Водну фракцію збирали, а фенольну двічі промивали водою в тому самому режимі. Об'єднані водні екстракти очищували діалізом проти дистильованої води. Потім центрифугували для видалення нерозчинних домішок (5000 об/хв, 40 хв.) і висушували ліофільно [46].

2.3.3 Очищення ліпополісахаридів

Для очищення ЛПС, отримані одним із вищенаведених методів, готували їхні 3% водні розчини. ЛПС із таких розчинів осаджували ультрацентрифугуванням при 30000 об/хв протягом трьох годин при

температурі 4°C [46]. Отриманий осад розчиняли в дистильованій воді. Процедуру осадження здійснювали двічі. Осади розчиняли в невеликій кількості дистильованої води і ліофільно висушували. Одержані ЛПС використовували для проведення досліджень.

2.4 Методи встановлення хімічного складу ліпополісахаридів

У отриманих різними методами ЛПС визначали вміст основних компонентів: вуглеводів, жирних кислот; та вміст речовин, які є супутніми компонентами препаратів ЛПС: білків та нуклеїнових кислот.

2.4.1 Визначення вмісту вуглеводів

Для кількісного визначення вмісту вуглеводів використовували реакцію з фенолом та сірчаною кислотою [46]. При цьому наважку ЛПС розчиняли в 0,5 мл дистильованої води або відбирали 0,5 мл культуральної рідини. До досліджуваного розчину додавали 0,5 мл 5%-го розчину фенолу і 2,5 мл концентрованої сірчаної кислоти. Одержаний розчин перемішували та залишали для закінчення реакції. Інтенсивність забарвлення визначали на спектрофотометрі СФ- 26 за довжини хвилі 490 нм в кюветі товщиною 0,5 см. Кількісний вміст вуглеводів визначали за калібрувальною кривою, побудованою шляхом калориметрії серії розведень глюкози.

2.4.2 Визначення вмісту білків

Визначення вмісту білка здійснювали методом Lowry, який описано у монографії Варбанець Л.Д. із співав. [46].

Наважку ЛПС розчиняли в 1 мл дистильованої води. До 0,4 мл проби додавали 1 мл свіжоприготовленого робочого розчину, який містив 50 мл 2%-го розчину Na_2CO_3 в 0,1 н розчині NaOH додавали 1 мл 0,5%-го розчину $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 %-му розчині виннокислого натрію. Суміш перемішували, через 10 хв додавали до неї 0,2 мл розчину Фоліна, розведеного вдвічі. Оптичну

щільність визначали на спектрофотометрі СФ-26 через 30 хв в кюветі товщиною 0,5 см за довжини хвилі 750 нм. Кількість білка обчислювали за калібрувальною кривою, побудованою на основі даних калориметрії серії розведень ліофілізованого альбуміну.

2.4.3 Визначення вмісту нуклеїнових кислот

Для визначення загальної кількості нуклеїнових кислот у складі ЛПС було використано спектрофотометричний метод [162].

До 1 мг ЛПС додавали 3 мл 0,5 н розчину хлорної кислоти (HClO_4) і витримували в киплячій водяній бані протягом 20 хв. Після охолодження і центрифугування надосадова рідина була використана для вимірювання поглинання ультрафіолету на спектрофотометрі. Вимірювали оптичну щільність за довжини хвилі 270 і 290 нм. Для обчислення було взято різницю між оптичною щільністю при 270 нм (D_{270}) і оптичною щільністю при 290 нм (D_{290}). Ділення цієї різниці на 0,19 дає кількість мікрограмів нуклеїнового фосфору в 1 мл досліджуваного розчину ($C_{\mu\text{P-НК}}$):

$$C_{\mu\text{P-НК}} = (D_{270} - D_{290}) / 0,19.$$

Для перерахунку кількості нуклеїнового фосфору на кількість самої нуклеїнової ($C^{\text{НК}}$) кислоти використовували коефіцієнт 10,3:

$$C^{\text{НК}} = 10,3 * C_{\mu\text{P-НК}}.$$

2.4.4 Визначення вмісту 2-кето-3-дезоксиктонової кислоти

Вміст 2-кето-3-дезоксиктонової кислоти (3-дезоксид-манно-октулозонової кислоти) (КДО) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [46]. Після окислення періодатом КДО перетворюється на формілпіровиноградну кислоту, яка реагує з тіобарбітуровою кислотою і утворює хромофор з максимумом оптичної густини при 550 нм.

Для видалення КДО 1 мг ЛПС розчиняли в 0,5 мл 0,25 н розчину сірчаної кислоти і витримували на киплячій водяній бані протягом 8 хв. Після охолодження до кімнатної температури до розчину додавали 0,25 мл 0,04М

розчину йодної кислоти (HIO_4) в 0,125н розчині сірчаної кислоти і витримували 10 хв при 55°C. Суміш охолоджували до кімнатної температури і додавали при постійному перемішуванні 1 мл 4%-го кислого розчину арсеніту натрію. Потім доливали 4 мл 0,6%-го водного розчину тіобарбітурової кислоти і після перемішування нагрівали протягом 10 хв при 100°C. Забарвлену в ліловий колір суміш охолоджували і струшували з 5 мл підкисленого бутанолу. Потім для розділення фаз її центрифугували за 3000 об/хв протягом 10 хв. Поглинання забарвленого бутанольного шару вимірювали за довжини хвилі 552 і 508 нм.

2.5 Методи вивчення впливу ліпополісахаридів та пестицидів на бактерії

Для визначення антибактеріальної активності пестицидів на твердому поживному середовищі їх вносили до КА, на якому здійснювали культивування фітопатогенних бактерій. Після 5 діб культивування при температурі 28°C враховували наявність росту бактерій.

Для визначення впливу ліпополісахаридів та пестицидів на фітопатогенні бактерії використовували також рідке поживне середовище – картопляний бульйон (КБ). В такому разі досліджувану речовину вносили у певній концентрації до КБ, на якому здійснювали культивування фітопатогенних бактерій. Пестициди випробовували у рекомендованій виробником концентрації, а також у 10 разів більшій та 10 разів меншій концентрації. Через 24, 48 та 72 год. культивування при температурі 28°C вимірювали оптичну щільність культуральної рідини за 540 нм або висівали серію 10-кратних розведень на КА для прямого підрахунку кількості КУО.

Антибактеріальну активність мікробіологічних препаратів, представлених на ринку України, на основі *Bacillus subtilis* (Фітохелп, Фітодоктор), *Pseudomonas fluorescens* (Планриз-біо), *Pseudomonas aureofaciens* (Гаубсин), *Azotobacter chroococcum* (Азотофіт), визначали методом лунок на картопляному агарі [148]. Рівень антибактеріальної активності препаратів оцінювали за зонами

відсутності росту фітопатогенних бактерій, які виражали в міліметрах. Обраховували середній діаметр зон відсутності росту фітопатогенних бактерій за дії препаратів. Якщо зони відсутності росту фітопатогенів були відсутні або ≤ 10 мм – досліджені препарати вважали неактивними, 10 – 20 мм – з низькою антибактеріальною активністю, 20 – 40 середньою і більше 40 мм – високою.

2.6 Методи дослідження фітотоксичності

Для визначення впливу фітопатогенних бактерій та їхніх ліпополісахаридів на рослинні клітини готували розчини цих речовин відповідної концентрації і пророщували в цих розчинах насіння цибулі ріпчастої та пшениці.

Для вивчення фітотоксичності ЛПС використовували насіння цибулі ріпчастої (*Allium cepa*) сорту Халцедон. Насіння промивали водогінною та стерильною водою, розкладали в чашки Петрі по 20 насінин й пророщували 96 год при кімнатній температурі. Через 96 год після початку вирощування вимірювали довжину кожного корінця та визначали залежність між концентрацією вказаних біологічно активних речовин і довжиною корінців, виражених у відсотках від контролю.

При вивченні фітотоксичної активності щодо пшениці використали насіння ярої пшениці сорту Печерянка. Насіння промивали 1 год. у проточній воді і розкладали на стерильний фільтрувальний папір у чашки Петрі по 10 насінин. В чашки з насінням вносили по 5 мл досліджуваних розчинів. Пророщування проводили при температурі 21°C періодично зволожуючи чашки стерильною водогінною водою. Враховували наступні показники схожість насіння, енергія проростання, морфометричні показники (маса проростків, довжина корінців, довжина пагонів).

2.6.1 Визначення ферментативної активності в рослинах

При вивченні впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens* на стан системи антиоксидантного захисту пшениці каталазну активність визначали титрометричним методом і виражали у кількості O_2 , що утворюється в результаті дії ферменту за 1 хв на 1 г сирої речовини ($мл O_2 \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$), а пероксидазну – за методом Бояркіна [149] і виражали в умовних одиницях на мг сирої ваги тканин. Ферментативну активність визначали на 11 добу після інфікування.

2.6.2 Вивчення функціонального стану фотосинтетичного апарату рослин

Пігментний склад листків визначали методом екстракції у диметилсульфоксиді (ДМСО) з подальшою спектрометрією [314]. Визначення впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens* на стан і активність фотосинтетичного апарату рослин пшениці здійснювали біофізичним методом індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), фіксуючи дані портативним приладом «Floratest». Прилад оснащений дисплеєм (128*64 пікселів) й виносним оптоелектронним сенсором із довжиною хвилі опромінення 470 ± 15 , площею опромінення плями не менше 15 мм^2 і освітленості в її межах не менше $2,4 \text{ Вт/м}^2$. Спектральний діапазон вимірювань інтенсивності флуоресценції в межах від 670 до 800 нм. Програмне забезпечення «Floratest», що йде у комплекті із приладом, виконує прийняття вимірюваних приладом даних через USB-порт комп'ютера та здійснює відображення цих даних у табличному або графічному вигляді [148]. Вимірювання ІФХ здійснювали через 7 і 12 діб після штучного зараження збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Отримані експериментальні дані представляли у графічному вигляді. Розраховували відповідні критичні параметри ІФХ, що є відображенням змін в функціональних ланках фотосинтетичної системи [8, 109]. Параметри, що визначалися: фонові флуоресценція (F_0); кількість Q_B -невідновлювальних комплексів, що не беруть участь у лінійному транспорті електронів:

$K_{pl} = (F_{pl} - F_0) / (F_m - F_0)$; ефективність фотохімії фото системи (ФС) II: $F_1 = (F_m - F_0) / F_m$; гасіння флуоресценції: $qF = (F_m - F_t) / F_t$; параметр, що відображує активність рібuloзобісфосфаткарбоксилази (основного ферменту циклу Кальвіна): $K_i = (F_m - F_t) / F_m$ [8, 109].

2.7 Дослідження геномодулювальної активності в тесті Еймса

Для визначення геномодулювальної (мутагенної та антимутагенної) активності нами було використано прокаріотичну тест-систему – тест Еймса [169, 195].

Як тест-культури використали ауксотрофні за гістидином штами *Salmonella typhimurium* TA100 і *S. typhimurium* TA98 [169]. Штами містять мутації в гістидиновому опероні: *S. typhimurium* TA100 – *his* G46, мутація типу заміни пар основ; *S. typhimurium* TA98 – *his* D3052, мутація зсуву рамки зчитування. Крім цих мутацій, обидва штами несуть додаткові мутації, які підвищують їхню чутливість до мутагенів: Δuvr В – дефект репараційної системи, *rfa* – дефект синтезу ліпополісахариду клітинної стінки. Штами *S. typhimurium* TA98 і *S. typhimurium* TA100 мають плазмиду рКМ101, наявність якої обумовлює стійкість до антибіотика ампіциліну. Введення R-плазмиди збільшило чутливість тест-штамів *S. typhimurium* до дії мутагенів [195, 396]. Штами зберігали на МПА під шаром вазелінової олії. Раз на місяць проводили перевірку збереження генотипу тест-штамів *S. typhimurium*.

Поживні середовища для тест-штамів S. typhimurium. Тест-штами *S. typhimurium* культивували на МПА з ампіциліном (50 мкг/мл) при температурі 37°C.

Визначення геномодулювальної активності різних речовин здійснювали в чашках Петрі з двошаровим середовищем. Для нижнього шару готували мінімальне середовище (МС), яке складається із змішаних в стерильних умовах 300 мл агаризованого розчину мінеральних солей (натрій лимоннокислий – 2 г,

калій фосфорнокислий однозаміщений – 18г, калій фосфорнокислий двозаміщений – 42 г, амоній сірчаноокислий – 4 г, агар-агар – 20 г, дистильована вода – до 1 л), 5 мл 40%-го розчину глюкози, 2 мл 2%-го розчину сульфату магнію. Для верхнього шару використовували напіврідкий агар: хлорид натрію – 6 г/л, агар – 6 г/л. Напіврідкий агар стерилізували при 0,75 атм. 30 хв і додавали до нього попередньо стерилізовані кип'ятінням у водяній бані протягом 15 хв розчини гістидину (600 мкг/мл) та біотину (300 мкг/мл) з розрахунку 1,65 мл кожного розчину на 100 мл агару.

Підготовка культури Salmonella typhimurium до досліджень. Оскільки мутагени краще діють на клітини, які діляться, однодобову культуру тест-штаму *S. typhimurium* з МПА вносили в 5 мл МПБ та культивували 18 год при температурі 37°C (нічна культура). До 5 мл нічної культури тест-штаму додавали 30 мл МПБ і інкубували 4 год в термостаті при температурі 37°C. За такої підготовки тест-культура на початку експерименту знаходилася в експоненційній фазі росту. Клітини *S. typhimurium* осаджували центрифугуванням при 2000 об/хв 40 хв та відмивали від середовища фізіологічним розчином в тому самому режимі. Клітини *S. typhimurium* суспендували в 3 мл фізіологічного розчину і використовували для досліджень. Приготовлена таким чином суспензія клітин *S. typhimurium* містила близько 1×10^9 КУО/мл. Концентрацію суспензії перевіряли в кожному досліді висівом серій десятикратних розведень на МПА або вимірюючи оптичну щільність суспензії.

В ході виконання роботи нами було визначено геномодулювальну активність ліпополісахаридів фітопатогенних бактерій, полісахариду ксампану (ксантану), культуральних рідин, які отримано за культивування *P. syringae* б діб при 28°C на качалках 240 об/хв на чотирьох середовищах: м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), картопляному бульйоні (КБ), середовищі Омелянського (ОМ) та середовищі Wolley D.W. et al. (W) [148].

2.7.1 Визначення мутагенної активності

Речовини, мутагенну активність яких вивчали, розчиняли у стерильній дистильованій воді і вносили в кількості 0,1 мл до розплавленого напіврідкого агару (3 мл). Одночасно до нього додавали 0,25 мл суспензії клітин *S. typhimurium*. Напіврідкий агар виливали на чашки Петрі діаметром 90 мм, у яких містилося 3 мл нижнього агару без гістидину. Після 48 год культивування при температурі 37°C підраховували кількість колоній ревертантів, що вирости на середовищі без гістидину. Мутагенна активність речовини в тесті Еймса вважається встановленою, якщо кількість колоній ревертантів в досліді перевищує кількість ревертантів у контролі для штаму *S. typhimurium* TA98 у 2,0 рази, для штаму *S. typhimurium* TA100 – у 1,8 рази [80]. Антимутагенну активність виражали у відсотках зменшення кількості колоній в дослідних варіантах порівняно зі спонтанним фоном мутацій використаного тест-штаму. Досліди проводили в 3-разовій повторності.

2.7.2 Визначення антимутагенної активності

Для визначення впливу речовин на індукований мутагенез як модельний мутаген використовували біхромат калію або N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ). Біхромат калію часто використовується як модельний мутаген в тесті Еймса [80, 97, 98]. Генотоксична дія сполук, які містять Cr⁺³ або Cr⁺⁶, була неодноразово показана в різних тест-системах [329]. Механізм їх генотоксичної дії пов'язують з ініціюванням процесів утворення активних форм кисню, які спричиняють пошкодження генетичних структур [81]. МННГ належить до сполук, що алкілюють ДНК-найсильніших з хімічних мутагенів. Мутаген утворює кон'югати з глутатіоном (γ-глутамілцистеїнгліцином), що у відновленому стані є нуклеофілом і реагує з електрофільними сполуками. Реакція НГ з цистеїновим залишком глутатіону призводить до утворення діазометану – високореактивної метилуючої сполуки, яка, власне, й спричиняє мутагенний ефект.

Розчин модельного мутагена у стерильній дистильованій воді в кількості 0,1 мл і досліджувану речовину (відповідної концентрації) в кількості 0,1 мл вносили в шар верхнього розплавленого агару одночасно. В цей самий агар додавали 0,25 мл суспензії клітин тест-штаму та виливали на шар нижнього МС. Підраховували кількість колоній His⁺ревертантів. Кожен дослід супроводжували позитивним контролем та визначенням спонтанного фону мутацій тест-штаму. Антимутагенний ефект визначали за відсотком зменшення числа His⁺-ревертантів, індукованих модельним мутагеном за присутності досліджуваної речовини порівняно з кількістю ревертантів, які утворилися за наявності лише мутагену за формулою:

$$X = 100\% - \frac{X_d - CФМ}{X_{нк} - CФМ} \times 100\% ,$$

де X – відсоток зменшення кількості індукованих мутацій, X_d – кількість колоній His⁺-ревертантів в досліді, $X_{нк}$ – кількість колоній His⁺-ревертантів в позитивному контролі, $CФМ$ – спонтанний фон мутацій.

2.8 *Allium cepa* - тест

Для визначення мутагенної активності щодо рослинних клітин використали як тест-об'єкт *Allium cepa* L. (цибулю ріпчасту). Серед рослинних тест-організмів цей вид на сьогодні найчастіше застосовується для оцінки генотоксичності різноманітних речовин [360, 478]. При вивченні мутагенної активності на цьому тест-об'єкті враховували кількість хромосомних аберацій (відстаючі хромосоми, мости, фрагменти).

Мутагенну дію щодо *A. cepa* тестували за методикою J. Rank [457]. Насіння *A. cepa* сорту Халцедон пророщували у розчинах досліджуваних речовин впродовж 48 год до появи корінців довжиною 0,5 - 0,7 мм. Як контроль використовували корінці, які утворилися у насінні, що пророщували в дистильованій воді. Фіксували корінці у суміші етанолу і оцтової кислоти у

співвідношенні 3:1 протягом доби. Корінці відмивали від фіксатора у 80 % етанолі тричі по 2 год. Мацерацію здійснювали у 1н розчині соляної кислоти 30 хв. Забарвлювали корінці 2 год у 1 % розчині ацетоорсеїну. Відмивали корінці у 45 % розчині оцтової кислоти протягом 10 хв. Для цитогенетичного аналізу готували тимчасові давлені препарати апікальної меристеми корінців [148, 152]. Мікроскопіювання здійснювали за збільшення у 400 або 1000 разів за допомогою мікроскопу Sigeta MB-201.

Для аналізу хромосомних аберацій відбирали клітини, у яких відстань між анафазними групами хромосом була не меншою за ширину самої анафазної групи. Це пов'язано з неможливістю достовірного виявлення порушення коли відстань між групами хромосом, які розходяться до різних полюсів, невелика [152]. Аналізували 10 корінців *A. сера* та не менше 100 анафаз і телофаз у кожному варіанті досліду [148]. Для визначення мітотичного індексу (МІ) підраховували кількість клітин у різних фазах мітозу у 10 випадково вибраних полях зору у кожному препараті. Мітотичний індекс виражали як відношення кількості клітин у стадії мітозу до загальної кількості обстежених клітин у відсотках. Визначали частоту аберантних анафаз і телофаз (ЧААТ) та кількість аберацій на аберантну клітину (КАБАК) [113, 114]. ЧААТ є вираженою у відсотках кількістю клітин з абераціями в анафазі. ЧААТ відображає ушкодженість популяції клітин, а КАБАК є кількісною мірою ушкодження аберантної клітини [113, 114]. Результати обчислення ЧААТ і КАБАК представляли як середнє значення \pm стандартне відхилення.

2.9 Метод оцінки дії пестицидів на *Pseudomonas syringae*

Для оцінки впливу пестицидів, як основних стресових абіотичних факторів агрофітоценозів, на фітопатогенні бактерії нами було вивчено їхню антибактеріальну активність, вплив на фізіологію росту бактерій, мутагенну дію. Мутагенну активність пестицидів щодо фітопатогенних бактерій реєстрували за збільшенням кількості мутацій стійкості до стрептоміцину за культивування на середовищі, що містить досліджуваний пестицид.

2.9.1 Характеристика досліджуваних пестицидів

В роботі було використано пестициди, які дозволено до використання в Україні [153]. Їхня характеристика наведена в таблиці 2.3.

2.9.2 Визначення мутагенної активності пестицидів

Мутагенну активність пестицидів щодо фітопатогенних бактерій реєстрували за збільшенням кількості мутацій стійкості до стрептоміцину за культивування на середовищі, що містить досліджуваний пестицид. Такий підхід було запропоновано також іншими дослідниками для визначення мутагенної дії пестицидів безпосередньо на мікробні угруповання ґрунту [98].

Для визначення мутагенної дії пестицидів на фітопатогенні бактерії їх у рекомендованій виробником та у 10 разів більшій за рекомендовану концентрації вносили до картопляного агару (КА), що містив 10 мкг/мл стрептоміцину. На середовище, що містить пестицид й стрептоміцин висівали 0,1 мл суспензії клітин фітопатогенних бактерій концентрацією 10^9 КУО/мл. Концентрацію суспензії бактеріальних клітин визначали за оптичною густиною, що вимірювали на ФЕК за 540 нм. Після культивування протягом 48 год при температурі 28°C враховували кількість колоній Str^R мутантів. Мутагенний ефект пестицидів оцінювали за збільшенням кількості колоній Str^R , що утворюються на середовищі з пестицидом та стрептоміцином, порівняно з кількістю колоній Str^R , які утворювалися на середовищі лише зі стрептоміцином. Як модельний мутаген використовували N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ) в концентрації 10 мкг/мл. За використання цього мутагену кількість Str^R мутантів *P. syringae* збільшувалася у 15 разів.

Приналежність Str^R мутантів до *P. syringae* було підтверджено за реакцією мікроаглютинації склі із антисироваткою у розведенні 1:10 або 1:20. У кожную краплю було внесено невелику кількість бактерій. Через 1-2 хвилини у разі позитивної реакції спостерігали склеювання бактерій у конгломерати [148].

Таблиця 2.3 – Характеристика пестицидів, що використані в роботі

Назва препарата	Діюча речовина препарата, вміст в препараті, г/кг(л)	Призначення	Хімічна група	Рекомендована концентрація робочого розчину,%
1	2	3	4	5
Фундазол 50%, з.п.	Беноміл, 500 г/кг	Фунгіцид системної дії, протруйник насіння	Бензімідазоли	0,1%
Тюфен, з.п.	Тюфанат-метил, 700 г/кг	Фунгіцид системної дії	Карбамати	0,2%
Максим 025FS, т.к.с.	Флудіоксоніл, 25г/л	Фунгіцид системної дії, протруйник насіння	Фторвмісні похідні піролу	0,2%
Топаз, 100 ЕС	Пенконазол, 100 г/л	Фунгіцид системної дії	Тіазоли	0,08%
Скор, 250 ЕС	Дифеноконазол, 250 г/л	Фунгіцид системної дії	Тіазоли	0,13%
Ефатол, з.п.	Фосетил алюмінію, 800 г/кг	Фунгіцид системної дії	Фосфорорганічні сполуки	0,2%
Пенкоцеб, з.п.	Манкоцеб, 800 г/кг	Контактний фунгіцид	Дитіокарбамати	0,32%
Ридоміл Голд 68 WG, в.г.	Манкоцеб, 640 г/кг + металаксил, 40 г/кг	Контактно-системний фунгіцид	Дитіокарбамати, феніламіді	0,5%
Татту, к.е.	Пропамокарбу гідрохлорид, 248 г/л + манкоцеб, 301,6 г/л	Контактно-системний фунгіцид	Карбамати, дитіокарбамати	0,6%
Чемпіон 77%, з.п.	Гідроокис міді, 770 г/кг	Контактний фунгіцид	Сполуки міді	0,3%
Конфідор Максі, в.г.	Імідаклоприд, 700 г/кг	Системний інсектицид контактно-кишкової дії	Хлорнікотинілові	0,01%

Продовження таблиці 2.3

1	2	3	4	5
Оперкот, з.п.	Лямбда- цигалотрин, 50 г/кг	Інсектицид	Піретроїди	0,1%
Таурус, з.п.	Піридабен, 200г/кг	Специфічний акарицид контактною дії	Хлорорганічні сполуки	0,1%
Альфа Супер	Альфа- циперметрин, 100 г/л	Інсектицид	Піретроїди	0,05%
Твікс	Хлорпірифос 500 г/л + циперметрин, 50 г/л	Інсектицид	Піретроїди	0,25%
Ураган Форте 500 SL, в.р.к.	Гліфосат калію, 500 г/л	Неселективний післясходовий гербицид системної дії	Фосфорорганічні сполуки	0,5%
Дуал Голд 960 ЕС, к.е.	S-металохлор, 960 г/л	Селективний досходовий гербицид	Хлорорганічні сполуки	0,32%
Зенкор, в.г.	Метрибузин, 700 г/кг	Системний гербицид	Триазінон	0,14%
Крейсер	Римсульфурон, 250 г/кг	Системний гербицид	Похідна сульфонілсечовини	0,1%
Гран Стар	Трибенурон- метил, 562,5 г/кг+ трифенсульфурон- метил, 187,5 г/кг	Гербицид	Сульфонілсечовини	0,01%

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програмного пакету додатків STATISTICA v. 6.0, який згідно t-тесту Стьюдента був статистично значущим на рівні значущості $p \leq 0,05$.

Про мутагенну дію пестициду судили по збільшенню кількості колоній Str^R мутантів, що утворилися на середовищі з пестицидом, порівняно з кількістю колоній Str^R мутантів, що росли на КА із стрептоміцином. Більш детально методику описано у відповідному розділі експериментальної частини.

2.9.3 Визначення впливу пестицидів на морфологію колоній

Pseudomonas syringae

Для визначення впливу пестицидів на процес морфологічної дисоціації у фітопатогенних бактерій здійснювали їх культивування на картопляному бульйоні (КБ) з пестицидом. Реєстрацію кількості S- та R-форм здійснювали розсівом серії розведень на картопляний агар. Через 48-72 год. культивування враховували кількість колоній S- і R-форм та визначали співвідношення між ними. Морфологію і структуру колоній бактерій, що вирости на КА в чашках Петрі через кілька днів після посіву вивчали, спостерігаючи за допомогою лупи. Характеризували розмір колоній, форму, структуру і консистенцію, поверхню, профіль, краї, колір тощо.

Для встановлення часу початку появи морфологічних дисоціантів здійснювали розсів суспензії клітин фітопатогенних бактерій із КБ з пестицидом через 8, 24, 48, 72 години культивування. Через 72 години культивування на КА враховували кількість колоній S- та R-форми.

Для досліджень властивостей відбирали колонії S- та R-форми та здійснювали їхній повторний розсів на КА. Через 72 години культивування відбирали стабільні S- та R-форми.

Фізіолого-біохімічні властивості S- та R-форм вивчали за використання тест системи NEFERMtest24MikroLaTEST®, ErbaLachema.

Для проведення реакції мікроаглютинації на предметне скло, наносили краплю антисироватки до штаму відповідної серогрупи *P. syringae* у розведенні 1:10 чи 1:20 і краплю фізіологічного розчину. В кожну краплю додавали невелику кількість біомаси бактерій до утворення ледь видимої каламуті. Через 1 – 2 хвилин у разі позитивної реакції спостерігали склеювання бактерій у конгломерати. В контрольній краплі спостерігали лише рівномірну суспензію бактерій, без склеювання.

Здатність S- та R-форм індукувати реакцію надчутливості визначали за допомогою метода ін'єкцій-інфільтрацій на листках *Nicotiana tabacum*.

Вірулентні властивості S- та R-дисоціантів *P. syringae* pv. *atrogenes* оцінювали за штучної інокуляції рослин пшениці у фазі трьох – чотирьох справжніх листків у вегетаційному будиночку за природнього освітлення у весняний період. Результати штучного зараження враховували як описано вище.

2.10 Методи визначення впливу ліпополісахаридів на фізіолого-біохімічні процеси у рослин

Для вивчення здатності ЛПС фітопатогенних бактерій індукувати оксидативний стрес у *A. cepa* пророщене насіння цибулі інкубували протягом 24 годин у розчинах ЛПС. Паростки розтирали у фарфоровій ступці з 0,05 М Na-фосфатним буфером (рН 7,0). У надосадовій рідині визначали пероксидазну, каталазну активність та вміст малонового альдегіду. Для визначення пероксидазної активності застосовували експрес-метод, запропонований R. P. F. Gregory [293], який ґрунтується на окисненні аскорбінової кислоти. Каталазну активність визначали за методом H. Luck [373]. Визначення кількості малонового альдегіду (МА) проводили за методом M. Uchiyama, M. Mihara [506]. Результати вимірювання ферментативної активності і вмісту МА представляли як відсоток від контролю. Контролем слугував екстракт проростків цибулі, що росли у дистильованій воді.

Наявність статистично значущих відмінностей між дослідом та контролем оцінювали у програмі Statistica 5.0.

2.11 Аналіз впливу ліпополісахаридів на пухлиноутворення у рослин та тварин

ЛПС фітопатогенних бактерій характеризуються різноманітністю дії на макроорганізми, в тому числі, неоднозначним впливом на процес пухлиноутворення. Тому вивчення протипухлинної активності ЛПС здійснювали у рослинній і тваринній тест-системах.

2.11.1 Вплив на індуковане *Agrobacterium tumefaciens* пухлиноутворення

Протипухлинну активність вивчали за допомогою експлантатів бульб картоплі та *A. tumefaciens* [156, 158]. Бульби картоплі ретельно очищували та промивали у проточній воді, після чого обсушували і чистили. Обчищену картоплю стерилізували обпалюючи у спирті. В стерильних умовах за допомогою свердла із внутрішнім діаметром 1 см вирізали циліндри тканини бульби картоплі та розрізали їх на диски товщиною 2 – 3 мм. Диски із дотриманням умов асептики розкладали в чашки Петрі з 0,8%-м голодним агаром по 9 штук на чашку.

Для індукції пухлиноутворення на експлантатах картоплі їх обробляли суспензію клітин тридобової культури *A. tumefaciens*, яка була вирощена на КА при температурі 28°C. На поверхню експлантатів наносили по 0,1 мл тестованого розчину та суспензії клітин *A. tumefaciens* у фізіологічному розчині концентрацією 1×10^9 КУО/мл за стандартом мутності.

Для вивчення впливу досліджуваних речовин на процес прикріплення *A. tumefaciens* до клітин картоплі оброблення експлантатів здійснювали у трьох варіантах:

I. Спочатку на експлантат картоплі наносили 0,1 мл розчину досліджуваної речовини, а через 20 хв експлантати обробляли суспензією клітин *A. tumefaciens*;

II. Спочатку на експлантат картоплі наносили суспензію клітин *A. tumefaciens*, а через 20 хв розчин досліджуваної речовини;

III. Експлантати картоплі обробляли суспензією клітин *A. tumefaciens*, а через 24 год після цього обробляли розчином досліджуваної речовини.

Повторність при постановці дослідів з вивчення впливу ЛПС на пухлиноутворення не менше ніж 30 разова. Досліди супроводжували негативним (експлантати не обробляли суспензією клітин *A. tumefaciens*) та

позитивним (експлантати обробляли лише суспензією клітин *A. tumefaciens*) контролюми.

Після трьох тижнів інкубації експлантатів при температурі 20°C підраховували кількість пухлин та інтенсивність їхнього розвитку. При обліку результатів вважали, що експлантати, на яких утворилося до 10 горбиків пухлин, мають слабкий; від 10 до 30 – середній; 30 і більше – сильний розвиток пухлин.

2.11.2 Вивчення дії ліпополісахариду на експериментальні моделі пухлиноутворення у мишей

Експериментальні тварини. 100 мишей-самок лінії BALB/c віком 20 тижнів, які були отримані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Утримання мишей та робота з ними проводилися у відповідності до загальноприйнятих міжнародних правил виконання робіт з експериментальними тваринами. Всіх мишей розподіляли на групи згідно з задачами дослідження.

Експериментальні модельні системи пухлинного росту. Дослідження проведені з використанням стандартних штамів експериментальних пухлин [167], які були одержані з Національного банку культур тканин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. В експерименті використовували асцитні чи солідні форми двох різних за гістогенезом пухлин: карциноми Ерліха і саркоми 37. Пухлини трансплантували мишам підшкірно (солідна форма пухлини) чи внутрішньочеревно (асцитна форма пухлини), для цього кожній тварині відповідно вводили 250 тис. пухлинних клітин, суспендованих у 0,2 мл фізіологічного розчину хлориду натрію [167].

Схема введення досліджуваної субстанції. 0,1 мл препарату ЛПС (10 мкг активної речовини) вводили внутрішньочеревно (у випадку асцитної моделі пухлинного росту) чи підшкірно у холку (у випадку солідної форми пухлини);

ін'єкції здійснювали двічі на 2-гу і 3-тю добу (асцитна форма) чи на 5 і 10-ту добу (солідна форма пухлини) після трансплантації пухлинних клітин [47].

Оцінка протипухлинної активності досліджуваної субстанції. Перебіг пухлинного процесу характеризували за стандартними показниками:

- середня тривалість життя (СТЖ) мишей;
- середні об'єм (у мм³) та маса (у мг) пухлинного вузла;
- середні об'єм (у мм³) та клітинність асцитної рідини.

Для оцінки протипухлинного ефекту розраховували:

а) гальмування росту пухлини (ГРП) [167]:

$$\text{ГРП} = \frac{P_d - P_k}{P_k} \times 100 \%,$$

де P_d і P_k – значення середнього об'єму (чи маси) пухлин у дослідній та контрольній групах.

Об'єм пухлини (у мм³) розраховували за наступною формулою:

$$\pi/6 \times \text{довжина} \times \text{ширина}^2$$

б) збільшення тривалості життя (ЗТЖ) [167]:

$$\text{ЗТЖ} = \frac{\text{СТЖ}_d - \text{СТЖ}_k}{\text{СТЖ}_k} \times 100 \%,$$

де СТЖ_d і СТЖ_k – значення СТЖ тварин у дослідній та контрольній групах.

Біотерапевтичний ефект, розрахований за розмірами (масою) пухлини, вважали значимим при $\text{ГРП} \geq 50\%$, за тривалістю життя – при $\text{ЗТЖ} \geq 25\%$ [167].

На 10-ту добу після внутрішньочеревної трансплантації пухлинних клітин з кожної групи (контроль і дослід) забивали по 5 тварин, з черевної порожнини яких вимивали асцитну рідину, визначали її об'єм і у тесті з суправітальним забарвленням трипановим синім визначали клітинність асцитної рідини. На 21-шу добу після підшкірної трансплантації пухлинних клітин з контрольної групи забивали по 5, з дослідної – по 10 тварин, у яких вилучали пухлини і визначали

їх масу. Тварин забивали методом дисторсії шийних хребців з дотриманням правил біологічної етики.

2.12 Дія *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* і їхніх ліпополісахаридів на калюсні клітини пшениці

Для вивчення впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens* на калюсні тканини пшениці використали суспензію інактивованих (30 хв., 100°C) клітин бактерій щільністю 1×10^9 КУО/мл або розчин ЛПС концентрацією 10 мг/мл. Фітотоксичні речовини вносили у середовище для культивування рослинних клітин у кількості 0,4, 0,5, 0,8, 1% та культивували на таких середовищах калюсні клітини пшениці при температурі $25 \pm 2^\circ\text{C}$ без освітлення. Після 4 тижнів вирощування підраховували приріст калюсної маси і кількість життєздатних колоній. Встановлення впливу фітотоксичних речовин на ріст калюсних клітин здійснювали методом змішування з агаром в триразовій повторності за схемою: селективне середовище (3 пасажі) – середовище без селективного фактору (1 пасаж) – селективне середовище (2 пасажі).

Для отримання калюсних клітин пшениці використали насіння сорту Хуторянка. Насіння пшениці стерилізували двома способами: перший – 30 сек. у 70% етиловому спирті та 20 хв. у 50% розчині комерційного препарату «Білизна»; другий – 5 хв в 70% етиловому спирті, 20 хв в 16,5% розчині пероксиду водню, потім насіння занурювали у спирт і обпалювали двічі у полум'ї [64]. Обидва методи стерилізація виявилися достатньо ефективними. За використання 50% розчину комерційного препарату «Білизна» ефективність стерилізації становила $82 \pm 2,5\%$. За обробки насіння розчином 16,5 % пероксиду водню ефективність стерилізації сягала $94 \pm 1,6\%$. В стерильних умовах насіння переносили на безгормональне поживне середовище Мурасіге-Скуга (МС) у пробірки для пророщування. Пробірки з насінням культивували у термостаті без освітлення при температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Після проростання насіння пробірки переносили у термостат з освітленням 400 лк і температурою $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Як експлантати використовували насіння, листові пластинки і апікальні ділянки асептичного коріння розміром 1–1,5 см з вирощених в стерильних умовах рослин. Листові пластинки розрізали на сегменти 3–5 мм, робили додаткові надрізи для кращого утворення калюсу. Апікальні ділянки асептичного коріння розрізали на сегменти по 2 – 4 мм. Експлантати висаджували на середовища МС з різною концентрацією гормонів: МС1 – містило 1 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП) і 2 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК); МС2 – містило 0,2 мг/л 6-БАП і 1 мг/л ІОК; МС3 – містило 0,5 мг/л 6-БАП і 3,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д). Культивували експлантати в термостаті за температури $25\pm 1^\circ\text{C}$ без освітлення протягом 2 тижнів.

Для візуального визначення пероксидази на чашки Петрі з клітинами патогена перед посадкою подвійних культур розміщали нейлонову сітку, на яку поміщали калюси. Через 5 год спільного культивування сітку з калюсами переносили на середовище МС3 з 500 мг/мл гваяколу. Чашки переносили в термостат при 24°C на 3 год. Пероксидаза розкладає пероксид водню, що супроводжується окисненням агента-відновника – гваякола. Оксидазна активність проявлялась у вигляді почервоніння калюсів, яку вимірювали в відносних одиницях на грам ваги калюсу [102].

Гістохімічне визначення пероксидази у вільній і зв'язаній з клітинними стінками формах здійснювали за бензидиновою реакцією [102]. Для гістохімічного аналізу зрізи проростків пшениці, що виростили на середовищі із прогрітими клітинами патогена, занурювали в розчин пероксиду водню - бензидин (750 г бензидину + 0,7 мл 3 % -й пероксиду водню, розчинений в 500 мл 40 % -го етилового спирту) на 30 хв при кімнатній температурі, потім їх промивали 40 % -м етанолом. Експеримент здійснювали на нативному рослинному матеріалі за використання мікроскопа AxioScop A-1 Carl Zeiss, оброблення зображень проводили в програмі AxioVision 40V.

Матеріалом для селекційної роботи було насіння озимої пшениці сортів Смуглянка, Фаворитка, Столична, Подолянка, яке культивували в умовах

лабораторії на безгормональному поживному середовищі Мурасіге-Скуга [121]. Для отримання калюсу використовували сегменти молодих листків, стебла, коренів та насіння, стерилізацію експлантатів здійснювали 16,5 % розчином перекису водню в ламінарному боксі безпосередньо перед розміщенням на поживне середовище. Приготування живильних середовищ, введення в культуру і субкультивування проводили із застосуванням традиційних методик [121]. Для моделювання бактеріального стресу до складу живильного середовища додавали інактивовані клітини (ІК) *P. syringae* pv. *atropaciens* 9400 в концентраціях 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1,0 %. Як контроль використовували поживне середовище без стресового чинника. Вирощування калюсних культур здійснювали при температурі 22–24 С без освітлення. Кожні 21–24 доби здійснювали пасирування калюсних тканин. В кінці циклу вирощування визначали масу сирого калюсу і ростовий індекс [121]. Індекс стабільності стійкості (резистентності) обраховували як відношення кількості калюсних колоній в третьому пасажі до кількості калюсних колоній в першому пасажі, виражене у відсотках. Для цитологічних досліджень первинних і пасированих калюсних культур готували тимчасові роздавлені препарати ділянок калюсу розміром не більше 2,0 мм, які поміщали на предметні скельця і фарбували водним розчином сафраніну, ДНК – за Фельгеном [152]. Препарати аналізували під мікроскопом Sigeta MB-201. Обсяг вибірки становив не менше 30 клітин кожного типу. Статистичну обробку результатів виконували за допомогою пакету прикладних програм STATISTICA v.6.0.

2.13 Аналіз експериментальних даних

Статистичну обробку отриманих експериментальних даних здійснювали за використання пакету прикладних програм Statistica 6.0 та використовуючи вбудовані функції у Excel.

Для статистичної оцінки даних щодо мутагенної/антимутагенної активності були використані програми R Studio (Version 1.1.463 – 2009-2018

RStudio, Inc.) та Statistica 6.0. Для оцінки цих даних застосовували такі статистичні методи: критерій Шапіро-Уїлка для перевірки нормальності розподілу даних, дисперсійний аналіз за Краскелом-Уоллісом [452] та t-критерій Стюдента для виявлення статистично значущих відмінностей між групами даних.

При аналізі даних щодо впливу ЛПС на експериментальні пухлини у тварин для визначення середньоквадратичної похибки та достовірності отриманих даних використовували комп'ютерну програму GraphPad InStat. Математичну обробку результатів проводили з використанням критерію Стюдента і застосуванням тесту Стюдента-Ньюмена-Кельса чи тесту Даннета. Результати дослідів на виживання тварин аналізували за допомогою тесту Каплана-Мейєра [71].

Кластерний аналіз даних щодо жирнокислотних профілів фітопатогенних бактерій виконано за допомогою програми RStudio (Version 3.5.1) <https://www.R-project.org/> [452] з використанням базових функцій та пакету "dendextend". Для побудови дендрограми спорідненості розраховували евклідову відстань та застосовували метод найближчого сусіда.

Кластерний аналіз даних RAPD–ПЛР профілювання з праймером OPA-13 було виконано за допомогою програми RStudio (Version 3.5.1) з використанням базових функцій hclust. Для побудови дендрограми спорідненості розраховували відстань Жаккарда та застосовували метод найближчого сусіда.

Кластерний аналіз білкових профілів фітопатогенних бактерій було виконано за допомогою програми RStudio (Version 3.5.1) з використанням базових функцій hclust. Для побудови дендрограми спорідненості розраховували відстань Жаккарда та застосовували метод незваженого попарного середнього (UPGMA).

РОЗДІЛ 3

ПОШИРЕННЯ В АГРОФІТОЦЕНОЗІ ПШЕНИЦІ І ВЛАСТИВОСТІ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS*

Pseudomonas syringae pv. *atrofaciens* є основним збудником бактеріальних хвороб зернових культур як в Україні [131] (додаток В), так і в інших країнах [111, 115, 193, 323, 339, 394, 499]. Зміна кліматичних умов, використання великої кількості хімічних речовин за умов інтенсивного ведення сільського господарства і зміна способів господарювання в кінцевому результаті призводить до зміни розповсюдженості і структури популяції збудника, зростання його агресивності та збільшення долі бактеріальних хвороб в загальній кількості хвороб зернових культур. Тому вивчення розповсюдження, екологічних ніш та властивостей збудників бактеріальних хвороб і, зокрема, *P. syringae* pv. *atrofaciens* не втрачає своєї актуальності.

3.1 Біологічні властивості штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, виділених із рослин пшениці

Обстеження посівів пшениці різних сортів здійснювали в наступних областях України: Київській, Полтавській, Черкаській. На усіх обстежених полях було виявлено рослини пшениці із характерними для базального бактеріозу ураженнями вегетуючих частин (рис. 3.1, 3.2). Найчастіше спостерігали ураження у вигляді світло-коричневих чи бежевих плям з коричневою або коричнево-бурою облямівкою на лусочках і листках.

Впродовж 2007 – 2016 років було здійснено мікробіологічний аналіз 405 зразків рослин пшениці з типовими для бактеріальних хвороб симптомами та виділено 140 ізолятів бактерій, які за морфологічними ознаками віднесено до роду *Pseudomonas*. При подальшому аналізі було відібрано 28 грамнегативних оксидазонегативних ізолятів бактерій, які за штучного зараження були вірулентними для рослин пшениці (табл. 3.1).



Рис. 3.1 Колоски пшениці із характерними симптомами базального бактеріозу на лусочках (природне ураження)



Рис. 3.2 Листя пшениці із характерними симптомами базального бактеріозу (природне ураження)

Таблиця 3.1 – Характеристика бактерій *Pseudomonas syringae*, виділених із пшениці

Номер ізоляту	Характеристика джерела виділення		Морфологічні властивості ізоляту		Вірулентні властивості ізоляту		Реакція мікроаглотинації із поліштамовою сироваткою
	Область	Сорт пшениці	Вигляд колоній	Морфологія клітин	Індукція РНЧ на листках тютюну	Штучне зараження пшениці, бали	
1	2	3	4	5	6	7	8
9447	Київська обл.	Столична	Сірі, прозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9748			Сірі, напівпрозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2-3	+
9752			Сірі, напівпрозорі, випуклий центр, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9938		Щедрівка Київська	Сірі, напівпрозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	3-4	+
9939			Сірі, напівпрозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	4	+
9940			Сірі, напівпрозорі, центр випуклий, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	1	+
9942			Сірі, прозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	1	+
9952			Сірі, напівпрозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	1	+
9819		Славна	Сірі, прозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	3	+

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8
9833	Київська обл.	Столична	Сірі, плоскі із піднятим центром, прозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9837			Сірі, прозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2-3	+
9847a		Уродна	Сірі, напівпрозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2-3	+
9894		Веселка	Сірі, прозорі, плоскі	Палички, Г ⁻	+	1-2	+
9894a		Веселка	Сірі, прозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9895		Кесарія	Сірі, прозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9896				Палички, Г ⁻	+	3-4	+
9771	Полтавська обл.	Левада	Сірі, прозорі, краї хвилясті, випуклий центр	Палички, Г ⁻	+	4	+
9775		Подольнянка	Сірі, напівпрозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2-3	+
9776			Сірі, прозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9780		Подольнянка 2	Сірі, напівпрозора, плоскі з концентричними кругами, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	1	+

Закінчення таблиці 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8
9785	Полтавська обл.	Косач	Сірі, напівпрозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	3	+
9853		Смуглянка	Сірі, прозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9857a		Поліська	Сірі, прозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+
9858			Сірі, прозорі, центр припіднятий, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2-3	+
9899		Антонівка	Сірі, прозорі	Палички, Г ⁻	+	2-3	+
9900			Сірі, прозорі	Палички, Г ⁻	+	3	+
9906		Подільська	Сірі, напівпрозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	4	+
9878	Черкаська обл.	Гарна	Сірі, прозорі, плоскі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	3	+

Примітки тут і в табл. 3.3, 3.5: Г⁻ - грамнегативні бактерії, - - ознака негативна, + - ознака позитивна.

Вірулентні ізоляти нами виділено із уражених листків та лусочок пшениці з буро-коричневими, іржаво-бурими, коричнево-бурими, жовто-бурими, бурими, бежевими, бежевими з коричневою облямівкою плямами (рис. 3.2). Іноді навколо плям поширювався хлороз. Характер розвитку некрозів був різний – від окремих плям різного розміру до ураження всієї листової пластинки. Некрози були круглі або видовжені, поширювалися вздовж листової пластинки. Некрози були круглі або видовжені, поширювалися вздовж листової пластинки. За морфологією колоній виділені патогенні ізоляти бактерій були сірими, прозорими чи напівпрозорими, плоскими чи з випуклим центром, іноді з концентричними колами, краї хвилясті (табл. 3.1).

Загалом із пшениці в Київській обл. було ізольовано 16, в Полтавській – 11, в Черкаській – один вірулентний ізолят бактерій. Частота виявлення збудника базального бактеріозу на уражених рослинах пшениці становила 7%. Всі вірулентні оксидазонегативні ізоляти бактерій, виділені із пшениці, індукували реакцію надчутливості в листках тютюну (рис 3.3, табл. 3.1) і давали позитивну реакцію мікроаглютинації з поліштамовою антисироваткою до штамів п'яти серологічних груп *P. syringae* (табл. 3.1). За розробленою нами схемою ідентифікації (додаток Б) на основі вивчених ознак було встановлено приналежність цих ізолятів до виду *P. syringae*.



Рис. 3.3 Прояв реакції надчутливості на листку тютюну, індукованої ізолятами *P. syringae* із пшениці

За штучного зараження пшениці в фазу виходу в трубку штамми *P. syringae* на стеблі і листках утворювалися плями, подібні до тих, які спостерігали в природних умовах (рис. 3.4, табл. 3.1). А саме світло-коричневі, бурі, бежеві з темно-коричневою облямівкою плями. Часто інокульовані вірулентними штамми *P. syringae* рослини не виколошувались.



Рис. 3.4 Симптоми ураження пшениці за штучної інокуляції ізолятами бактерій із пшениці

Необхідно зауважити, що виділені із рослин пшениці із ознаками базального бактеріозу штамми мали різну агресивність за штучної інокуляції рослини-хазяїна (табл. 3.1). Більшість штамів *P. syringae* характеризувалися високою (30% ізолятів) та середньою (50% ізолятів) агресивністю. Низька агресивність щодо пшениці за штучної інокуляції була притаманна 20% виділених штамів бактерій.

При вивченні фізіолого-біохімічних властивостей штамів бактерій встановлено, що вони не редукують нітрати, на лакмусовій сироватці утворюють луг, не утворюють сірководню і індолу. Штами бактерій незначно відрізняються між собою за утилізацією джерел вуглецевого живлення (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Фізіолого-біохімічні властивості бактерій *P. syringae*, ізольованих із пшениці

Тести	Номери штамів <i>P. syringae</i> , ізольованих із пшениці				<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011
	9747, 9748, 9752, 9771, 9775, 9776, 9780, 9785, 9819	9833, 9837, 9847а, 9853, 9857а, 9858, 9878	9894, 9894а, 9895, 9896, 9899, 9900, 9906	9938, 9939, 9940, 9952, 9951,	
Редукція нітратів	-	-	-	-	-
Лакмусова сироватка	Л	Л	Л	Л	Л
Оксидаза	-	-	-	-	-
Реакція надчутливості	+	+	+	+	+
Використання молока	-/З	П/-	П	П	П
Утворення сірководню, індолу	-	-	-	-	-
Гідроліз желатину	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Використання:					
Глюкози, арабінози, фруктози, галактози	К	К	К	К	К
Сахарози	К	К (9837)	К	К (9951)	К
Рафінози	К (9819)	-	К/-	-	-
Лактози, саліцину, інуліну, дульцитола	-	-	-	-	-
Мальтози, рамнози	-	-	-	-	-
Сорбітолу, манітолу, інозитола	К	К	К	К	К

Примітки, тут і в табл. 3.4, 3.6: «+» – штами позитивні за ознакою; «-» – штами негативні за ознакою; «К» – утворення кислоти; «Л» – утворення луку; «П» – пептонізація; «З» – згорання при нагріванні; «н/д» – не досліджували.

Всі штами використовують як єдине джерело вуглецевого живлення глюкозу, арабінозу, фруктозу, галактозу, сорбітол, манітол, інозитол, і не використовують лактозу, мальтозу, рамнозу, інουλін, саліцин і дульцитол (табл. 3.2). Штами бактерій варіабельно використовують сахарозу і рафінозу. Гетерогенність в споживанні деяких джерел вуглецевого живлення патоварів та окремих штамів *P. syringae* підкреслюють також інші дослідники [323].

Таким чином, за патогенними, морфологічними, культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями виділені нами із рослин пшениці штами *P. syringae* не відрізняються від неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. На основі досліджених фенотипових властивостей та враховуючи джерело виділення ізольовані із пшениці патогенні аеробні грамнегативні оксидазонегативні палички ідентифіковані як *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Враховуючи дані наукової літератури щодо епіфітної присутності бактерій виду *P. syringae* на рослинах [135, 262, 476, 495] нами було здійснено ізолювання збудника базального бактеріозу із рослин пшениці без ознак ураження.

Із пшениці сорту Щедрівка київська зібраної в Київській області с. Чабани (Інститут землеробства НААН) нами було виділено ізоляти які за фенотиповими ознаками (додаток Б) віднесено до виду *P. syringae* (табл. 3.3).

Відібрані штами *P. syringae* 9913, 9938, 9939, 9952 і 9953, виділені як епіфіти з поверхні зовні здорового листа пшениці, були аеробними грамнегативними оксидазонегативними рухливими паличками, які не утворювали спор та давали реакцію мікроаглютинації з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* серологічних груп II, IV, V, VI (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Характеристика епіфітних штамів *P. syringae*, які ізольовано із рослин пшениці

Номер ізоляту	Характеристика джерела виділення		Морфологічні властивості ізоляту		Вірулентні властивості ізоляту		Реакція мікроаглютинації із поліштамовою сироваткою	Оксидаза
	Область	Сорт пшениці	Вигляд колоній	Морфологія клітин	Індукція РНЧ на листках тютюну	Штучне зараження пшениці, бали		
9913	Київська обл.	Щедрівка кийвська	Сірі, напівпрозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻	+	2	+	-
9938					+	3-4	+	-
9939					+	4	+	-
9952					+	1	+	-
9953					+	1	+	-

За штучної інокуляції пшениці в фазу виходу в трубку штамами *P. syringae*, які було ізольовано із пшениці без ознак ураження бактеріозами, на стеблі і листках утворювалися плями, подібні до тих, які спостерігали в природних умовах (табл. 3.3, рис. 3.5). Із рослин пшениці без ознак ураження було виділено як високо агресивні для пшениці штами (*P. syringae* 9938, 9939), так і низькоагресивні штами (*P. syringae* 9952, 9953).



Рис.3.5 Симптоми ураження пшениці за штучної інокуляції епіфітним штамом *P. syringae* 9939

Виділені епіфітні штами не редукують нітрати, на лакмусовій сироватці утворюють луг, не утворюють сірководню й індолу, використовують як єдине джерело вуглецевого живлення глюкозу, арабінозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, сорбітол, манітол, інозитол (табл. 3.4). Штами відрізняються за здатністю до гідролізу желатину.

Отже, за патогенними, морфологічними, культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями виділені нами із рослин пшениці без ознак ураження бактеріозом штами *P. syringae* не відрізняються від неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 і типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. На основі досліджених властивостей та враховуючи джерело виділення ізольовані із пшениці епіфітні штами бактерії ідентифіковані як *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Таблиця 3.4 – Фізіолого-біохімічні властивості епіфітних штамів *P. syringae*, ізольованих із пшениці

Тести	Епіфітні штамів бактерій із пшениці	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027
	9913, 9938, 9939, 9952, 9953		
Редукція нітратів	-	-	-
Лакмусова сироватка	Л	Л	Л
Оксидаза	-	-	-
Використання молока	П	П	П
Утворення: сірководню, індолу	-	-	-
Гідроліз желатину	+/-	+	+
Використання:			
глюкози, арабінози, фруктози, галактози	К	К	К
сахарози	К	К	К
рафінози	-	-	-
лактози, саліцину, інуліну, дульцитола	-	-	-
мальтози, рамнози	-	-	-
сорбітолу, манітолу, інозитола	К	К	К

В результаті проведених досліджень встановлено, що збудник базального бактеріозу поширений в усіх досліджених областях України і спричинює ураження пшениці як за інтенсивного, так і за органічного способів вирощування цієї культури. Ізольовані із уражених рослин пшениці штамів

P. syringae pv. *atrofaciens* були вірулентними, 80% виділених нами штамів характеризувалися високою та середньою агресивністю щодо рослини-хазяїна. Показано здатність високоагресивних штамів збудника базального бактеріозу пшениці перебувати у філосфері пшениці як епіфіти.

3.2 Біологічні властивості штамів *Pseudomonas syringae*, виділених із сегетальної рослинності в посівах пшениці

Можливість бур'янів слугувати екологічною нішею збудників бактеріальних хвороб, що здатні уражувати посіви сільськогосподарських культур, досить давно дискутується науковцями [174, 176, 308, 386]. Відомо, що збудник базального бактеріозу пшениці може тривалий час перебувати як епіфіт на незернових культурах [476] та однорічних і багаторічних бур'янах [495]. Вченими експериментально доведено, що бур'яни можуть слугувати джерелами небезпечних епіфітних популяцій бактерій [63, 64]. Водночас залишаються нез'ясованими питання наявності спільних патогенів у культурних рослин та сегетальної рослинності у їхніх посівах (насадженнях) та спеціалізації збудників, які уражують бур'яни.

Поля України характеризуються значною забур'яненістю [62]. Тому виявлення збудника базального бактеріозу серед мікробіоти сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці та оцінка сегетальної рослинності як місця резервації збудника є актуальним завданням.

Виявлення збудника базального бактеріозу пшениці на бур'янах нами здійснено на полях у Київській області.

На полях пшениці було виявлено різноманітні бур'яни серед яких переважали: осот молочайний (осот польовий) (*Sonchus arvensis* L.), мак польовий (*Papaver argemone* L.), берізка польова (*Convolvulus arvensis* L.), будяк польовий (*Cirsium arvense* L.), підмаренник чіпкий (*Galium aparine* L.), пирій повзучий (*Elytrigia repens* L.), плоскуха звичайна (*Echinochloa crusgalli* L.), хвощ польовий (*Equisetum arvense* L.).

Для виявлення збудників бактеріальних хвороб ми відібрали зразки рослин із ознаками ураження на листках (мак польовий – рис. 3.6), стеблах (пирій повзучий, плоскуха звичайна, підмаренник чіпкий) та пагонах (осот польовий – рис. 3.7).



Рис. 3.6 Природне ураження маку польового, виявлене у посіві пшениці



Рис. 3.7 Природне ураження осоту польового, виявлене у посіві пшениці

При обстеженні посівів пшениці відбирали уражені рослини бур'янів із чітко окресленими сухими плямами від світло-коричневого до темно-коричневого кольору округлої чи кутастої форми.

Із бур'янів у посівах пшениці було загалом ізольовано 20 ізолятів, які утворюють сірі, напівпрозорі, гладенькі, округлі колонії діаметром 1,0 – 2,5 мм, зі злегка хвилястими краями, ущільненим та випуклим центром (рис. 3.8). Серед них виявили 7 (L8, L9, L11, L11a, L13, L15, L16), які були оксидазонегативними, спричинювали РНЧ на листках тютюну та давали реакцію мікроаглютинації із поліштамовою антисироваткою до II, IV, V, VI серологічних груп *P. syringae* pv. *atrofaciens* (табл. 3.5). Ці штами нами було ідентифіковано як *P. syringae*.



Рис. 3.8 Колонії, що утворюють ізоляти бактерій із маку польового на картопляному агарі

Таблиця 3.5 – Характеристика штамів *P. syringae*, які ізольовано із бур'янів у посівах пшениці

Номер ізоляту	Характеристика джерела виділення		Морфологічні властивості ізоляту		Вірулентні властивості ізоляту		Реакція мікроаглютинації із поліштамовою сироваткою	Оксидаза	
	Область	Вид рослини	Вигляд колоній	Морфологія клітин	Індукція РНЧ на листках тютюну	Штучне зараження пшениці, бали			
L8	Київська обл.	мак польовий	Сірі, напівпрозорі, краї хвилясті	Палички, Г ⁻ , рухливі, спор не утворюють	+	2	+	-	
L9					+	2	+	-	
L11		осот польовий	Сірі, плоскі із злегка припіднятим центром, прозорі, краї хвилясті		+	1	+	-	
L11a					+	2	+	-	
L13					+	2	+	-	
L15					+	3	+	-	
L16					Сірі, напівпрозорі, краї рівні	+	3	+	-
					Сірі, напівпрозорі, краї хвилясті	+	3	+	-

При вивченні вірулентних властивостей бактерій *P. syringae*, які було ізольовано із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, нами показано їхню вірулентність для пшениці (табл. 3.5, рис. 3.9), у посівах якої здійснювали відбір бур'янів.

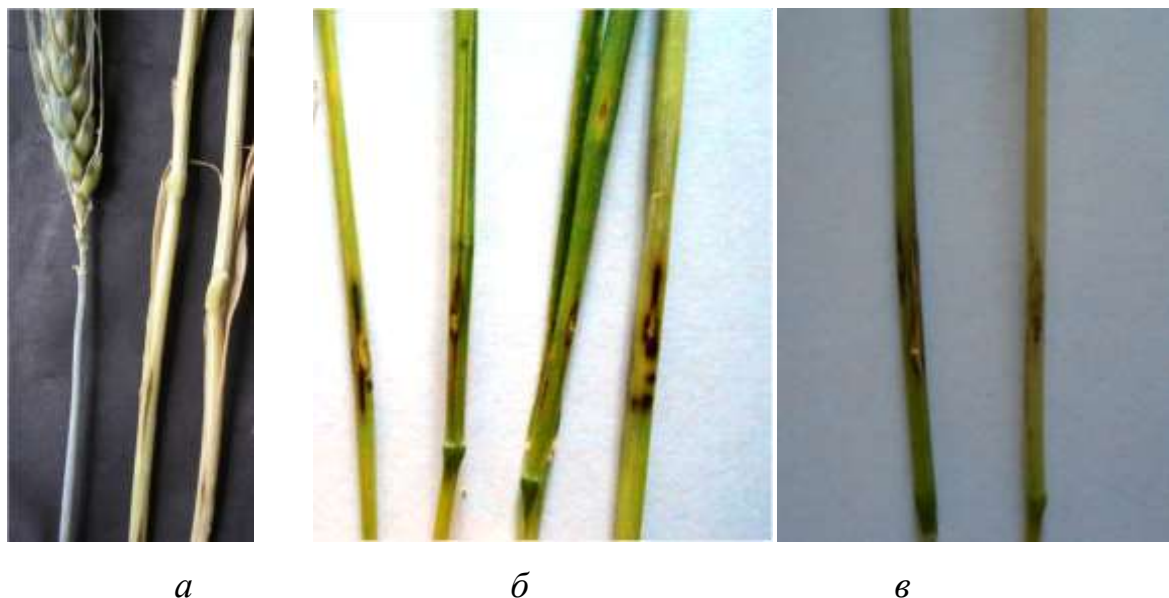


Рис. 3.9 Симптоми ураження пшениці за штучної інокуляції штамми *P. syringae* із бур'янів: а, б – інокуляція штамом із осоту польового *P. syringae* L15, в – інокуляція штамом із маку польового

Отримані результати свідчать, що штами бактерій із бур'янів характеризуються різною агресивністю щодо пшениці (табл. 3.5). При цьому із осоту польового із ознаками ураження нами було виділено високоагресивні для пшениці штами *P. syringae* L15, *P. syringae* L16. Необхідно зазначити, що за штучного зараження пшениці в фазі виходу в трубку розвивалися світло-коричневі плями з темною облямівкою, які з часом збільшувалися у розмірах і охоплювали стебло, що призводило до потемніння серцевини стебла (рис. 3.9). Такі симптоми є характерними для збудника базального бактеріозу пшениці.

Виділені нами із маку польового і осоту польового штами *P. syringae* L8, L9, L11, L11a, L13, L15, L16 за основними властивостями не відрізнялися від неопатотипового штаму – *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (табл. 3.6).

Таблиця 3.6 – Фізіолого-біохімічні властивості штамів *P. syringae*, ізольованих із бур'янів агрофітоценозу пшениці

Тести	Ізольовані із маку польового і осоту польового штами	Штами із бур'янів, які підтримуються у колекції відділу	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011
	L8, L9, L11, L11a, L13, L15, L16	684б, 662г, 650а, 562, 516а, 560а, 646а, 536а, 566б, 515в, 650в	
Редукція нітратів	-	-	-
Лакмусова сироватка	Л	Л	Л
Оксидаза	-	-	-
Використання молока	П	П	П
Утворення: сірководню, індолу	-	-	-
Гідроліз желатину	+	+	+
Використання: глюкози, арабінози, фруктози, галактози	К	К	К
сахарози	К	К/-	К
рамнози	-	-	-
лактози, саліцину, інуліну, дульцитола	-	-	-
мальтози, рафінози	-	К/-	-
сорбітолу, манітолу, інозитола	К	К	К

Ідентифікацію штамів, які ізольовано із бур'янів агрофітоценозу пшениці, здійснено на підставі вивчених морфолого-культуральних та фізіолого

біохімічних властивостей (табл. 3.6). Враховуючи, те що ізоляти бактерій було виділено із бур'янів у посівах пшениці, більш точна їх ідентифікація із встановленням приналежності до певного патовару на основі морфолого-культуральних та фізіолого біохімічних властивостей не могла бути здійснена. Для подальших досліджень і встановлення спорідненості бактерій виду *P. syringae*, що були виділені із бур'янів в посівах пшениці, та штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які ізолювано із пшениці, нами було використано не лише ізолювані нами штами, а й штами, які було виділено [133] під час вивчення бактеріальних хвороб сегетальної рослинності та які підтримуються у колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ. Для цих штамів було встановлено приналежність до виду *P. syringae*. Їхню характеристику наведено в таблиці 3.6.

Виділені із бур'янів штами *P. syringae*, які зберігаються у колекції відділу фітопатогенних бактерій, були вірулентними для рослини-хазяїна, із якої їх було ізолювано. Вони були також були вірулентними для пшениці та спричинювали симптоми ураження, які є характерними для збудника базального бактеріозу.

Отже, із бур'янів, що росли в посівах пшениці, було ізолювано вірулентні одночасно для рослини-хазяїна та пшениці бактерії, які за морфолого-фізіологічними і біохімічними ознаками належать до виду *P. syringae*. Оскільки приналежність фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* до певного патовару встановлюється з врахуванням рослини-хазяїна, ідентичність виділених із бур'янів штамів *P. syringae* із збудником базального бактеріозу пшениці потребує проведення більшої кількості серологічних, біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень.

Необхідно зазначити, що ізолювані із пшениці штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* виявилися здатними за штучної інокуляції спричинювати ураження найбільш поширених у агрофітоценозі пшениці бур'янів (табл. 3.7, додаток Г).

Отримані нами результати свідчать що збудник базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* є поліфагом, який здатний уражувати широке коло

рослин та колонізувати рослини пшениці і бур'янів в агрофітоценозі цієї культури.

Таблиця 3.7 – Агресивність штамів *P. syringae* pv. *atropaciens*, які ізолювано із пшениці, для бур'янів за штучної інокуляції

Штам	Серогрупа	Ураження пшениці, бали	Ураження бур'янів, бал				
			осот польовий	хвощ польовий	берізка польова	пирій повзучий	амброзія
9837	II	3	2	3	1	1	1
9771	IV	4	3	3	0	0	н/д
9819	V	3	2	2	0	1	н/д
9858	VI	3	3	2	1	1	1
9780	VI	3	2	2	н/д	1	н/д

Примітка. н/д – не досліджували

3.3 Серологічна гетерогенність популяції збудника базального бактеріозу пшениці в Україні

Серологічні методи спрощують важкий та тривалий процес ідентифікації збудників хвороб різної етіології. Незважаючи на широке застосування молекулярно-генетичних підходів, серологічні методи ідентифікації збудників хвороб, особливо у випадку їх масового характеру, широко використовують завдяки відносній дешевизні, високій специфічності і швидкості отримання результату, можливості здійснення аналізу великої кількості зразків та відтворюваності результатів [130, 194].

За основними фізіолого-біохімічними властивостями бактерії патоварів виду *P. syringae*, які уражують зернові культури, не відрізняються, а розрізняють їх за спеціалізацією до рослини-хазяїна. За даними літератури за

серологічними властивостями штами патоварів *P. syringae* гетерогенні і штами одного патовару можуть належати до декількох серологічних груп [333, 342, 430, 461, 467]. Отже, при ідентифікації бактерій патоварів *P. syringae* необхідно враховувати їх серологічну гетерогенність.

Тому нами було здійснено аналіз серологічних характеристик штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із агрофітоценозу пшениці за різних систем землеробства, та штамів *P. syringae*, ізольованих із бур'янів у посівах пшениці.

У реакції аглютинації ізольовані нами штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* були серологічно споріднені з штамами *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 (табл. 3.8).

Відомо, що за набором серологічно активних детермінант штами різних патоварів можуть відрізнятися [135, 140, 141, 467]. Тому для більш чіткого уявлення про антигенний склад й приналежність штамів бактерій до певних серологічних груп, здійснювали їх серогрупування, за використання реакції подвійної дифузії в агарі (ПДА) (табл. 3.9).

Таблиця 3.8 – Титри реакції аглютинації штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці, з антисироватками різних серогруп

Штами	Титри реакції з антисироватками штамів <i>P. syringae</i> , серогруп				
	8281 I с.г.	K-1025 II с.г.	4394 IV с.г.	948 V с.г.	7194 VI с.г.
9400	800	12800	12800	200	12800
9402	200	12800	6400	400	6400
9403а, 9403б	200	800-1600	12800	400	400-800
9404, 9487	200	3200	12800-25600	100-200	1600-3200
9405,9406, 9407	100-200	200	12800	100-400	200
9408,9410б,9410а	1600	6400	12800	1600-6400	1600-3200
9411, 9482	1600	12800	12800	1600-3200	12800-25600
9417, 9418	800-3200	3200	12800	3200	800-1600
9433, 9443	800-6400	0	6400	0	0-200
9475, 9481	0	6400	6400-12800	0-100	12800
9484	1600	6400	6400	800	25600
9489	800	25600	25600	800	25600
9491, 9492	0	12800	6400-12800	0	12800
9493	1600	25600	25600	0	25600
9494, 9495, 9505	800	12800-25600	12800-25600	0	6400-12800
9496	1600	12800	12800	200	12800
9501	0	12800	12800	100	800
9502	0	12800	12800	100	12800
9517	800	3200	25600	800	1600
9581	200	12800	12800	800	200
9590	800	6400	12800	0	400
9599	0	12800	3200	0	12800
9616, 9617	0	6400-12800	12800	200	800
9638а, 9639	0	25600	3200-6400	200	12800
9640	0	25600	12800	0	12800
9641	0	12800	3200	100	12800

Примітка. Тут і в табл. 3.10: Титри приведені в реципрокних показниках, с.г. – серогрупа.

Таблиця 3.9 – Серологічні властивості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* із пшениці, вирощеної за інтенсивної системи землеробства, у реакції подвійної дифузії в агарі

Штами, ізольовані із пшениці	Кількість ліній преципітації з антисироватками до штамів <i>P. syringae</i> , серогруп				
	8281, I с.г.	K-1025, II с.г.	4394, IV с.г.	948, V с.г.	7194, VI с.г.
9400, 9402, 9491, 9638a	0	3	0	0	0
9501, 9502, 9505, 9639, 9640, 9641, 9494, 9495, 9599	0	3	0	0	1
9482	0	3	0	0	1 сл.
9493	0	2	0	0	1
9487, 9517, 9581, 9590, 9417, 9418	0	0	3	0	0
9489	0	1	3	0	0
9403a, 9403б, 9404, 9405, 9406, 9407, 9408, 9410a, 9410б	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. 3.9), що частина антигенів досліджених штамів (34%), які було отримано за методом Грасе, 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) утворювали по одній лінії преципітації лише з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI) (табл. 3.9). На основі отриманих результатів найбільша кількість штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* (48%), ізольованих із вирощеної за інтенсивної системи землеробства ураженої пшениці, віднесена до серогрупи IV, менша (37%) – до серогрупи II (рис. 3.10). Два штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які ізольовано з поверхні зовні

здорового листа пшениці, утворювали по 2-3 лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 (серогрупа II) і віднесені до серогрупи II.

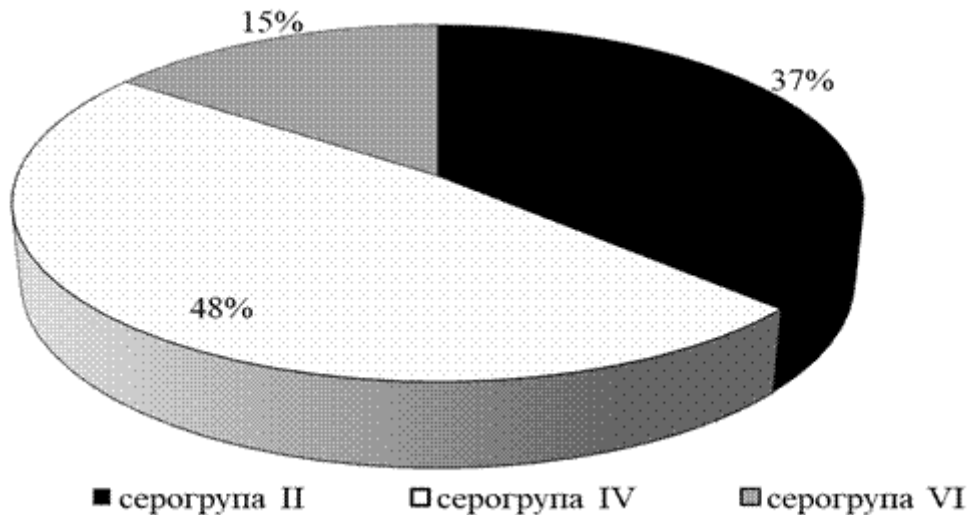


Рис. 3.10 Розподіл штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці, вирощеної за інтенсивної системи землеробства, за серологічною приналежністю

Бактерії, які ізольовані із пшениці, що вирощена за використання системи органічного землеробства, виявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів *P. syringae* різних серологічних груп (табл. 3.10). Слід відзначити, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* по різному реагували 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* K-1025 (серогрупа II) і 4394 (серогрупа IV), 25% ізолятів – з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI). Штам 9819 у високих титрах реагував з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 (серогрупа I) і 948 (серогрупа V).

Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені в 2014 році (табл. 3.10) із пшениці Київської області в високому титрі реагували з антисироватками *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V) і К-1025 (серогрупа II).

Таблиця 3.10 – Титри реакції аглютинації штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* із пшениці, вирощеної за органічного землеробства, з антисироватками різних серогруп

Штами, рік і місце виділення			Титри реакції з антисироватками до штамів <i>P. syringae</i> , серогруп				
			8281 I с.г.	К-1025 II с.г.	4394 IV с.г.	948 V с.г.	7194 VI с.г.
9747	2012	ННЦ «Ін-т земле- робства»	3200	25600	25600	3200	12800
9748			6400	12800	12800	3200	1600
9752			3200	12800	12800	3200	3200
9771	2012	ПП "Агроєко- логія"	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
9819	2013	ННЦ«Ін-т земле- робства»	12800	3200	1600	25600	1600
9833	2014		100	400	400	12800	0
9837			200	12800	200	200	200
9857а	2014	ПП "Агро- екологія"	100	400	12800	200	12800
9858			100	100	12800	100	12800
9894	2015	ННЦ «Ін-т земле- робства»		1600	12800	400	12800
9894а				12800	12800	1600	1600
9895				12800	12800	400	6400
9896				12800	12800	1600	12800
9899	2015	ПП "Агро- екологія"		12800	12800	400	25600
9900				25600	6400	1600	12800
9906				12800	12800	6400	200
9938	2016	ННЦ «Ін-т землероб- ства		6400	1600	3200	12800

Всі штами бактерій, які ізольовані із пшениці, що вирощена 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).

Оскільки ізольовані із пшениці бактерії виявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів *P. syringae* різних серологічних груп за реакцією аглютинації, було здійснено визначення їх серологічних характеристик у реакції подвійної дифузії в агарі (ПДА) відповідно до схеми Л.Т Пастушенко і І.Д. Симонович [140, 141] та встановлення приналежності кожного штаму до певної серогрупи.

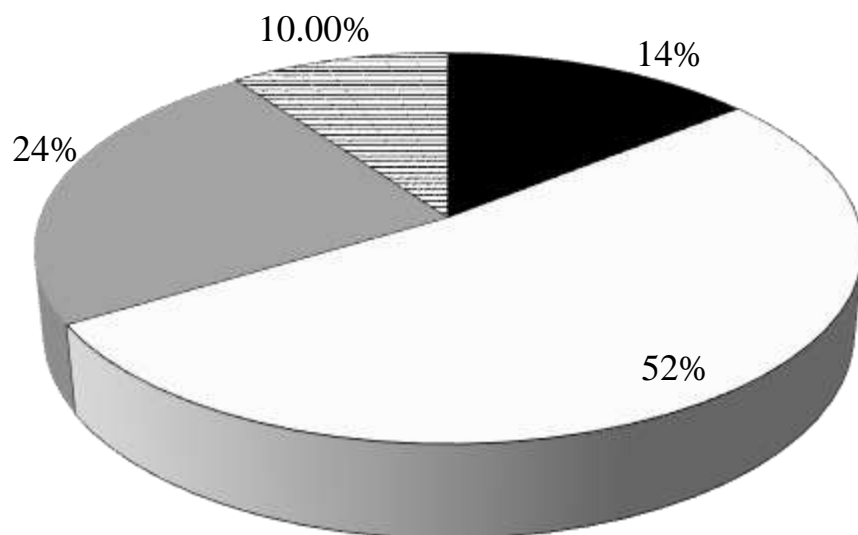
Встановлено (табл. 3.11), що більша частина штамів утворювала по дві-три лінії преципітації з антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV).

Таблиця 3.11 – Серологічні властивості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці, вирощеної за органічної системи землеробства, у реакції подвійної дифузії в агарі.

Штами, ізольовані із пшениці	Кількість ліній преципітації з антисироватками до штамів <i>P. syringae</i> , серогруп				
	8281 I с.г.	К-1025 II с.г.	4394 IV с.г.	948 V с.г.	7194 VI с.г.
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
9857а, 9858, 9894, 9938	0	0	1 сл.	0	1
9894а, 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-три 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). Жоден 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, вирощеної за органічної системи землеробства, розподілені на чотири серогрупи (II, IV, V, VI) за відомою схемою серогруповання [140, 141] (рис. 3.11). Найбільшу кількість штамів віднесено до серогрупи IV (52%), меншу – до серогрупи VI (24%). Штами, які належать до серогруп II і V складають 14% і 10% відповідно.



■ серогрупа II □ серогрупа IV ■ серогрупа VI ≡ серогрупа V

Рис. 3.11 Розподіл штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці, вирощеної за органічної системи землеробства, за серологічною приналежністю

Слід зазначити, що штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* за антигенним складом мають деяку приуроченість до місця ізолювання 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 з сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, у високих титрах (12800-25600) реагувала з антисироватками до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* серогруп II, IV та VI. У нижчих титрах (400 – 6400) досліджені штами бактерій реагували з антисироватками до штамів серогруп I і V. Ці дані вказують на серологічну спорідненість штамів, виділених з бур'янів, зі збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

За результатами ПДА встановлено, що штами *P. syringae*, виділені з бур'янів, за наявністю і ступенем вираженості специфічних антигенних комплексів не ідентичні між собою (табл. 3.12).

Таблиця 3.12 – Серологічні властивості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із бур'янів, у реакції подвійної дифузії в агарі

Рослина, з якої виділено штам	Штам	Кількість ліній преципітації з антисироватками до штамів <i>P. syringae</i> , серогруп			
		К-1025 II с.г.	4394 IV с.г.	948 V с.г.	7194 VI с.г.
Мак польовий	L8, L9	2	0	0	1
Осот польовий	L11, L11a	2	0	0	1
	L13, L15, L16	1	0	0	3

Два штами бактерій *P. syringae*, які ізольовано із маку польового (L8, L9) і два штами, які ізольовано із осоту польового молочайного (L11, L11a) належали до серогрупи II. Три штами *P. syringae* L13, L15, L16, виділені із осоту – до серогрупи VI (табл. 3.12).

Аналізуючи приналежність до серогруп ізольованих із бур'янів штамів *P. syringae* та раніше ізольованих штамів із колекції відділу фітопатогенних бактерій [133], встановлено їх розподіл на чотири серологічні групи – II, IV, V,

VI (рис. 3.12) згідно схеми серогрупування Л.Т. Пастушенко і І.Д. Симонович [140, 141].

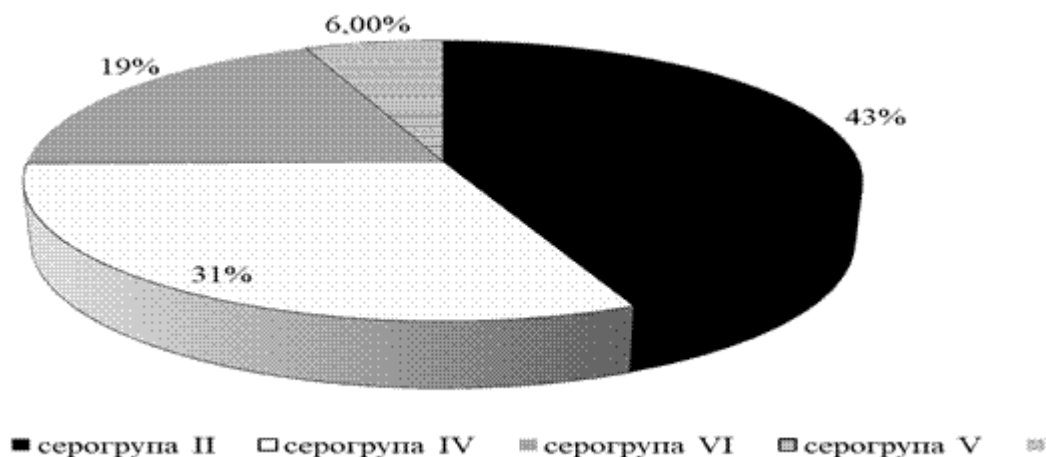


Рис. 3.12 Розподіл штамів *P. syringae*, ізольованих із бур'янів в агрофітоценозі пшениці, за серологічною приналежністю

Отже, всі досліджені штами бактерій проявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів різних серологічних груп *P. syringae*. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із вирощуваної за інтенсивної системи землеробства пшениці, належать до трьох серогруп (II, IV, VI). Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із вирощуваної за органічної системи землеробства пшениці, більш гетерогенні за антигенним складом і належать до чотирьох серологічних груп (II, IV, V, VI). Штами, виділені з сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, – до чотирьох серологічних груп (II, IV, V, VI) та мають високий ступінь серологічної спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

У зв'язку із гетерогенністю штамів збудника за серологічними властивостями і приналежністю до чотирьох серологічних груп для серологічної ідентифікації необхідно використовувати поліштамову антисироватку, яка складається із моноштамових антисироваток до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* К-1025 (серогрупа II), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV),

P. syringae pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V) і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI).

3.3.1 Серологічна діагностика збудника базального бактеріозу пшениці

Експрес діагностика *P. syringae* pv. *atrofaciens* є запорукою вчасного виявлення та вжиття заходів щодо обмеження шкодочинності збудника. Одним із перспективних напрямів створення експрес методів визначення збудників бактеріальних хвороб рослин є імунодіагностика, успішність якої визначається наявністю високоспецифічної до збудника антисироватки.

Нами встановлено, що в Україні поширені вірулентні штами збудника базального бактеріозу пшениці чотирьох серологічних груп – II, IV, V, VI за схемою серогрупування фітопатогенних бактерій групи *Pseudomonas syringae*, тому нами було розроблено експрес діагностику збудника з використанням полівалентної антисироватки до II, IV, V, VI серогруп *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Для приготування поліштамової антисироватки використовують антисироватки до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 (серогрупа II), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупи IV), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V) і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI).

Поліштамову антисироватку створюють змішуючи в рівних кількостях моно штамові антисироватки, які мають титр не менше 1:51200. Поліштамова антисироватка має високу специфічність до збудника базального бактеріозу та титр не менше ніж 1:25600–1:51200. При зберіганні при температурі 2–4°C вона придатна для використання впродовж кількох років.

Виявлення збудника базального бактеріозу пшениці за реакцією мікроаглютинації. Для цього методу діагностики антигенами слугують живі клітини бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Для проведення реакції мікроаглютинації використовують скляні пластини, на які наносять краплю антисироватки в розведенні 1:10 чи 1:20. У кожену краплю вносять невелику кількість суспензії клітин бактерій до утворення ледь помітного помутніння. За

1 – 2 хв за позитивної реакції спостерігають склеювання бактерій в конгломерати, яке фіксують за допомогою лупи, а згодом це виявляють і без лупи. В контролі (за використання фізіологічного розчину замість антисироватки) спостерігають лише рівномірно мутну суспензію бактеріальних клітин.

Всі штами чотирьох серотипів *P. syringae* pv. *atrofaciens* давали позитивну реакцію мікроаглютинації (табл. 3.13). В той же час штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281, *P. syringae* pv. *syringae* 8511 першого серотипу та штам *P. syringae* pv. *tabaci* 223 сьомого серотипу давали негативну реакцію мікроаглютинації. Також мав негативну реакцію штам *P. fluorescens* 7769. Штами виду *P. fluorescens* можуть зустрічатися в агрофітоценозах пшениці як епіфіт, та іноді як умовний патоген, який здатний спричинювати ураження пшениці за сприятливих умов.

Таблиця 3.13 – Реакція мікроаглютинації штамів *P. syringae* з поліштамовою антисироваткою

Вид	Штам	Серогрупа	Результати реакції
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9400	II	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9502	II	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9517	IV	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9418	IV	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	4394	IV	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9819	V	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9833	V	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9411	VI	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	9894	VI	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	8511	I	–
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	8281	I	–
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	223	VII	–
<i>P. fluorescens</i>	7769	-	–

Примітка. + - реакція позитивна, – - реакція негативна.

Отже, створена поліштамова антисироватка є високоспецифічною до поширених в Україні серогруп *P. syringae* pv. *atrofaciens* і її застосування у реакції мікроаглютинації дозволяє достовірно виявити збудник базального бактеріозу.

3.4 Жирнокислотний склад клітинних ліпідів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із агрофітоценозу пшениці

Визначення складу метилових ефірів жирних кислот загальних клітинних ліпідів – це ефективний, швидкий і точний хемотаксономічний метод, який використовують для характеристики та ідентифікації бактерій [202]. Для деяких груп бактерій, аналіз метилових ефірів жирних кислот дозволяє диференціювати та ідентифікувати окремі види і навіть патовари [421, 488, 533], тоді як для інших видів ідентифікація на рівні патоварів і підвидів не можлива [532]. Даний метод успішно застосовують для вивчення фітопатогенних бактерій [331, 488], особливо представників таких родів як *Pseudomonas* і *Xanthomonas* [488, 522]. Оксизаміщені жирні кислоти у ліпідах цієї групи бактерій є добрими хемотаксономічними маркерами.

Тому, для ідентифікації та вивчення спорідненості між штамми, ізольованими з уражених і зовні здорових рослин пшениці та бур'янів агрофітоценозу пшениці, було вивчено склад жирних кислот клітинних ліпідів.

Для аналізу жирнокислотного складу нами було відібрано штамми, які є найбільш типовими представниками досліджуваних груп: штамми бактерій виду *P. syringae*, які ізольовано з уражених бактеріозами рослин пшениці, зовні здорових рослин пшениці, а також штамми, ізольовані з сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці. Для порівняльного аналізу здійснили також аналіз жирних кислот *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із уражених бактеріозами рослин жита. Характеристику досліджуваних штамів наведено в таблиці 3.14.

Таблиця 3.14 – Штами *P. syringae*, які відібрано для вивчення жирнокислотного складу клітинних ліпідів

Вид, патовар	Номери штамів	Джерело виділення
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	912, 2399, 9400, 9417, 9748, 9819, 9771, 9785	Уражені рослини пшениці
	П204, П203	Епіфітні штами, ізолювані із пшениці
	7194, 7836, 7959, 8099, 8116, 8274, 8281, 8317, 8462, 8904, 9010,	Уражені рослини жита
<i>P. syringae</i>	L8, L9, L11, L11a, L13, L15, L16, 6506, 6846, 650в, 5666	Бур'яни у агрофітоценозі пшениці

Оскільки для штамів патоварів *P. syringae* характерні серологічні відмінності для аналізу складу жирних кислот нами були відібрані штами, які належать до усіх серологічних груп, що нами виявлено на зернових культурах. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізолювані з пшениці належать до чотирьох серологічних груп (II, IV, V, VI), із жита – до п'яти (I, II, IV, V, VI). *P. syringae*, виділені із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці відносяться до чотирьох серологічних груп - II, IV, V, VI за схемою серогрупування фітопатогенних бактерій групи *P. syringae*, розробленою Л. Пастушенко та І. Симонович [140, 141].

У клітинах досліджуваних штамів бактерій *P. syringae* хромато-мас-спектрометричним методом шляхом порівняння часу утримання дослідних зразків із часом утримання стандартних метилових ефірів жирних кислот були виявлені жирні кислоти з кількістю атомів вуглецю від 10 до 19. Серед них: насичені (додеканова (C12:0), тетрадеканова (C14:0), гексадеканова (C 16:0), октадеканова (C18:0); ненасичені (*cis*-9-гексадеценева (C16:1), *cis*-11-октадеценева (C18:1)); циклічна кислота (*cis*-9,10-метиленгексадеканова (C17:0 cyclo), *cis*-9,10-метиленоктадеканова (C19:0 cyclo). За інтегрованою базою

даних масс-спектрів NIST 02 також ідентифіковано гідроксикислоти - 3-гідроксидеканову (3-ОН C10:0), 2-гідроксидодеканову (2-ОН C12:0) і 3-гідроксидодеканову (3-ОН C12:0) (рис. 3.13).

У клітинах всіх досліджених бактерій переважаючими жирними кислотами були жирні кислоти з парним числом вуглецевих атомів: гексадеканова, *цис*-9-гексадецена і *цис*-11-октадецена. При цьому, сумарний вміст цих кислот становить більше 80 % від усіх виявлених жирних кислот. З них 51 – 60 % становили ненасичені жирні кислоти (C 16:1, C 18:1) (табл. 3.15 – 3.18).

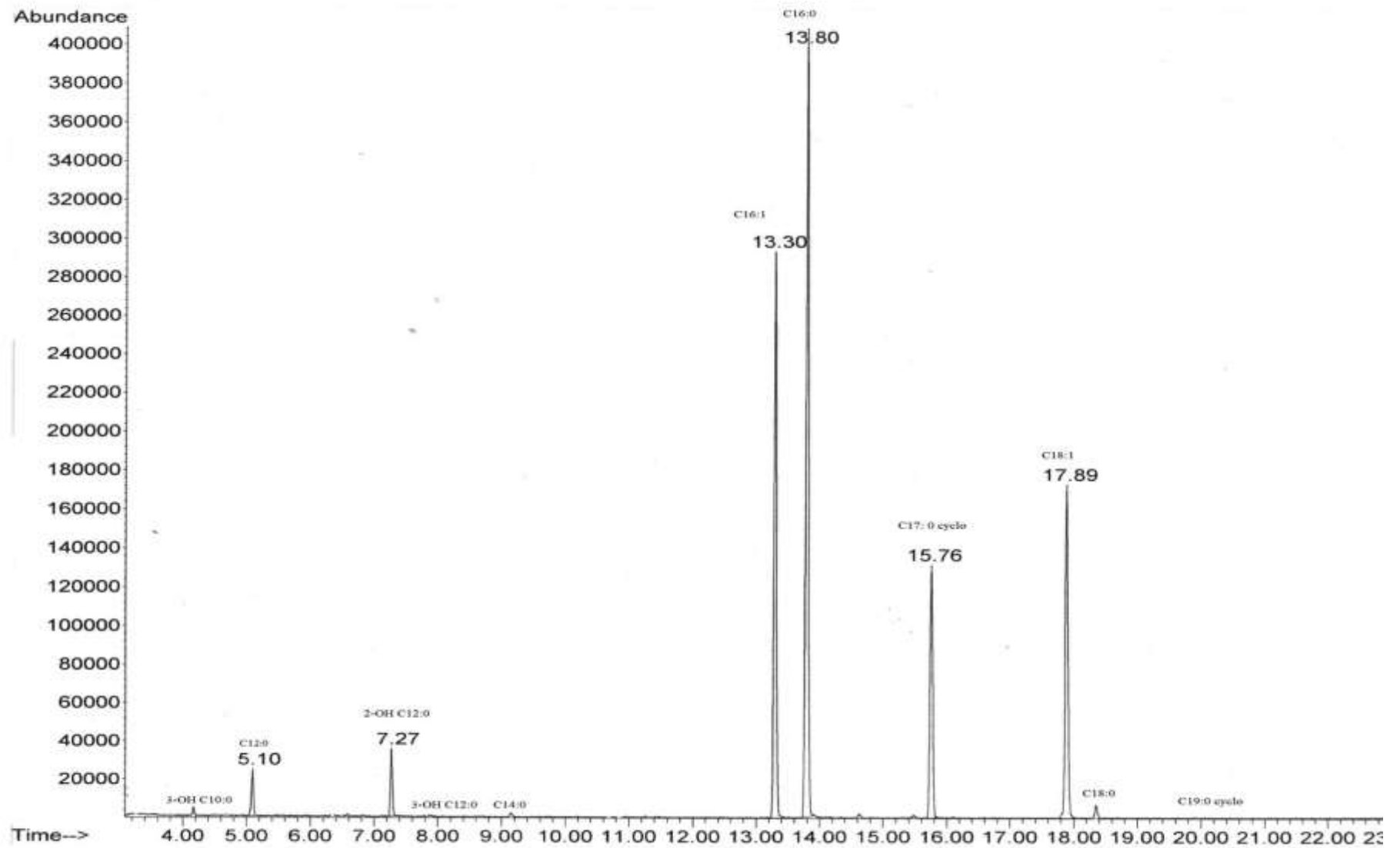


Рис. 3.13 Хроматограма жирних кислот клітинних ліпідів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9748

Таблиця 3.15 – Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених з жита

Штами	Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків)										
	3-ОН C10:0	C12:0	2-ОН C12:0	3-ОН C12:0	C14:0	C16:1	C16:0	C17: 0 cyclo	C18:1	C18:0	C19:0 cyclo
8281	1,47±0,07	5,25±0,26	4,41±0,22	2,94±0,15	0,84±0,04	32,77±1,64	31,51±1,57	Сл.	18,90±0,94	1,89±0,09	Сл.
8116	2,03±0,10	6,74±0,34	2,41±0,12	2,54±0,12	Сл.	27,98±1,39	28,24±1,41	1,74±0,08	24,68±1,23	3,56±0,17	0,25±0,01
8317	2,61±0,13	5,69±0,28	2,30±0,11	2,15±0,11	0,61±0,03	32,31±1,61	29,84±1,49	0,25±0,01	25,84±1,29	1,85±0,09	Сл.
9010	1,86±0,09	2,34±0,12	3,79±0,18	2,27±0,11	0,44±0,02	29,65±1,48	30,40±1,52	0,25±0,01	25,78±1,28	3,18±0,16	Сл.
8462	0,89±0,04	2,07±0,10	1,92±0,09	1,90±0,09	0,88±0,04	28,65±1,43	31,02±1,55	0,74±0,03	28,65±1,43	3,24±0,16	0,25±0,01
7194	Сл.	1,09±0,05	1,75±0,09	1,10±0,05	0,54±0,02	33,18±1,65	32,53±1,62	1,75±0,08	25,11±1,25	3,49±0,17	0,30±0,01
7836	Сл.	0,76±0,03	0,5±0,02	0,40±0,02	0,40±0,02	37,21±1,86	34,93±1,74	Сл.	23,29±1,16	2,78±0,14	Сл.
8904	0,89±0,04	2,38±0,12	0,74±0,04	0,89±0,04	0,89±0,04	31,25±1,56	29,17±1,45	0,89±0,04	29,01±1,45	3,27±0,16	Сл.
8274	1,57±0,08	6,62±0,33	1,74±0,09	1,39±0,07	0,35±0,01	30,48±1,52	31,36±1,56	Сл.	23,52±1,17	2,96±0,14	Сл.
8099	1,03±0,05	5,32±0,27	1,63±0,08	0,25±0,01	0,59±0,03	28,10±1,40	32,53±1,62	1,03±0,05	27,07±1,35	2,65±0,13	0,20±0,01
7959	1,50±0,07	3,90±0,19	2,52±0,12	2,55±0,12	0,75±0,03	29,57±1,47	31,53±1,57	1,05±0,05	24,62±1,23	2,25±0,11	0,20±0,01

Примітка. Тут і в таблицях 3.15 і 3.16. Сл. – на хроматограмі було ідентифіковано жирну кислоту, але її кількість не перевищувала 0,1% від загальної площі піків.

Таблиця 3.16 – Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених з пшениці

Штами	Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків)										
	3-ОН C10:0	C12:0	2-ОН C12:0	3-ОН C12:0	C14:0	C16:1	C16:0	C17: 0 cyclo	C18:1	C18:0	C19:0 cyclo
912	0,55±0,03	2,21±0,11	2,35±0,11	1,66±0,08	0,55±0,03	31,16±1,56	31,16±1,55	2,35±0,11	24,30±1,21	2,90±0,15	0,20±0,03
2399	0,64±0,03	1,77±0,08	4,50±0,22	2,09±0,10	0,80±0,04	31,83±1,59	34,88±1,74	0,64±0,03	21,78±1,08	2,96±0,14	Сл.
9400	0,40±0,02	5,00±0,02	1,30±0,10	0,35±0,02	0,20±0,01	30,60±1,51	36,00±1,80	6,30±0,30	19,50±1,00	0,80±0,10	Сл.
9417	0,30±0,01	4,70±0,21	1,00±0,10	0,30±0,01	Сл.	29,40±1,52	35,50±1,81	1,30±0,10	26,50±1,30	1,30±0,70	Сл.
П204	0,40±0,02	0,38±0,02	1,98±1,00	1,38±0,07	0,59±0,03	32,07±1,60	37,02±1,85	0,41±0,02	21,78±1,09	2,96±0,15	0,25±0,01
П203	0,39±0,02	1,59±0,08	1,79±0,09	1,20±0,06	0,59±0,03	32,73±1,63	36,51±1,82	0,59±0,03	21,80±1,09	2,77±0,13	Сл.
9748	0,29±0,01	3,78±0,18	1,45±0,06	Сл.	Сл.	38,96±1,82	28,78±1,40	0,29±0,01	25,29±1,25	1,16±0,05	Сл.
9771	0,31±0,01	3,08±0,15	0,92±0,04	Сл.	Сл.	40,92±2,04	30,15±1,51	0,31±0,01	23,39±1,16	0,92±0,04	Сл.
9785	0,29±0,01	4,67±0,23	1,75±0,08	Сл.	Сл.	38,78±1,92	28,28±1,41	0,87±0,04	24,49±1,22	0,20±0,01	Сл.
9819	Сл.	2,95±0,14	0,98±0,04	Сл.	Сл.	44,92±2,24	32,46±1,62	Сл.	18,03±0,91	0,66±0,03	Сл.

Таблиця 3.17 – Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці

Штами	Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків)										
	3-ОН C10:0	C12:0	2-ОН C12:0	3-ОН C12:0	C14:0	C16:1	C16:0	C17: 0 cyclo	C18:1	C18:0	C19:0 cyclo
650б	1,51±0,07	6,35±0,32	1,21±0,05	0,24±0,01	0,05±0,01	41,23±2,06	27,18±1,36	0,20±0,01	21,38±1,06	0,3±0,01	0,45±0,01
684б	0,98±0,05	6,87±0,34	1,54±0,05	0,24±0,01	0,05±0,01	40,58±2,03	27,16±1,35	1,01±0,05	20,76±1,04	0,33±0,01	0,53±0,05
650в	1,31±0,08	7,92±0,39	1,91±0,06	0,27±0,01	0,05±0,01	37,22±1,86	25,85±1,29	4,24±0,02	19,86±1,00	0,33±0,01	1,09±0,01
566б	1,13±0,06	8,52±0,41	0,99±0,04	0,18±0,01	0,05±0,01	48,37±2,41	27,51±1,37	0,20±0,01	12,73±0,63	0,18±0,01	0,21±0,02
L8	1,65±0,08	9,80±0,42	2,03±0,10	0,34±0,02	0,12±0,01	46,22±2,31	25,86±1,29	0,51±0,02	12,63±0,63	0,17±0,01	0,67±0,03
L9	1,85±0,09	9,70±0,43	2,35±0,11	0,45±0,02	0,10±0,01	42,01±2,10	26,32±1,31	0,63±0,03	15,34±0,77	0,31±0,02	0,94±0,04
L11	1,43±0,07	8,87±0,44	1,95±0,09	0,28±0,01	0,10±0,01	47,98±2,39	26,11±1,30	0,17±0,02	12,77±0,64	0,10±0,01	0,24±0,01
L11а	2,40±0,12	12,85±0,65	2,30±0,11	0,67±0,03	0,15±0,01	41,63±2,08	26,81±1,34	0,58±0,03	12,13±0,60	0,16±0,01	0,32±0,02
L15	1,17±0,05	7,59±0,36	2,20±0,10	0,61±0,03	0,20±0,01	43,51±2,17	28,89±1,44	0,56±0,03	14,73±0,74	0,33±0,02	0,21±0,01
L16	2,20±0,11	4,84±0,21	1,55±0,75	1,13±0,05	0,15±0,07	44,84±2,24	25,67±1,28	0,56±0,03	17,12±0,85	1,04±0,05	0,90±0,05
L13	2,40±0,02	5,05±0,25	1,60±0,08	1,05±0,05	0,16±0,05	44,69±2,23	28,75±1,43	0,52±0,01	15,17±0,76	1,03±0,05	0,05±0,01

Таблиця 3.18 – Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів штамів різних патоварів *Pseudomonas syringae*

Штами	Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків)										
	3-ОН C10:0	C12:0	2-ОН C12:0	3-ОН C12:0	C14:0	C16:1	C16:0	C17: 0 cyclo	C18:1	C18:0	C19:0 cyclo
УКМ В-1027	2,75±0,13	6,25±0,32	2,15±0,17	1,25±0,01	0,25±0,02	31,75±1,59	34,25±1,71	0,5±0,02	18,25±0,92	2,5±0,12	0,1±0,01
УКМ В-1154	0,37±0,01	3,29±0,20	0,91±0,05	0,36±0,02	0,18±0,01	38,94±1,94	30,71±1,53	0,55±0,01	22,12±1,20	2,55±0,12	0,02±0,01
УКМ В-1039	0,88±0,04	2,2±0,11	2,05±0,01	1,91±0,08	0,58±0,03	27,9±1,39	32,89±1,64	1,32±0,05	27,31±1,38	2,94±0,15	0,02±0,01
8544	1,43±0,07	7,3±0,40	3,05±0,02	2,01±0,10	0,02±0,01	31,2±1,56	31,5±1,57	0,41±0,02	21,72±1,20	1,34±0,07	0,02±0,01
140R	0,53±0,03	5,86±0,34	2,28±0,01	0,64±0,03	0,32±0,02	35,8±1,79	23,24±1,16	0,02±0,01	26,84±1,34	4,45±0,22	0,02±0,01

В усіх досліджених штамів бактерій ідентифіковано додеканову кислоту. Вміст її становив від 1 до 10% у різних штамів. Як мінорні компоненти (вміст яких становив від 0,1 до 5%) виявлені октадеканова та циклопропанові (C17:0 сусло і C19:0 сусло) жирні кислоти. Необхідно зазначити, що у деяких штамів було ідентифіковано не всі мінорні жирні кислоти. На нашу думку, це пов'язано з особливостями підготовки проб і чутливістю методу аналізу. Якщо на хроматограмі пік жирної кислоти мав висоту менше одного міліметра, то його ідентифікацію не здійснювали.

Як відомо, найбільше значення для систематики бактерій *P. syringae* мають оксизаміщені жирні кислоти [488]. В усіх досліджених нами штамів ми ідентифікували 3-гідроксидеканову (3-ОН 10:0), 2-гідроксидодеканову (2-ОН 12:0), 3-гідроксидодеканову (3-ОН 12:0) жирні кислоти (табл. 3.14 – 3.16). Зазначені жирні кислоти в досліджених штамів бактерій містилися в кількості від 0,24 до 4,50%.

Одержані нами результати щодо жирнокислотного складу клітинних ліпідів *P. syringae*, ізольованих із зернових культур та сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, узгоджуються з даними літератури. За твердженням D. Stead [488] більшість з оксикислот у бактерій роду *Pseudomonas* присутні на рівні менше 5 % від загальної площі піків та незважаючи на це, три або чотири оксикислоти найчастіше присутні в загальних профілях. Для D. Stead [488] результати розподілу тих чи інших оксикислот слугували однією з підстав для розподілу проаналізованої колекції на 6 груп. Патовари *P. syringae* входять до групи 1 підгрупи 1a, всі члени якої містять 3-ОН-C10:0, 2-ОН-C12:0 і 3-ОН-C12:0 оксикислоти в кількостях, менших 5 – 6 %.

Під час кластерного аналізу спорідненості штамів *P. syringae*, створеної на основі складу жирних кислот, було встановлено, що всі досліджені нами штами (штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані із пшениці, жита, епіфітні штами та штами, виділені із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, і представники інших патоварів *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039, *P. syringae* pv. *tomato* 140R; *P. syringae* pv. *atrofaciens*

УКМ В-1154, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027) утворили один великий кластер (рис. 3.14).

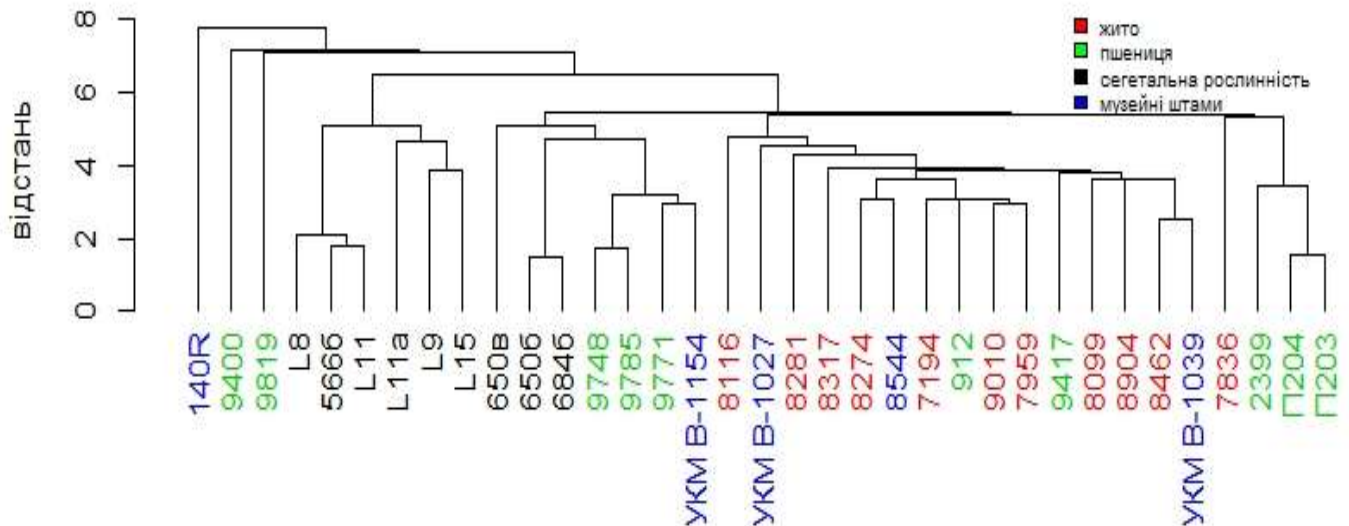


Рис. 3.14 Дендрограма спорідненості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* на основі аналізу складу жирних кислот загальних клітинних ліпідів.

Отже, всі досліджені штами бактерій незалежно від джерела їх виділення мають подібний якісний склад жирних кислот, всі штами містять важливі для ідентифікації оксизаміщені жирні кислоти, що підтверджує їх приналежність до виду *P. syringae*. Наявність відмінностей в спектрі жирних кислот є особливістю кожного штаму і не корелює з розділенням на патовари та серогрупуванням. Нами не було виявлено закономірностей у складі жирних кислот клітинних ліпідів досліджених штамів, які б дозволили розділити штами на групи, приурочені до джерела ізоляції штаму та (або) підтвердити приналежність ізольованих із сегетальної рослинності штамів до патовару *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Stead D. E. із співавторами [487] встановили можливість використання аналізу складу жирних кислот для ідентифікації фітопатогенних бактерій на

видовому рівні, а методів заснованих на полімеразній ланцюговій реакції для диференціювання на підвиди, патовари, біовари і, можливо, навіть раси патогенних для рослин бактерій. Підтвердження приналежності штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, до патовару *P. syringae* pv. *atrofaciens*, який є збудником базального бактеріозу пшениці, потребує проведення подальших досліджень.

Отримані результати підтверджують висунуте багатьма науковцями твердження про можливість використання складу жирних кислот для ідентифікації бактерій на видовому рівні. Всі ізольовані в агрофітоценозі пшениці штами, що були ідентифіковані на основі морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних та серологічних властивостей як *P. syringae* pv. *atrofaciens* мали схожий склад жирних кислот загальних клітинних ліпідів та містили важливі для ідентифікації бактерій цього виду 3-ОН-С10:0, 2-ОН-С12:0 і 3-ОН-С12:0 оксикислоти в кількостях, менших 5 – 6 %, що підтверджує приналежність досліджуваних штамів до *P. syringae* pv. *atrofaciens* та свідчить про однорідність популяції збудника за цією ознакою.

3.5 Гетерогенність штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на основі RAPD - ПЛР аналізу

Для дослідження різноманітності та класифікації мікроорганізмів досить розповсюдженим є метод ДНК-ДНК гомології. Проте, цей метод є досить дорогим і потребує багато часу для здійснення дослідження, а тому не може бути використаний для швидкого аналізу великої кількості бактеріальних ізолятів, що необхідно при здійсненні популяційних досліджень [453].

Для дослідження геномів використовують різноманітні методи: рестрикційний аналіз ДНК [547], аналіз повторюваних елементів ДНК, що отримані в результаті ампліфікації з REP-, ERIC-, BOX- праймерами (rep-ПЛР) [370, 371]. Встановлено високий ступінь генетичної варіабельності штамів *Pseudomonas*, отриманих з уражених тканин зернових культур з ознаками

базального бактеріозу. Всі штами за результатами ампліфікації з REP-, ERIC-, BOX- праймерами та рестрикційного аналізу ITS1 розділено на 2 генетичні групи: “Syringae” і “Fluorescens”.

Метод ампліфікації ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначив новий напрям сучасної методології встановлення специфічності геномів. ПЛР дозволяє виявити поліморфізм ДНК, який може бути використано для аналізу між- та внутрішньовидової мінливості.

Однією з основних складностей при використанні ПЛР для аналізу мінливості геномів є необхідність отримання інформації про послідовності нуклеотидів у геномі чи у варіабельних ділянках ДНК для підбору праймерів.

Для аналізу поліморфізму ДНК збудника базального бактеріозу нами використано метод RAPD- ПЛР (Random Amplified Polymorphic DNA – довільно ампліфікована поліморфна ДНК), запропонований [534, 539]. Праймери, що використовують для RAPD-ПЛР мають відносно невеликі розміри (8-12 нуклеотидів), довільну нуклеотидну послідовність і [G + C] – склад не нижче 50% [388, 539].

У випадку використання довільних праймерів відпадає необхідність з'ясування нуклеотидної послідовності ділянки ДНК, яка ампліфікується, що значно спрощує аналіз. Зразки електрофоретичного розподілу ампліфікованої ДНК (RAPDs) з різних генетичних джерел можуть бути об'єктом порівняльного аналізу, на базі якого визначається рівень спорідненості. Оскільки за допомогою RAPD-ПЛР можливо тестувати велику кількість локусів, цей метод є перспективним для генетичних досліджень багатьох об'єктів.

RAPD-ПЛР аналіз успішно використовується для генетично-популяційного аналізу широкого кола мікроорганізмів [428] та, зокрема, для генетичного аналізу популяцій видів *Pseudomonas* [265, 298, 311, 458].

Sazakli E. із співробітниками при дослідженні генетичної різномантності штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. alkaligenes*, *P. fluorescens*, *B. ceracia*, ізольованих з водних джерел у Греції, протестували 40 різноманітних праймерів, щодо утворення продуктів ампліфікації в умовах RAPD-ПЛР.

Встановлено, що продукти ампліфікації утворювалися за використання 32 праймерів, але лише за використання двох праймерів ОРА-13 (5'-СAGCACCCAC-3') та ОРD-13 (5'-GGGGTGACGA-3') утворилися продукти ампліфікації, при розділення яких методом електрофорезу в агарозному гелі, виявлено різницю між досліджуваними штамми [496].

3.5.1 RAPD-ПЛР аналіз ізольованих із рослин пшениці штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Для здійснення дослідження з визначення гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу в Україні були використані не лише ізольовані нами штамми *P. syringae* pv. *atrofaciens*, а й штамми, які було ізольовано співробітниками відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАНУ в різних регіонах України впродовж 20 років моніторингу посівів зернових культур на наявність збудників бактеріальних хвороб. Характеристику штамів наведено в таблиці 3.19.

Таблиця 3.19 – Характеристика штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, гетерогенність яких досліджували методом RAPD-ПЛР

№	Штам	Місце виділення, область	Вид рослини	Сорт	Джерело виділення	Серо-група	Агресивність
1	2	3	4	5	6	7	8
1	9403а	Київська	пшениця	Авангард	колос	4	4
2	9405			Поліська 90	лист	4	4
3	9410а			Поліська 90	лист	4	4
4	9417			Рання 93	лист	4	0
5	9443			Поліська 90	колос	4	1
6	9482			Поліська 90	лист	2	3
7	9489			Поліська 90	лист	4	3
8	9492			Поліська 90	лист	6	3
9	9507			Поліська 90	лист	4	2
10	9511			Поліська90	лист	6	3
11	788			Ювілейна 50	лист	6	4
12	9400			Рання 93	лист	2	4
13	1392			Южноукраїнка	стебло	5	4
14	1322			Селекц. матеріал	лист	2	4
15	П203			Марлебен	лист	2	3
16	П204			Марлебен	лист	2	3
17	9517	Вінницька		Шестопалівка	лист	4	2
18	К-1025			Аврора	лусочка	2	4
19	948	Волинська		Поліська 70	лист	5	4
20	962			Ювілейна 50	колос	4	4
21	1200			Дані відсутні	лусочка	4	3
22	2399	Полтавська		Миронівська 808	зерно	6	3
23	2824	Луганська		д/в	лист	4	4

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6	7	8
24	912	Ів.-Франківська	пшениця	Миронівська 808	лусочка	2	4
25	7247	Полтавська	жито	Зазерське	зерно	6	1
26	7194			Олімпіада 80	насіння	6	4
27	8462	Чернігівська		Саратовське 5	лист	6	2
28	7118	Хмельницька		Росіянка	насіння	2	4
29	8122	Волинська		Белта	лист	2	2
30	8312	Житомирська		Орловське	лист	1	3
31	8317			Нива	лист	1	0
32	7910	Закарпатська		Харківське 60	лист	2	3
33	8769			Харківське 78	колос	1	3
34	8844			Харківське 60	колос	1	4
35	7959			Добриня	лист	4	2
36	8099	Рівненська		Белта	лист	5	3
37	8241	Київська		Белта	лист	6	0
38	8904			Селекційний матеріал	лист	4	2
39	9010			Белта	лист	6	4
40	7864			Селекційний матеріал	лист	2	3
41	7778			Київське	лист	1	4
42	8548			Чулпан	колос	1	3
43	8247			Харківське 194	лист	4	0
44	8268			Українське тетра	обгортковий лист	4	0
45	8540		Таловське 12	колос	2	0	
46	8904		Селекційний матеріал	колос	4	2	
47	8967		Селекційний матеріал	лист	2	4	
48	9006		Українське тетра	лист	2	4	
49	9011		Українське тетра	лист	6	4	
50	9401	Київська	овес	Скаун	лист	1	4

Для вивчення методом RAPD-ПЛР також були використані штами фітопатогенних бактерій, що належать до різних патоварів виду *P. syringae*: *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039, *P. syringae* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026, *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. syringae* 7922, *P. syringae* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123, *P. syringae* pv. *tomato* 140R, *P. corrugata* 9070, *P. syringae* pv. *tabaci* 223, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281, *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154. Характеристику цих штамів наведено в підрозділі 2.1.

Штами збудника базального бактеріозу зернових культур було ізольовано в 11 областях України (табл. 3.19). Ці штами було ізольовано як із рослин з ознаками ураження, так і ззовні здорових рослин (епіфітне виживання).

За фізіолого-біохімічними властивостями досліджувані штами не відрізнялися між собою та відповідали відомим з літератури даним. Досліджувані штами належали до I, II, IV, V, VI серогруп, що є типовим для бактерій *P. syringae*, які ізольовано із агроценозів зернових культур. Встановлено, що патогенні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані із пшениці, розподілені на чотири серологічні групи (II, IV, V, VI) за схемою серогруповання фітопатогенних бактерій *P. syringae*. Ізольовані з жита належать до п'яти серогруп (I, II, IV, V, VI).

Такий самий розподіл на серогрупи був і серед використаних нами для визначення гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу в Україні штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* (рис. 3.15). Серед відібраних для проведення RAPD - ПЛР аналізу 50 штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 15% належали до серогрупи I, 25% – до серогрупи II, 33% – до серогрупи IV, 6% – до серогрупи V, 21% – до серогрупи VI.

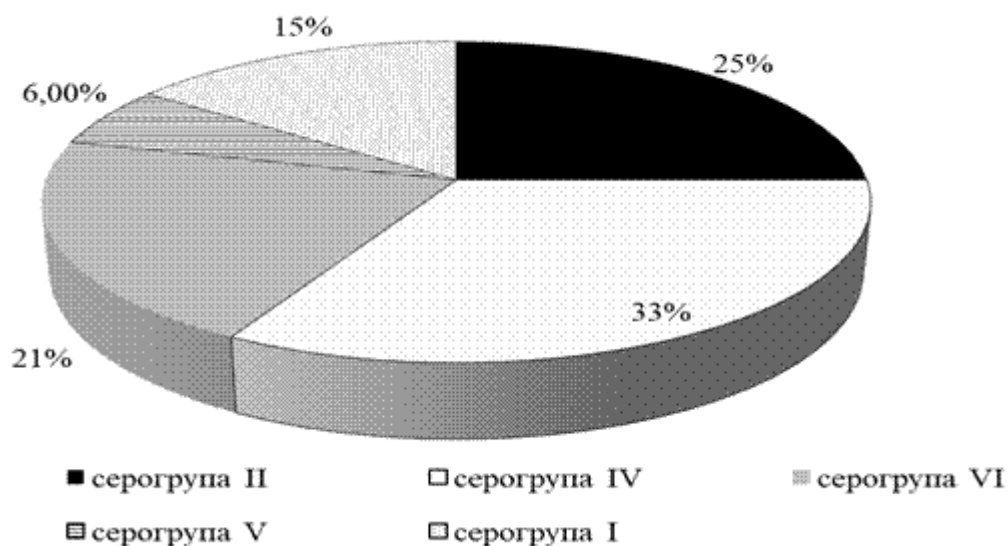


Рис. 3.15 Розподіл відібраних для проведення RAPD - ПЛР аналізу штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* на серогрупи

Відібрані для проведення RAPD - ПЛР аналізу штами відрізнялися за агресивністю на рослині-хазяїні. Більшість штамів (65%) були високоагресивними і спричинювали ураження пшениці 4-3 бали (рис. 3.16). 16 % штамів спричинювали ураження пшениці на 2 бали. 5% були слабоагресивними і уражували пшеницю на 1 бал. А 14 % виявилися авірулентними. За штучної інокуляції рослини-хазяїна вірулентні штами спричинювали симптоми подібні до природних ознак ураження.

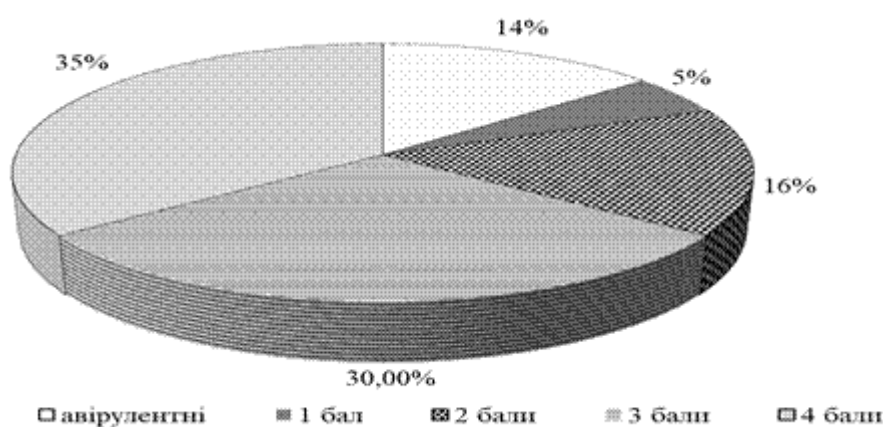


Рис. 3.16 Розподіл відібраних для проведення RAPD-ПЛР аналізу штамів за агресивністю на рослині-хазяїні

Для вивчення генетичної гетерогенності штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* нами було використано RAPD-ПЛР із праймером OPA-13, який дозволив здійснити типування штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. alkaligenes*, *P. fluorescens*, *B. cepacia*, ізольованих з водних джерел у Греції [496]. Цей праймер також було використано для вивчення спорідненості між штамми *P. syringae* pv. *syringae*, які було ізольовано із манго в Іспанії [296].

За використання праймеру OPA-13 для ампліфікації ДНК штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* були отримані спектри ампліфікованих фрагментів, які були подібними для всіх досліджених нами штамів (як ізольованих із пшениці, так і ізольованих із жита). Діапазон поліморфних локусів становив від 500 до 1300 т.п.н. (рис. 3.17, 3.18).

Для всіх штамів домінуючим продуктом був фрагмент ДНК з розміром близько 700 т.п.н. Такий фрагмент був відсутнім лише за ампліфікації ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9443 (рис. 3.18).

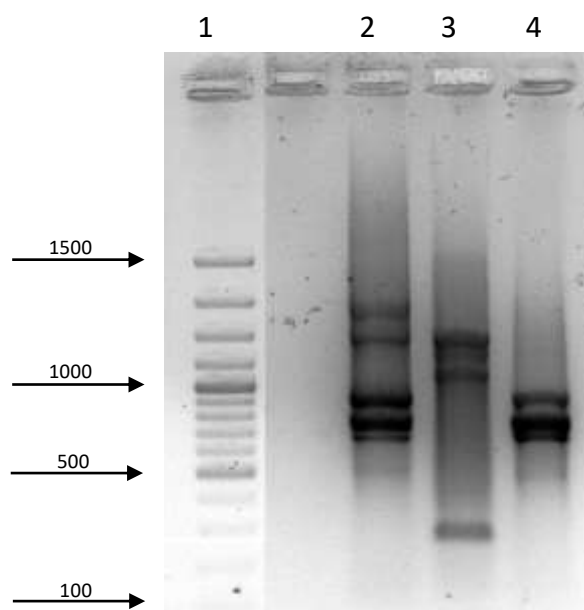


Рис. 3.17 Електрофореграма фрагментів ДНК у 1,5 % агарозному гелі: 1 – маркер 100 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas); 2 – продукти RAPD-ПЛР-реакції *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 з праймером OPA-13; 3 – продукти RAPD-ПЛР-реакції *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 з праймером OPD-13 (5'-GGGGTGACGA-3'); 4 – продукти RAPD-ПЛР-реакції *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8967 з праймером OPA-13.

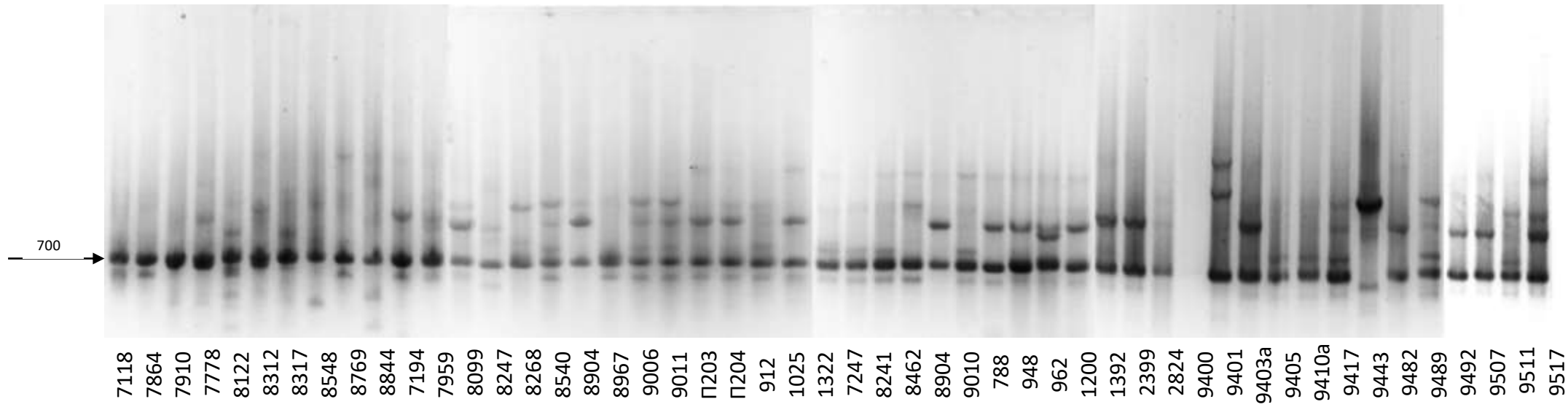


Рис. 3.18 Електрофореграма продуктів RAPD-ПЛР реакції ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* з використанням праймеру ОРА-13 у 1,5 % агарозному гелі

За використання методів кластерного аналізу було побудовано дендрограму спорідненості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* (рис. 3.19).

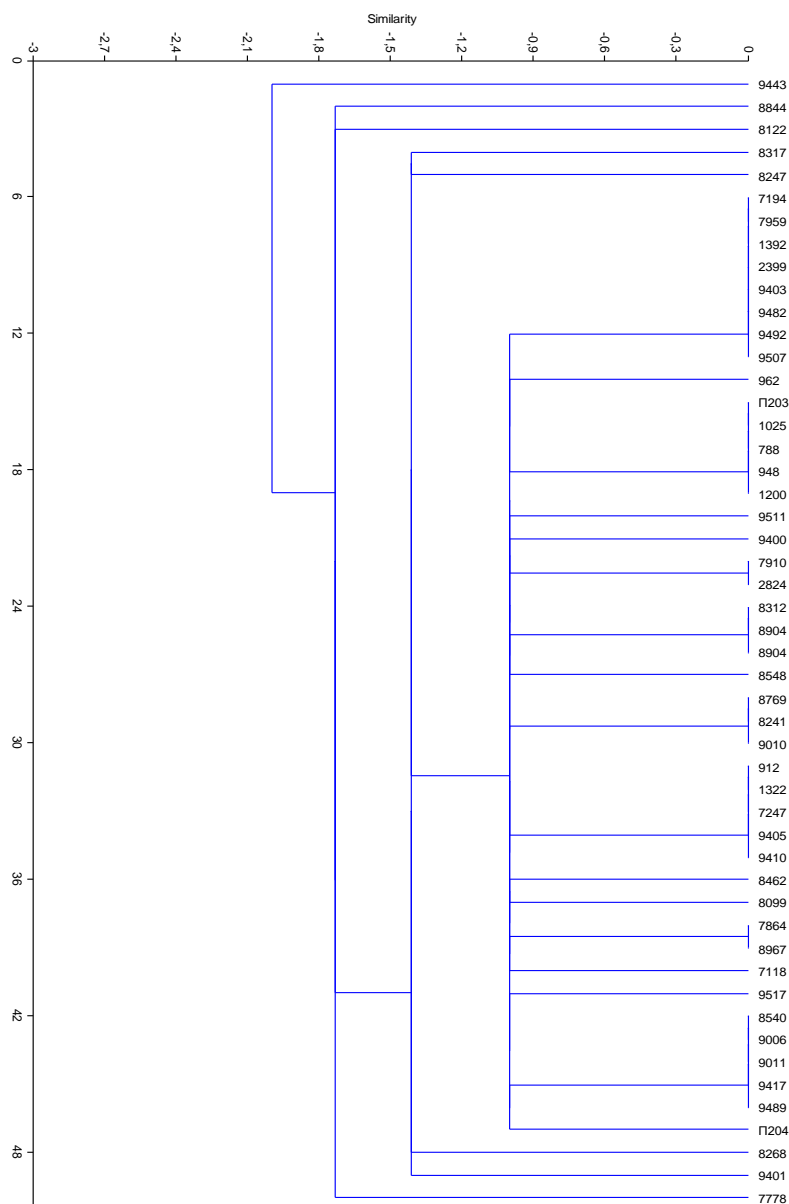


Рис. 3.19 Дендрограма спорідненості патогенних для зернових культур бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, побудована за результатами RAPD-профілювання з праймером ОРА-13.

Всі штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, незалежно від географічного регіону виділення, рослини, з якої було ізольовано бактерії, приналежності до серогрупи та агресивності, утворили споріднену групу (рис. 3.19).

Найбільше від усіх штамів відрізнявся штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9443. Цей штам було ізольовано із рослин пшениці сорту Поліська 90 у

Київській області. Він належить до четвертої серогрупи і є слабоагресивним щодо рослини-хазяїна. На нашу думку приналежність цього штаму до *P. syringae* pv. *atrofaciens* може бути переглянута після проведення цих досліджень.

Ще три штами, що відрізнялися від загальної групи *P. syringae* pv. *atrofaciens*, а саме *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8317, 8247, 8268 (рис. 3.19), були авірулентними для рослини-хазяїна. Ці штами було ізольовано із рослин жита у Житомирській (8317) і Київській (8247, 8268) областях. Оскільки приналежність бактерій до певного патовару пов'язана із їх здатністю спричинювати хвороби певного виду рослин, можливо вказані авірулентні штами не належать до патовару *atrofaciens*.

Для підтвердження відтворюваності результатів ампліфікації було використано дві проби ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8904, після розділення та аналізу продуктів електрофорезу було підтверджено ідентичність цих двох проб, що свідчить про високу точність і відтворюваність отриманих даних.

Результати вивчення спектрів продуктів ампліфікації ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* із праймером ОРА-13 дозволяють зробити висновок, що досліджувані нами штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* є генетично однорідною групою.

Від близькоспорідненої групи, яку утворили штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, відрізнявся також штама *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9401 (рис. 3.19), який виділено із вівса. Цей факт дав нам підставу для подальшого аналізу продуктів ампліфікації ДНК різних патоварів виду *P. syringae* з праймером ОРА-13.

Встановлено, що використання праймеру ОРА-13 дозволяє отримати продукти RAPD-ПЛР, за якими можна встановити різницю між різними патоварами виду *P. syringae* (рис. 3.20, 3.21).

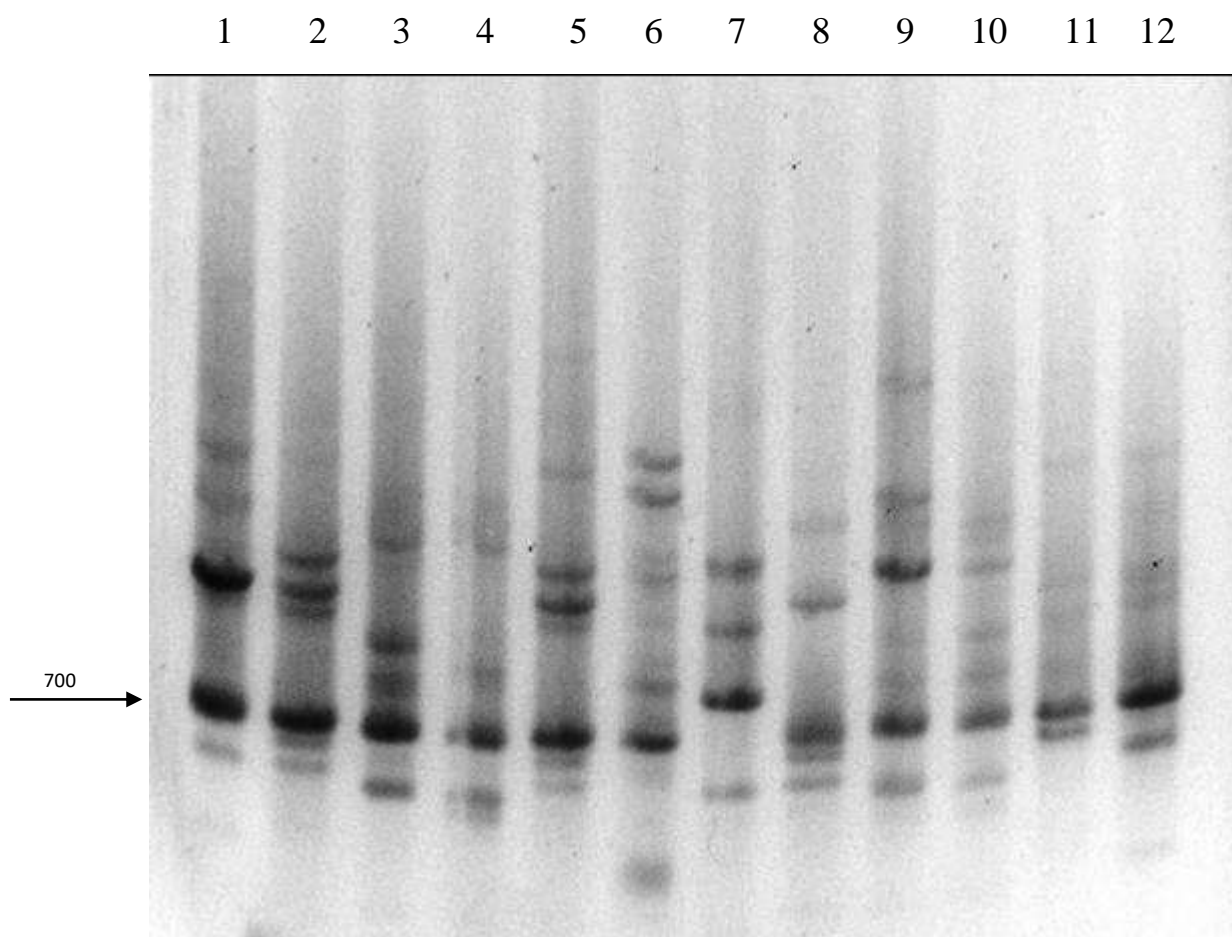


Рис 3.20 Електрофореграма продуктів RAPD-ПЛР патоварів *P. syringae* з використанням праймеру ОРА-13 у 1,5 % агарозному гелі: 1 – *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039; 2 – *P. syringae* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026; 3 – *P. syringae* pv. *aptata* 8544; 4 – *P. syringae* 7922; 5 – *P. syringae* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123; 6 – *P. syringae* pv. *tomato* 140R; 7 – *P. corrugata* 9070; 8 – *P. syringae* pv. *tabaci* 223; 9, 10 – *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027; 11 – *P. syringae* pv. *atropaciens* 8281; 12 – *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154

Відомо, що за морфолого-культуральними, фізіологічними, біохімічними властивостями штами *P. syringae*, які належать до різних патоварів, не відрізняються між собою. За використання методів кластерного аналізу встановлено, що спорідненість між штамами, які належать до одного патовару, є більшою, ніж спорідненість між штамами, що належать до різних патоварів.

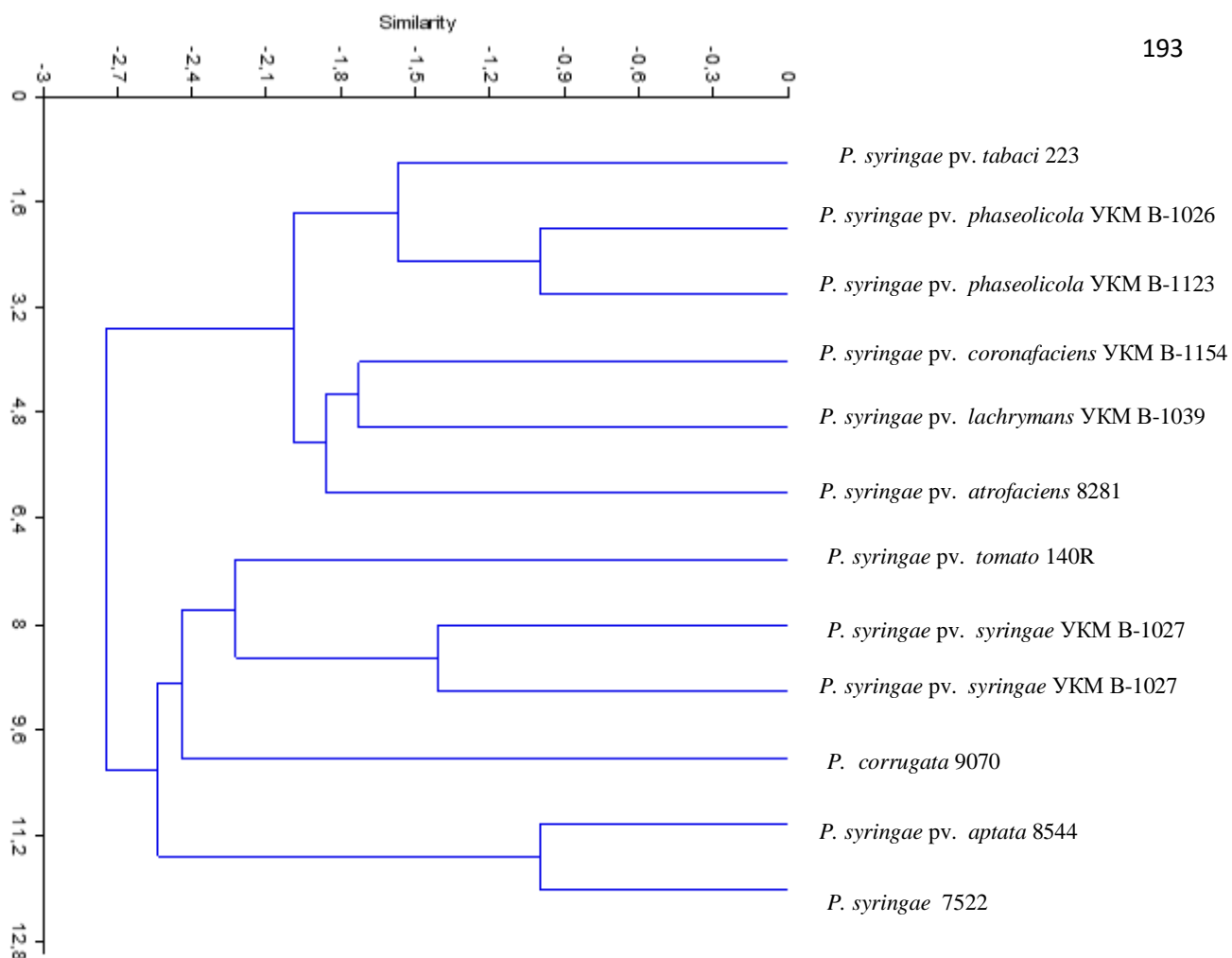


Рис. 3.21 Дендрограма спорідненості патогенів *P. syringae*, побудована за результатами RAPD-профілювання з праймером ОРА-13.

RAPD-ПЛР аналіз успішно використовується для генетично-популяційного аналізу широкого кола мікроорганізмів [428] й, зокрема, для генетичного аналізу фітопатогенних видів *Pseudomonas* [296, 325].

Продукти ампліфікації ДНК штамів, що належать до різних патогенів (*P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. wieringae*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*) з праймером ОРА-13 відрізнялися утворенням більшої кількості продуктів ампліфікації, порівняно з штамми *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Встановлено, що штами всіх патогенів утворюють дві групи. В першу входять переважно збудники хвороб зернобобових культур (*P. syringae*

pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *tabaci*), а в іншу патовари, що є збудниками хвороб овочевих культур (*P. syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. wieringae*, *P. syringae* pv. *syringae*) (рис. 3.21).

Для перевірки відтворюваності результатів RAPD-аналізу штам *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 досліджували у двох незалежних повторностях. На електрофореграмі продуктів RAPD-ПЛР патоварів *P. syringae* з використанням праймеру ОРА-13 ми отримали ідентичні профілі для обох повторностей *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (рис. 3.20). На дендрограмі спорідненості патоварів *P. syringae*, побудованій за результатами цього аналізу, підтверджено ідентичність повторностей профілей продуктів ПЛР з праймером ОРА-13 із ДНК *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (рис. 3.21).

Високий рівень спорідненості (на рівні повторностей одного штаму) встановлено також для двох штамів *P. syringae* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026 і *P. syringae* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123, які є збудниками бактеріозу квасолі, та для двох штамів *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. syringae* 7922, які було ізольовано із уражених бактеріозом рослин буряку. Проте отримані нами дані недостатні для ствердження про наявність генетичної відмінності між цими збудниками і потребують подальшого дослідження.

Отримані нами результати свідчать, що штамми збудника базального бактеріозу, виділені в одинадцяти областях України з рослин жита і пшениці, є близькоспорідненими. Найбільше від усіх штамів відрізнявся штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9443, систематичне положення якого повинно бути переглянute після проведення додаткових досліджень. Серед штамів, що відрізнялися від загальної групи *P. syringae* pv. *atrofaciens*, були три авірулентних (*P. syringae* pv. *atrofaciens* 8317, 8247, 8268) та три вірулентних (*P. syringae* pv. *atrofaciens* 7778, 8122, 8844). Кожен із цих штамів був унікальним і вони не можуть бути об'єднані. Вказані вірулентні штамми за усіма вивченими фенотиповими властивостями беззаперечно належать до *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Отже, на основі RAPD–профілювання з праймером ОРА-13 встановлено, що виділені з різних рослин-хазяїнів в 11 областях України штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що були гетерогенними за серологічними властивостями та агресивністю до рослини-хазяїна, представляють генетично однорідну групу.

3.5.2 RAPD - ПЛР аналіз *Pseudomonas syringae*, виділених з бур'янів в агрофітоценозі пшениці

Для дослідження спорідненості бактерій *P. syringae*, які виділені з бур'янів агрофітоценозу пшениці, було використано штами, ізольовані із маку польового – *P. syringae* L8, L9; ізольовані із осту польового – *P. syringae* L11, L11a, L13, L15, L16, 662г; ізольовані із хвоща польового – *P. syringae* 515в і 516а; березки польової – *P. syringae* 560а і 562; плоскухи звичайної – *P. syringae* 650а і 650б; підмаренника чіпкого – 684б, редьки дикої *P. syringae* 536а, лободи білої *P. syringae* 566б. Характеристику цих штамів наведено в таблиці 3.6.

Як і при постановці RAPD-ПЛР з штамми, які було ізольовано з пшениці, інформативні продукти ПЛР отримали лише за використання праймеру ОРА-13.

Штами *P. syringae* L8, L9, L11, L 11a, L13, L15, L16, 515в, 536а, 560а, 562, 566б, 650в, 684б мали високий ступінь спорідненості з неопатотиповим штамом *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, що є збудником базального бактеріозу пшениці. У цієї групи був спільний домінуючий фрагмент 700 т.п.н. (рис. 3.22, 3.23), наявність якого є також характерною для всіх досліджених нами штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих із пшениці і жита (рис. 3.18).

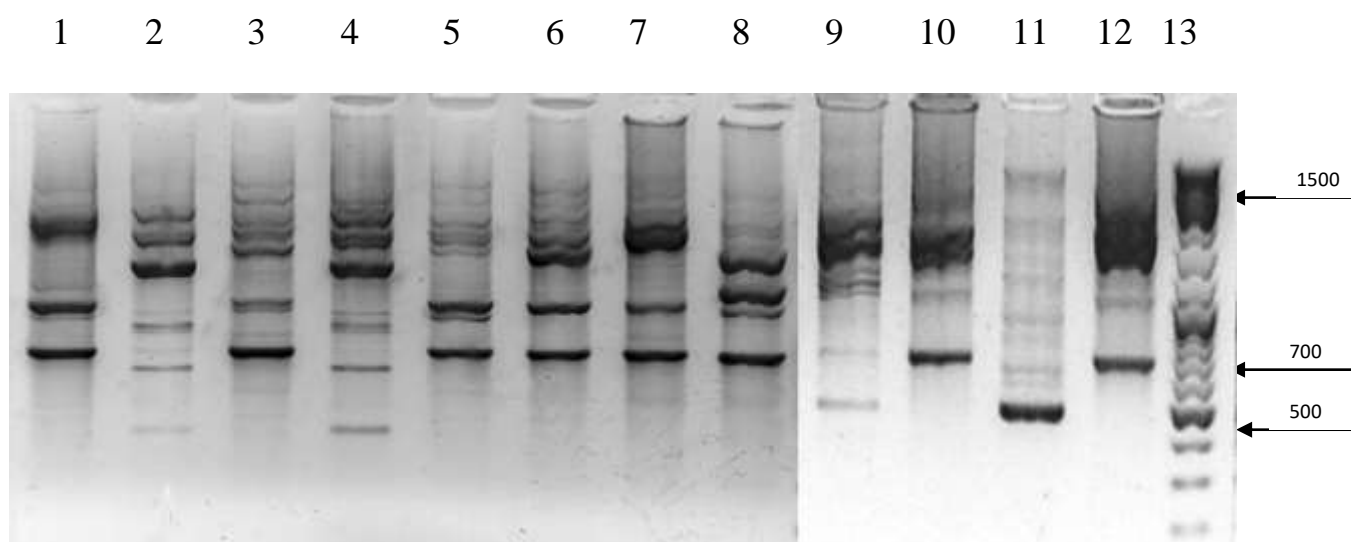


Рис. 3.22 Електрофореграма продуктів ПЛР реакції з використанням праймеру ОРА-13 у 1,5% агарозному гелі: 1 – *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011; 2 – *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027; 3 – *P. syringae* 515В; 4 – *P. syringae* 516а; 5 – *P. syringae* 536а; 6 – *P. syringae* 560а; 7 – *P. syringae* 562; 8 – *P. syringae* 566б; 9 – *P. syringae* 650б; 10 – *P. syringae* 650а; 11 – *P. syringae* 662г; 12 – *P. syringae* 684б; 13 – маркер 100 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas)

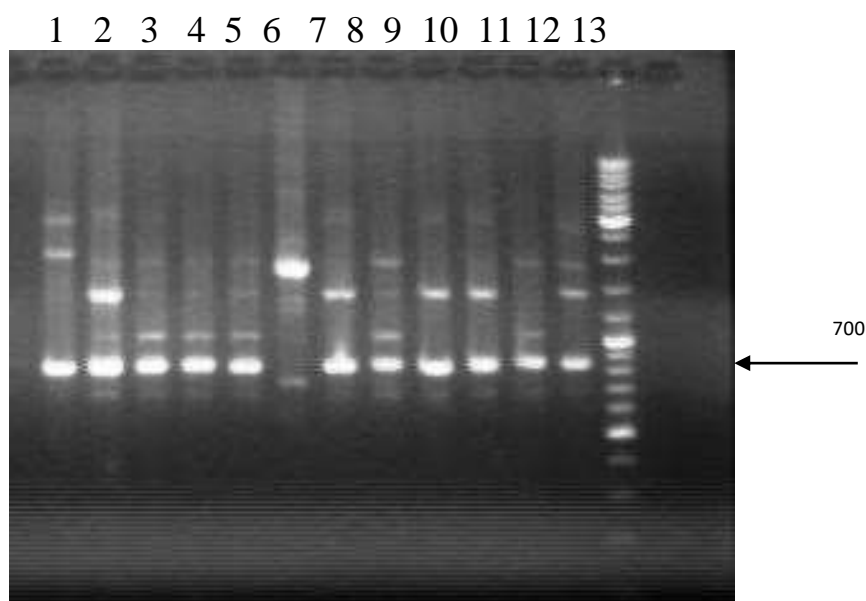


Рис. 3.23 Електрофореграма продуктів ПЛР реакції з використанням праймеру ОРА-13 у 1,5% агарозному гелі: 1 - *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027; 2– *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011; 3 – *P. syringae* L8; 4 – *P. syringae* L9; 5 – *P. syringae* L11; 6 – *P. syringae* L12; 7– *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9785; 8 – *P. syringae* L11а; 9 – *P. syringae* L13; 10 – *P. syringae* L15; 11 – *P. syringae* L16; 12 – *P. syringae* pv. *atrofaciens* 912; 13 - маркер 100 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas).

За використання методів кластерного аналізу на основі отриманих даних було побудовано дендрограму спорідненості між штамми *P. syringae*, які нами виділені із сегетальної рослинності в посівах пшениці, та типовим штамом *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, неопатотиповим штамом *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 та штамми *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9785, 912, які ізолювано із уражених рослин пшениці (рис. 3.24).

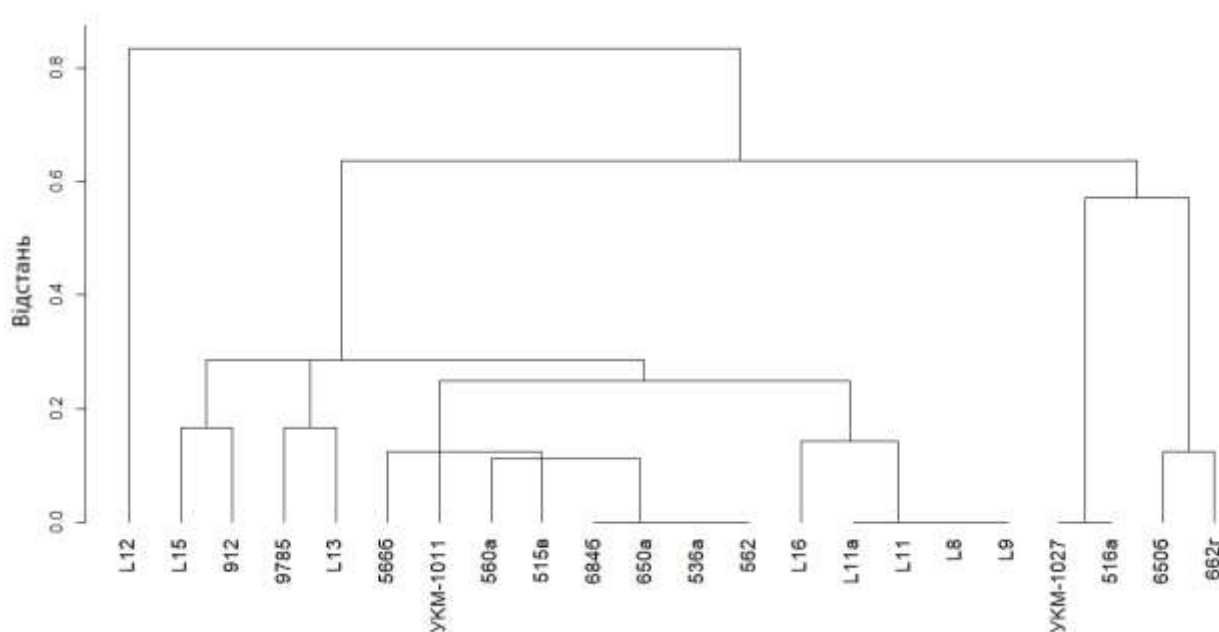


Рис. 3.24 Дендрограма спорідненості штамів *P. syringae*, ізолюваних із бур'янів у посівах пшениці, побудована за результатами RAPD-профілювання з праймером ОРА-13.

Дані кластерного аналізу підтверджують високий ступінь спорідненості штамів *P. syringae* L8, L9, L11, L 11a, L13, L15, L16, 5666, 515a, 6846, 650a, 536a, 562 із штамми УКМ В-1011, 912, 9785 патовару *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що найпоширеніший на зернових культурах.

Таким чином, у результаті RAPD-ПЛР аналізу з праймером ОРА-13 встановлено високий ступінь спорідненості штамів *P. syringae*, які виділені з сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, зі збудником базального

бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens* (рис. 3.24), що є найбільш поширеним на зернових культурах.

Отже, на основі RAPD-ПЛР аналізу можна стверджувати, що популяція *P. syringae* pv. *atrofaciens* є генетично однорідною. А штами *P. syringae* виділені з сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці є близькоспоріднені із збудником базального бактеріозу зернових культур *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

3.6 Білкові профілі штамів *Pseudomonas syringae*, які ізольовано із сегетальної рослинності в агрофітоценозі пшениці

Сучасна ідентифікація бактерій ґрунтується на мультисистемному підході та передбачає вивчення різних ознак мікроорганізму з метою встановлення його таксономічного положення. Одним із методів, що дозволяє достовірно ідентифікувати мікроорганізми, є вивчення білкових профілів цілих клітин бактерій за допомогою ДСН-ПААГ (SDS-PAAG) електрофорезу. Цей метод дозволяє ідентифікувати мікроорганізми з високою точністю на видовому та підвидовому рівнях (патовари, підвиди, серовари та ін.) [286, 340, 435, 523].

Метод ДСН-ПААГ електрофорезу білків цілих клітин бактерій нами було використано для встановлення таксономічного положення штамів *P. syringae*, які було виділено із бур'янів агрофітоценозу пшениці та які мали серологічну та генетичну (на основі RAPD-ПЛР аналізу з праймером ОРА-13) спорідненість із *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Не зважаючи на високий ступінь гомології штамів *P. syringae*, які ізолювали із бур'янів у посівах пшениці, із штамми, які ізолювали із пшениці, за морфолого-культуральними, фізіолого-біохімічними, серологічними ознаками, питання приналежності ізолюваних із бур'янів штамів *P. syringae* до певного патовару цього виду залишається нез'ясованим.

Задля підтвердження можливості застосування методу ДСН-ПААГ електрофорезу білків цілих клітин бактерій для диференціації патоварів *P. syringae* нами було здійснено вивчення білкових профілей штамів, які належать до різних патоварів. Всі досліджувані штами зберігаються в колекції

живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України, їхню характеристику наведено у підрозділі 2.1.

Нами встановлено, що у клітинах бактерій видів *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. corrugata* містяться білки з молекулярною масою від 15 до 100 кДа.

Штами *P. fluorescens* 7769, *P. aeruginosa* 9024, *P. corrugata* 9070, які є представниками близьких до фітопатогенних бактерій *P. syringae* видів, відрізнялися набором білків як між собою, так і від патоварів виду *P. syringae*. Отримані дані підтверджують можливість застосування методу ДСН-ПААГ електрофорезу білків цілих клітин бактерій для диференціації близькоспоріднених видів мікроорганізмів (рис. 3.25).

Штами, що належать до різних патоварів виду *P. syringae*, мають схожі профілі білків зовнішньої мембрани (рис. 3.25).

Штами бактерій, що належать до одного патовару *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1013 та *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1011, мають ідентичні профілі білків зовнішньої мембрани. У штаму *P. syringae* pv. *tomato* 140R відсутній білок з молекулярною масою 44 кДа. Штами *P. syringae* pv. *tabaci* 223 та *P. syringae* pv. *phaseolicola* 9066 мають відмінності у кількості білкових полос в межах 90 – 66 кДа. Тобто, штами які належать до одного патовару мають ідентичні ДСН-ПААГ профілі білків цілих клітин.

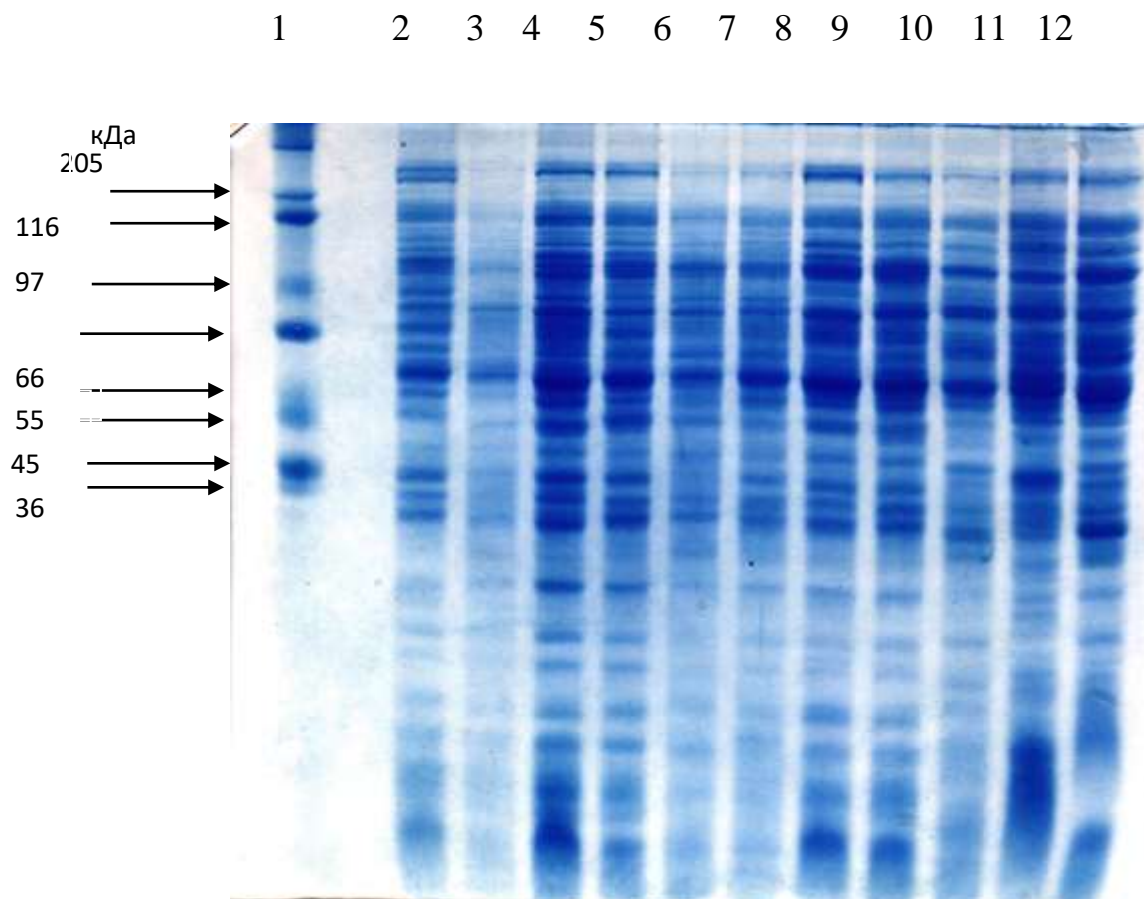


Рис. 3.25 ДСН-ПААГ електрофорез білків цілих клітин бактерій виду *P. syringae* та близьких видів: 1 – маркери молекулярної маси; 2 – *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027; 3 – *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154; 4 – *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013; 5 – *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011; 6 – *P. syringae* pv. *tomato* 140R; 7 – *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039; 8 – *P. syringae* pv. *tabaci* 223; 9 – *P. syringae* pv. *phaseolicola* 9066; 10 – *P. fluorescens* 7769; 11 – *P. aeruginosa* 9024; 12 – *P. corrugata* 9070.

Штами *P. syringae* 684б, 662г, 650а, 560а, 646а, які ізолювано нами із бур'янів в посівах пшениці, мали ідентичні між собою ДСН-ПААГ профілі білків цілих клітин і містили білки з молекулярною масою від 17 до 98 кДа (рис. 3.26). Домінуючими були білки з молекулярною масою 30 кДа та 45 кДа. Окрім ідентичності між собою, ці білкові профілі були подібними до білкових профілів неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 та

штамів збудника базального бактеріозу, ізольованих із уражених рослин пшениці в Україні.

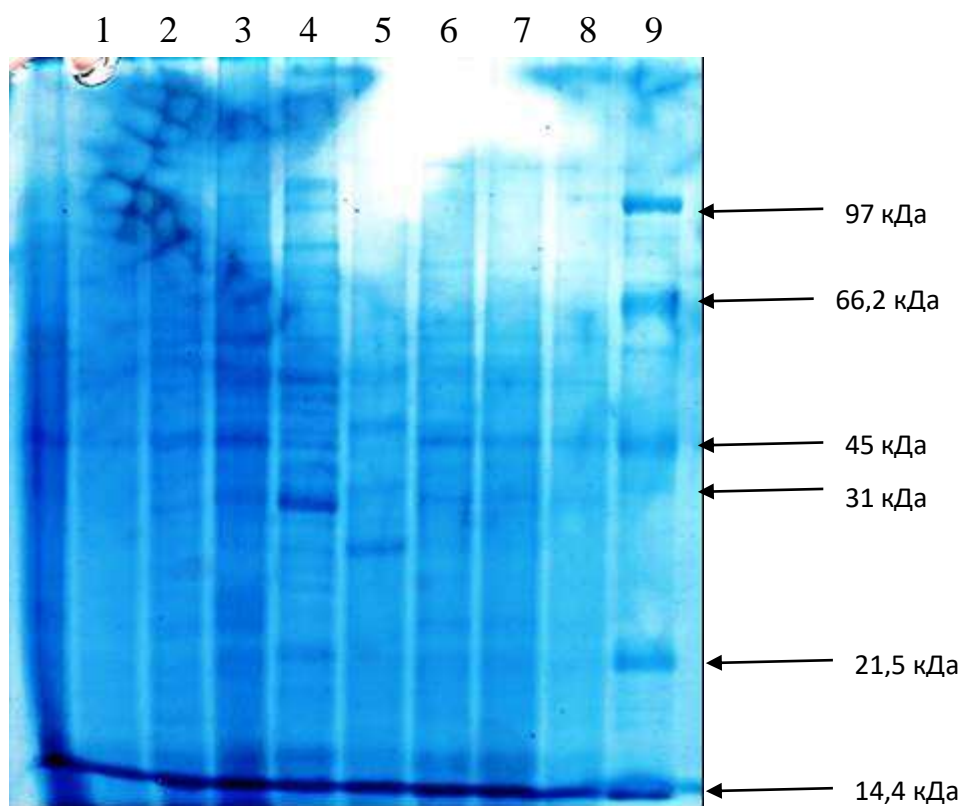


Рис. 3.26 ДСН-ПААГ електрофорез білків цілих клітин штамів *Pseudomonas syringae*, ізольованих із бур'янів у посівах пшениці: 1 – *P. syringae* 684б; 2 – *P. syringae* 662г; 3 – *P. syringae* 650а; 4 – *P. syringae* 562; 5 – *P. syringae* 516а; 6 – *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011; 7 – *P. syringae* 560а; 8 – *P. syringae* 646а; 9 – маркери молекулярної маси

Відмінності від більшості ізольованих із бур'янів штамів у ДСН-ПААГ профілях білків мав штам *P. syringae* 516а, який на основі попереднього RAPD-ПЛР аналізу з праймером ОРА-13 [157] було віднесено до групи високоспорідненої з типовим штамом *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027.

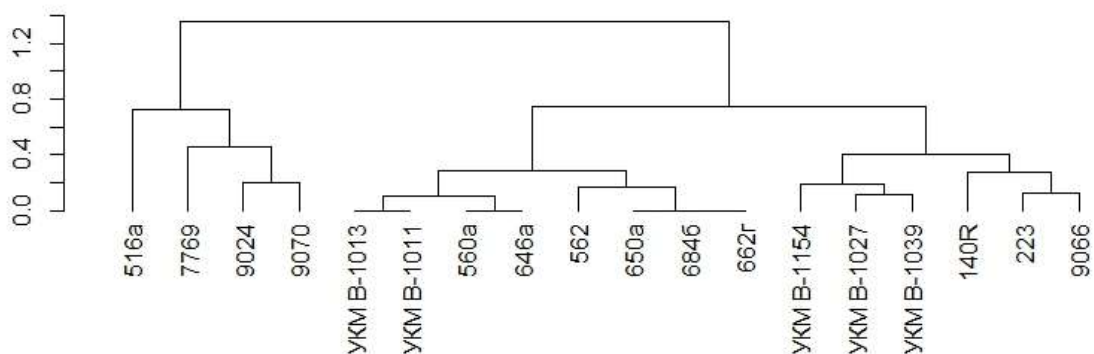


Рис. 3.27 Дендрограма спорідненості штамів *P. syringae*, ізольованих із бур'янів у посівах пшениці, із представниками патоварів цього виду: 516а, 560а, 646а, 562, 650а, 684б, 662г – штамми, ізольовані із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці, 7769 – *P. fluorescens*, 9024 – *P. aeruginosa*, 9070 – *P. corrugata*, УКМ В-1013 – *P. syringae* pv. *atrofaciens*, УКМ В-1011 – *P. syringae* pv. *atrofaciens*, УКМ В-1154 – *P. syringae* pv. *coronafaciens*, УКМ В-1027 – *P. syringae* pv. *syringae*, УКМ В-1039 – *P. syringae* pv. *lachrymans*, 140R – *P. syringae* pv. *tomato*, 223 – *P. syringae* pv. *tabaci*, 9066 – *P. syringae* pv. *phaseolicola*

Узагальнюючи дані серологічних досліджень, RAPD-ПЛР аналізу з праймером ОРА-13 та вивчення ДСН-ПААГ профілів білків можна стверджувати, що штамми, виділені нами із уражених бактеріозами бур'янів агрофітоценозу пшениці, належать до патовару *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Отже, нами вперше встановлено приналежність вірулентних штамів, які спричиняють хвороби бур'янів у агрофітоценозі пшениці, до патовару *P. syringae* pv. *atrofaciens*, який визнано збудником хвороб зернових культур. Це свідчить про те, що збудник базального бактеріозу є поліфагом, який уражує широке коло рослин. Разом із тим, отримані нами результати підтверджують ненадійність такого критерію як «рослина-хазяїн» для встановлення приналежності бактерій виду *P. syringae* до певного патовару і необхідність

розроблення критеріїв для визначення таксономічного статусу патоварів в межах цього виду.

Отримані дані підтверджують статус сегетальної рослинності як резерватора збудників бактеріозів культурних рослин.

Таким чином, *P. syringae* pv. *atrofaciens* є широко розповсюдженим збудником бактеріального ураження пшениці в Україні, який уражує пшеницю як за інтенсивного, так і за органічного способів вирощування цієї культури та може перебувати як епіфіт на рослинах пшениці, що потребує здійснення заходів моніторингу цього патогена. Високоагресивні штами збудника базального бактеріозу було ізольовано в усіх досліджених областях (Київській, Полтавській, Черкаській). Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із вирощуваної за інтенсивної системи землеробства пшениці, належать до трьох серогруп (II, IV, VI). Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із вирощуваної за органічної системи землеробства пшениці, належать до чотирьох серологічних груп (II, IV, V, VI). При аналізі складу жирних кислот ізольованих нами із пшениці штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* та штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які зберігаються в колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАНУ, встановлено подібність якісного складу жирних кислот незалежно від джерела виділення бактерій, наявність важливих для ідентифікації оксизаміщених жирних кислот, що підтверджує їх приналежність до виду *P. syringae*, та відсутність у складі жирних кислот маркерів, які б дозволили розділити штами на групи, приурочені до джерела ізоляції штаму та (або) до патовару. Вперше на основі RAPD-профілювання з праймером ОРА-13 показано, що виділені з різних рослин-хазяїнів в 11 областях України штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які належать до чотирьох серологічних груп і відрізняються за агресивністю до рослини-хазяїна, представляють генетично однорідну групу.

Вперше, із бур'янів, що росли в посівах пшениці, було ізольовано вірулентні для рослини-хазяїна та пшениці бактерії, які серологічно споріднені зі збудником базального бактеріозу зернових культур *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

На основі ґрунтового вивчення їхніх фенотипових і генотипових властивостей їх ідентифіковано як *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

На основі результатів наших досліджень було розроблено поліштамову антисироватку, для створення якої використовують антисироватки до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 (серогрупа II), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупи IV), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V) і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI). Поліштамова антисироватка є ефективною для ідентифікації збудника базального бактеріозу пшениці.

Основні наукові результати розділу опубліковано в працях автора [18, 23, 24, 25, 28, 30, 31, 32, 34, 41, 65, 112, 132, 134, 136, 137, 138, 142, 146, 147, 149, 151, 226, 227, 444, 445].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ПЕСТИЦИДІВ НА *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS*

Фітопатогенні бактерії перебуваючи в агрофітоценозах зазнають впливу всіх чинників (як біотичних, так і абіотичних), які діють в цих екологічних нішах. Серед абіотичних чинників агрофітоценозів одними з найбільш значущих є пестициди, які широко використовують за інтенсивного способу ведення сільського господарства. Відомо, що значна частка пестицидів діє на нецільові організми та має мутагенну активність [50, 110, 150, 261, 294]. Стрес, спричинений абіотичними чинниками і, зокрема, дією пестицидів, індукує морфологічні і фізіологічні зміни в бактеріальних клітинах і фенотипову гетерогенність в популяціях клітин. Вченими інтенсивно досліджується вплив пестицидів на ґрунтові мікроорганізми та бактерії у філосфері рослин [294, 481, 493]. Проте вплив пестицидів на фітопатогенні бактерії як нецільові мікроорганізми залишається мало вивченим [261, 377]. Зокрема, майже не досліджена мутагенна активність пестицидів щодо фітопатогенних бактерій. Тому нами було вивчено вплив пестицидів, які дозволено до застосування в посівах зернових культур за інтенсивної системи землеробства, на фітопатогенні бактерії.

4.1 Антибактеріальна активність пестицидів щодо фітопатогенних бактерій

Враховуючи збільшення в останні роки кількості бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур і, зокрема, зернових культур вивчення впливу пестицидів, що дозволені до використання в Україні, має не лише фундаментальний, а й практичний інтерес. Особливо зважаючи на те, що комерційних препаратів для захисту рослин від бактеріальних хвороб в Україні не зареєстровано.

При вивченні впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії ми, перш за все, дослідили антибактеріальну активність фунгіцидів, які досить часто і не зовсім обґрунтовано використовують у разі виявлення бактеріальних хвороб або хвороб нез'ясованої етіології. Перелік досліджуваних пестицидів наведено в таблиці 2.2. *P. syringae* pv. *atrofaciens* є основним збудником бактеріальних хвороб зернових культур в Україні. Для здійснення досліджень нами було використано штами, які ізольовано нами із пшениці і які є типовими представниками цієї групи фітопатогенних бактерій. Характеристика використаних штамів наведена у підрозділі 2.1 цієї роботи та у попередньому розділі. Для порівняльних досліджень було використано штами бактерій, що належать до різних патоварів виду *Pseudomonas syringae* та інших близьких видів бактерій. Характеристику зазначених бактеріальних культур наведено у підрозділі 2.1. З метою оцінки токсичної дії інших класів пестицидів, що можуть бути використані в посівах зернових культур для контролю шкідників та бур'янів, нами також досліджено токсичний вплив інсектицидів і гербіцидів на фітопатогенні бактерії.

4.1.1 Чутливість штамів збудника базального бактеріозу пшениці до пестицидів

Антибактеріальну активність фунгіцидів було визначено щодо широкого кола штамів збудника базального бактеріозу пшениці, які ізольовано нами в посівах пшениці, та штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які зберігалися тривалий час у колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАНУ та були ізольовані в посівах пшениці упродовж тривалого моніторингу цього збудника. Характеристику ізольованих нами штамів наведено в табл. 3.1 цієї роботи. Вони відрізнялися приналежністю до різних серологічних груп *P. syringae* pv. *atrofaciens* (табл. 3.9, 3.11). Характеристику штамів, які було ізольовано в різних регіонах України впродовж 20 років моніторингу посівів зернових культур, наведено в таблиці 3.19.

Для обробки зернових культур рекомендовані фунгіциди на основі беномілу, тіофанат метилу, флудіоксаонілу. Нами встановлено, що жоден із цих фунгіцидів у рекомендованій до застосування концентрації та у збільшеній у 10 разів концентрації не впливає на штами збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* (табл. 4.1). Тому нами перевірено антибактеріальну активність фунгіцидів, які рекомендовані до використання в посівах інших культур, щодо штамів цього патогену.

Встановлено, що фунгіциди на основі пенконазолу (100 г/л) та дифенконазолу (250 г/л) не виявляють антибактеріальної активності стосовно штамів збудника базального бактеріозу пшениці. Фунгіцид на основі фосетилу алюмінію (800 г/кг) характеризується антибактеріальною дією лише у концентрації, що у 10 разів перевищує рекомендовану до застосування виробником концентрацію. Антибактеріальну активність щодо всіх штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* виявляють препарати, які містять у своєму складі манкоцеб: манкоцеб, 800 г/кг; манкоцеб, 640 г/кг + металаксил, 40 г/кг; пропамокарбу гідрохлорид, 248 г/л + манкоцеб, 301,6 г/л (табл. 4.1). При цьому манкоцеб, 800 г/кг і манкоцеб, 640 г/кг + металаксил, 40 г/кг характеризуються високою антибактеріальною активністю та зупиняють ріст штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* навіть у концентраціях, що є нижчими за рекомендовану до використання. Фунгіцид, що містить як діючу речовину комбінацію пропамокарбу гідрохлорид, 248 г/л + манкоцеб, 301,6 г/л, характеризується антибактеріальною активністю лише у рекомендованій та вищій за рекомендовану концентраціях, що, на нашу думку, обумовлено нижчим вмістом манкоцебу в препараті.

Таблиця 4.1 – Чутливість штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* до препаратів фунгіцидної дії

Препарат, вміст діючої речовини г/кг(л)	Концентрація	Ріст штаму на середовищі з пестицидом	
		Ізольовані нами штамми (9833, 9785, 9771, 9747, 9780, 9858, 9894)	Колекційні штамми, тривалого зберігання (УКМ В-1011, УКМ В-1013, 9400, 9417, 7836, 7194, 912)
Беноміл, 500 г/кг Тіофанат-метил, 700 г/кг Флудіоксоніл, 25г/л Пенконазол, 100 г/л Дифеноконазол, 250 г/л	10*РВ	+	+
	РВ	+	+
Фосетил алюмінію, 800 г/кг	10*РВ	–	–
	РВ	+	+
Манкоцеб, 800 г/кг Манкоцеб, 640 г/кг + металаксил, 40 г/кг Пропамокарбу гідрохлорид, 248 г/л + манкоцеб, 301,6 г/л Гідроокис міді, 770 г/кг	10*РВ	–	–
	РВ	–	–
Контроль		+	+

Примітки: "РВ" – рекомендована виробником концентрація; "10*РВ" – концентрація, що у 10 разів перевищує рекомендовану виробником; "+" – наявність росту бактерій на середовищі з пестицидом (відсутність впливу пестициду на бактерії), "–" – відсутність росту бактерій на середовищі з пестицидом (антибактеріальна дія пестициду).

Здатність пригнічувати ріст фітопатогенних бактерій також притаманна препарату гідроксиду міді, 770 г/кг у рекомендованій та навіть нижчих за рекомендовані концентраціях (табл. 4.1). Необхідно зазначити, що використання препаратів на основі міді, зокрема, сульфату міді, оксихлориду і гідроксиду міді наразі є одним із першочергових заходів для контролю збудників бактеріальних хвороб [186]. Іони міді денатурують білки, тим самим руйнуючи ферменти, які мають вирішальне значення для функціонування клітин бактерій [400]. Однак, мідь знищує клітини патогенів на рослинних

поверхнях, але, як тільки патоген проникає в тканину хазяїна, він більше не є чутливим до обробки мідьвмісними препаратами. Таким чином, препарати міді діють як захисні методи на перших етапах інфікування, але не характеризуються пролонгованою активністю [209].

Нами не було відмічено різниці у чутливості до фунгіцидів у штамів бактерій, що належать до різних серологічних груп. Також не мали відмінностей щодо дії фунгіцидів штами, які було ізольовано в різні роки в різних регіонах України (табл. 4.1).

В сучасній інтенсивній системі землеробства використовують мінеральні добрива, пестициди, регулятори росту рослин тощо. Особливістю пестицидів, що вирізняє їх поміж інших забруднювачів, є неможливість перешкоджання їхньому надходженню в середовище, оскільки вони обов'язково використовуються в сільському господарстві. Масове та багаторазове використання синтетичних пестицидів крім позитивного ефекту, призводить до змін, часто незворотних, мікробних ценозів ґрунту, рослин та створює умови для виживання та інтенсивного розмноження стійких до них форм збудників хвороб [316, 493]. За даними Duke S.O., окрім фунгіцидів, деякі інсектициди та гербіциди є токсичними як для фітопатогенних мікроорганізмів, так і для потенційно корисних [261]. Добре відомо, що мікроміцети – збудники хвороб сільськогосподарських культур за інтенсивного використання фунгіцидів досить швидко набувають стійкості до хімічних препаратів. Крім інтенсивного розмноження стійких до фунгіцидів форм мікроміцетів може спостерігатися також зростання кількості фітопатогенних бактерій, на які фунгіциди не діють. За таких обставин використання фунгіцидів є селективним фактором, який призводить до збільшення кількості та інтенсивності розвитку бактеріальних хвороб.

Зважаючи на можливий контакт фітопатогенних бактерій в агроценозах із усіма класами пестицидів, нами було досліджено вплив інсектицидів та гербіцидів на фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *atropaciens*. Характеристика використаних для досліджень інсектицидів та гербіцидів наведена в табл. 2.2.

Встановлено, що жоден із п'яти досліджених інсектицидів: імідаклоприд, лямбда-цигалотрин, піридабен, альфа-циперметрин, хлорпіринофос-циперметрин, не характеризується антибактеріальною активністю щодо штамів збудника базального бактеріозу пшениці.

Необхідно зазначити, що в рідкому культуральному середовищі препарат альфа-циперметрину у рекомендованій концентрації дещо пригнічував ріст клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Комбінація ж альфа-циперметрину (0,125 г/л) та хлорпірифосу (1,25 г/л), як активної основи препарату, ще більше знижувала кількість клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* в рідкому середовищі. Така різниця може бути обумовлена неможливістю врахування низьких токсичних ефектів інсектицидів щодо фітопатогенних бактерій при візуальному врахуванні результатів за культивування на твердих поживних середовищах.

При вивченні впливу гербіцидів на фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *atrofaciens* нами було встановлено, що більшість препаратів не виявляють токсичної дії щодо збудника базального бактеріозу пшениці (табл. 4.2). Антибактеріальну дію у концентрації, що у 10 разів перевищує рекомендовану до застосування, виявив гербіцид гліфосат калію (500 г/л).

З літератури відомо, що використання гербіцидів на основі гліфосату зменшує мікробну активність ґрунту [492]. Також встановлено, що гербіциди на основі гліфосату інгібують ріст ізолятів кишкових бактерій родів *Pantoea*, *Proteus*, *Shigella* та *Staphylococcus* [345]. Антимікробна активність гліфосату пов'язана із його здатністю блокувати синтез ароматичних амінокислот (шикіматний шлях) і значно знижується на середовищах із достатнім вмістом ароматичних амінокислот [420]. Тому виявлена нами незначна антибактеріальна активність гербіциду на основі гліфосату щодо фітопатогенних бактерії *P. syringae* pv. *atrofaciens* в лабораторних умовах може бути значно вищою в агрофітоценозі.

Таким чином, серед досліджених фунгіцидів лише препарати, які містять манкоцеб, характеризуються високою антибактеріальною активністю і можуть бути використані для контролю збудника базального бактеріозу пшениці.

Більшість досліджених нами фунгіцидів або не мають антибактеріальної дії, або мають достатньо низьку антибактеріальну активність і не можуть бути рекомендовані як засоби контролю збудника базального бактеріозу.

Не мають значної антибактеріальної дії щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens* і досліджені нами інсектициди та гербіциди.

Таблиця 4.2 – Чутливість штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* до препаратів гербіцидної дії

Препарат, вміст діючої речовини г/кг(л)	Концентрація	Ріст штаму на середовищі з пестицидом	
		Ізольовані нами штамми (9833, 9785, 9771, 9747)	Колекційні штамми, тривалого зберігання (УКМ В-1011, УКМ В-1013, 912)
Гліфосат калію, 500 г/л	10*РВ	–	–
	РВ	+	+
S-металохлор, 960 г/л Метрибузин, 700 г/кг Римсульфурон, 250 г/кг Трибенурон-метил, 562,5 г/кг+ трифенсульфурон-метил, 187,5 г/кг	10*РВ	+	+
	РВ	+	+
Контроль		+	+

Зважаючи на отримані нами результати щодо антибактеріальної дії пестицидів на збудники хвороб зернових культур, цікаво було дослідити вплив цих пестицидів і на фітопатогенні бактерії, які уражують інші сільськогосподарські культури.

4.1.2 Дія пестицидів на фітопатогенні бактерії, що спричинюють хвороби інших сільськогосподарських культур

Тестування чутливості широкого кола фітопатогенних бактерій до пестицидів було розпочато із визначення антибактеріальної активності фунгіцидів (табл. 4.3) стосовно різних патоварів бактерій виду *P. syringae*. Було визначено вплив пестицидів на *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 – типовий штам виду; *P. syringae* pv. *aptata* 8544 – збудник чорної плямистості листя буряків; *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 – збудник ореольного бактеріозу вівса; *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039 – збудник кутастої плямистості листків огірка; *P. syringae* pv. *tomato* 140R – збудник бактеріальної крапчастості томатів. Характеристики штамів наведено у розділі 2.1.

Встановлено, що чутливість представників різних патоварів виду *P. syringae* до фунгіцидів є однаковою (табл. 4.3). Фунгіциди беноміл (500 г/кг), тіофанат-метил (700 г/кг), флудіоксоніл (25г/л), пенконазол (100 г/л) та дифеноконазол (250 г/л) не виявляють антибактеріальної активності стосовно штамів патоварів *P. syringae* ні у рекомендованій до застосування, ні у десятиразово збільшеній концентраціях. Фунгіцид фосетил алюмінію (800 г/кг) характеризується антибактеріальною дією щодо всіх штамів патоварів *P. syringae* лише у концентрації, що у 10 разів перевищує рекомендовану до застосування.

Антибактеріальну активність щодо штамів патоварів *P. syringae* виявив манкоцеб (800 г/кг) (табл. 4.3). Оскільки препарати на основі цієї речовини проявляли найвищу антибактеріальну активність у попередніх дослідях препарат на основі манкоцебу (800 г/кг) було також протестовано у нижчій за рекомендовану виробником концентрації. Встановлено, що препарат, який містить як активну речовину манкоцеб (800 г/кг), виявляє антибактеріальну активність навіть у десять разів меншій за рекомендовану концентрацію.

Таблиця 4.3 – Чутливість фітопатогенних бактерій до фунгіцидів

Препарат, вміст діючої речовини г/кг(л)	Концентрація	Ріст штаму на середовищі з пестицидом								
		<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	<i>A. tumefaciens</i>		<i>P. carotovorum</i>	<i>X. vesicatoria</i>
		УКМ В-1027	УКМ В-1154	8544	140R	УКМ В-1039	8628	9052	8982	7605
Беноміл, 500 г/кг Тіофанат-метил, 700 г/кг Флудіоксоніл, 25г/л Пенконазол, 100 г/л Дифеноконазол, 250 г/л	10*РВ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	РВ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фосетил алюмінію, 800 г/кг	10*РВ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РВ	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Манкоцеб, 800 г/кг	10*РВ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РВ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1*РВ	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Контроль		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: "РВ" – рекомендована виробником концентрація; "10*РВ" – концентрація, що у 10 разів перевищує рекомендовану виробником; "+" – наявність росту бактерій на середовищі з пестицидом (відсутність впливу пестициду на бактерії), "-" – відсутність росту бактерій на середовищі з пестицидом (антибактеріальна дія пестициду).

Для тестування антибактеріальної активності фунгіцидів стосовно фітопатогенних бактерій, які належать до інших родів, а саме *Agrobacterium tumefaciens* 8628, 9052 (збудник корончастого галу), *Pectobacterium carotovorum* 8982 (збудник м'яких гнилей), *Xanthomonas vesicatoria* 7605 (збудник чорної бактеріальної плямистості), нами було використано штами, які зберігаються в колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАНУ. Виявлено, що препарати, які містять беноміл (500 г/кг), тіофанат-метил (700 г/кг), флудіоксоніл (25г/л), пенконазол (100 г/л) та дифеноконазол (250 г/л), не мають антибактеріальної активності стосовно всіх досліджених штамів *A. tumefaciens* 8628, 9052, *P. carotovorum* 8982, *X. vesicatoria* 7605 (табл. 4.3). При внесенні цих препаратів у рекомендованій для виробників та у десятиразово збільшеній концентрації середовища, на якому здійснювали культивування бактерій, не спостерігали пригнічення росту бактеріальних культур, за винятком штаму *X. vesicatoria* 7605, у якого виявили пригнічення росту препаратом беноміл (500 г/кг).

Фосетил алюмінію має антибактеріальну дію щодо збудників бактеріозів лише у дозі, що у 10 разів перевищує рекомендовану виробником, за винятком *X. vesicatoria* 7605, відсутність росту якого виявлена і на середовищі з внесенням рекомендованої виробником дози.

Антибактеріальну активність стосовно штамів *A. tumefaciens* 8628 і 9052, *X. vesicatoria* 7605, *P. carotovorum* 8982 проявляє лише фунгіцид із діючою речовиною манкоцеб (800 г/кг) (табл. 4.3). Однак, штами *X. vesicatoria* 7605, *P. carotovorum* 8982 виявилися більш стійкими до манкоцебу (800 г/кг) і десятиразово зменшені концентрації фунгіциду не вплинули на ріст цих штамів фітопатогенних бактерій.

Виходячи з результатів лабораторного вивчення комерційних пестицидів з метою контролю збудників бактеріальних хвороб можуть бути використані препарати, які містять як активну субстанцію манкоцеб.

Препарати, які містять як основну діючу речовину беноміл, флудіоксоніл, пенконазол, дифеноконазол, тіофанат-метил не можуть використовуватися для

захисту рослин від фітопатогенних бактерій, оскільки навіть в лабораторних умовах зовсім не пригнічують ріст збудників бактеріозів.

Отже, серед вивчених препаратів лише незначна частина характеризується достатньою активністю і може бути використана в контролі фітопатогенних бактерій. Тому альтернативою хімічним препаратам у контролі фітопатогенних бактерій можуть стати мікробні препарати. Характеристику досліджуваних мікробіологічних препаратів наведено в розділі 2.

Серед вивчених біологічних препаратів антимікробною активністю характеризувалися препарати на основі *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* та *Pseudomonas aureofaciens* (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Антибактеріальна дія мікробіологічних препаратів для захисту рослин на патоварі *P. syringae*

Штам	Діаметр зон відсутності росту <i>P. syringae</i> за дії препаратів на основі, мм			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aureofaciens</i>	<i>A. chroococcum</i>
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	9,1±3,3	12,0±0,6	8,0±0,4	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	10,8 ±3,4	10,0±0,5	9,0±0,4	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 140R	12,7±2,2	15,6±3,5	13,2±4,2	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> УКМ В-1039	13,8±2,6	12,0±0,7	9,0±0,5	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	11,9±3,2	13,0±0,7	8,0±0,5	0

При цьому всі препарати на основі *B. subtilis*, *P. fluorescens* та *P. aureofaciens* виявили низьку антибактеріальну дію. Мікробні препарати на основі азотфіксувальних бактерій *A. chroococcum* не проявляли активності до патоварів виду *P. syringae*, виділених із овочевих і зернових культур. Нами не було встановлено достовірної різниці у чутливості різних патоварів *P. syringae*

до мікробіологічних препаратів для контролю фітопатогенів. Наявність у комерційних біопрепаратів антибактеріальної активності дають підставу вважати перспективним застосування мікробних препаратів для контролю фітопатогенних бактерій патоварів *P. syringae*. Цю думку підтверджують численні дані літератури [213, 274, 276, 403, 500, 526] щодо антагоністичної активності бактерій роду *Bacillus* стосовно фітопатогенних бактерій. Однак, низький рівень антибактеріальної активності свідчить і про відсутність спрямованого відбору біологічних агентів із антагоністичною дією стосовно до широко розповсюджених патогенів патоварів *P. syringae*. У перспективі необхідно здійснювати цілеспрямований відбір та підвищувати активність бактерій, які можуть бути використані у складі препаратів для контролю збудників бактеріальних хвороб овочевих і зернових культур виду *P. syringae*.

Отже, досліджені фітопатогенні бактерії, які уражують зернові, зернобобові і овочеві культури, переважно нечутливі до широкоживаних в сільському господарстві пестицидів. Однак, з літератури відомо, що значна частка пестицидів характеризується мутагенною активністю щодо різних груп організмів [57, 332, 341], що призводить до багатьох негативних наслідків. Тому наступним етапом роботи стало вивчення мутагенної дії пестицидів, що широко використовуються за інтенсивної технології вирощування зернових культур, на збудника базального бактеріозу пшениці.

4.2 Мутагенна здатність пестицидів

Незважаючи на достатньо широке впровадження в землеробстві України біологічних препаратів, використання пестицидів хімічного походження все ще переважає їх застосування. Відомо, що значна кількість пестицидів проявляють мутагенну активність. Проте така активність стосовно фітопатогенних бактерій є невивченою. Однак, контактуючи з пестицидами у агрофітоценозах фітопатогенні бактерії зазнають їхнього впливу. Проявляючи мутагенні властивості пестициди можуть змінювати фітопатогенні бактерії на

генетичному рівні та бути селективним фактором для відбору найбільш пристосованих форм бактерій. А це дає можливість припустити, що пестициди можуть бути причиною зростання агресивності популяції фітопатогенних бактерій.

Для вивчення мутагенного впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії використали відомий тест Еймса та підхід, який було застосовано для визначення мутагенної дії пестицидів на ґрунтові бактерії [97, 98]. А саме реєстрація кількості мутацій стійкості до антибіотику, що утворюються за дії пестициду.

4.2.1 Мутагенна активність деяких пестицидів в тесті Еймса

При вивченні мутагенної активності пестицидів перш за все звертали увагу на фунгіциди, що використовуються для оброблення рослин в стадії вегетації і насіння зернових культур: беномілу (500 г/кг), тіофанат-метилу (700 г/кг), флудіоксонілу (25г/л). За даними літератури фундазол (беноміл) виявляє мутагенну активність спричинюючи збільшення кількості мутацій у тест-штамів *Salmonella typhimurium* TA98, *S. typhimurium* TA100, *E. coli* WP2 [97] та індукує утворення мікроядер в клітинах кісткового мозку мишей, що свідчить про його кластогенну активність [466]. Тіофанат-метил має мутагенну дію щодо сапротрофних мікроміцетів *Aspergillus nidulans* [337]. У той же час за даними інших дослідників беноміл та його комерційні препарати за тестування у тест-системі з *S. typhimurium* TA100, TA1530, TA1535 і TA1950 з метаболічною активацією і без неї не виявляли мутагенної активності [273].

Нами було встановлено, що фунгіциди беноміл (500 г/кг), тіофанат-метил (700 г/кг) та флудіоксонілу (25г/л) не мають токсичного впливу на тест-штам *S. typhimurium* TA98, що дало можливість вивчити їхню мутагенну дію в тесті Еймса.

Встановлено, що всі три випробувані препарати спричинюють збільшення кількості реверсій у тест-штаму *S. typhimurium* TA98 (табл. 4.5). Найменшою серед досліджених фунгіцидів мутагенною активністю характеризувався

препарат беноміл (500 г/кг). За концентрації 10,0 мг/мл (що у 10 разів більше за рекомендовану виробником) він збільшував кількість His⁺ реверсій тест-штаму *S. typhimurium* TA98 у 1,37 рази. Фунгіцид флудіоксоніл (25 г/л) у 10 разів більший за рекомендовану концентрації (0,5 мг/мл) збільшував кількість His⁺ реверсій *S. typhimurium* TA98 у 4,22 рази, а препарат на основі тіофанат-метилу (700 г/кг) – у 3,03 рази (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Мутагенна дія фунгіцидів на *S. typhimurium* TA98

Досліджуваний фунгіцид	Концентрація пестициду, мг/мл	Кількість His ⁺ реверсій,
		% до спонтанного фону мутацій
Беноміл, 500 г/кг	10,0	137
	1,0	112
	0,1	101
Флудіоксоніл, 25г/л	0,5	422
	0,05	317
	0,005	146
Тіофанат-метил, 700 г/кг	25,0	303
	2,5	221
	0,25	131
Біхромат калію	1,0	895
Спонтанний фон мутацій		100

Примітка. Дані достовірні при $p \leq 0,05$. Застосування як модельного мутагену біхромату калію

За даними літератури мутагенна активність речовини в тесті Еймса вважається встановленою, якщо кількість колоній ревертантів в досліді перевищує кількість ревертантів у контролі для штаму *S. typhimurium* TA98 у 2,0 рази [80]. Таким чином, фунгіциди тіофанат-метил (700 г/кг), флудіоксоніл (25 г/л) виявляють мутагенну активність в тесті Еймса з тест-культурою *S. typhimurium* TA98.

4.2.2 Методологічні аспекти вивчення мутагенної активності пестицидів щодо фітопатогенних бактерій

Для вивчення мутагенного впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії шляхом реєстрації кількості мутацій стійкості до антибіотику, що утворюються за дії пестициду [98], необхідно було визначити чутливість фітопатогенних бактерій агрофітоценозу пшениці до стрептоміцину.

Всі штами *P. syringae* pv. *coronafaciens*, епіфітні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* та типовий штам *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 чутливі до стрептоміцину. Діаметр зон відсутності росту штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* навколо дисків з стрептоміцином (10 мкг, Himedia) становив 25-35 мм

Оскільки штами всіх досліджених нами бактерій, що були ізольовані із агрофітоценозів зернових культур, чутливі до антибіотику стрептоміцину, для вивчення мутагенного впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії нами було обрано метод врахування частоти виникнення у них мутації стійкості саме до цього антибіотику.

За даними літератури по відношенню до стрептоміцину всі мікроорганізми можна умовно поділити на три групи: 1 – дуже чутливі, що можуть бути пригнічені в більшості випадків за концентрації цього антибіотику 10 мкг/мл; 2 – помірно чутливі, пригнічуються за концентрації 10 – 100 мкг/мл; 3 – стійкі форми, для пригнічення яких необхідна концентрація, що перевищує 100 мкг/мл [83]. Фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *atrofaciens* та *P. syringae* pv. *coronafaciens* можуть бути віднесені до першої групи, адже для пригнічення їх росту достатньо концентрації стрептоміцину 1 мкг/мл.

Тому для проведення дослідів з вивчення мутагенної активності стрептоміцин необхідно вносити в поживне середовище у концентрації 1 мкг/мл.

Відомо, що з виникненням стійкості до антибіотику у мікроорганізмів з'являються деякі зміни в характері обміну речовин. Так, у резистентного до стрептоміцину хромогенного мікроорганізму змінюється забарвлення. Стійка до стрептоміцину форма *Pseudomonas aeruginosa* втрачає здатність утворювати

пігмент, змінюється і низка інших ознак [83]. Збільшення частоти утворення стійких до стрептоміцину мутантів у фітопатогенних бактерій може свідчити також про збільшення частоти появи мутацій в інших генах.

4.2.3 Індукція мутацій резистентності до стрептоміцину у *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* за дії пестицидів

Нами встановлено, що фунгіциди беноміл (500 г/кг), тіофанат-метил (700 г/кг) спричинюють збільшення кількості мутацій резистентності до стрептоміцину (Str^R) у *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 порівняно із спонтанною кількістю таких мутацій за внесення їх до поживного середовища у рекомендованій для використання та десятиразово збільшених концентраціях (табл. 4.6).

Таблиця 4.6 – Вплив деяких фунгіцидів на кількість Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011

Досліджуваний фунгіцид	Концентрація, мг/мл	Кількість Str ^R колоній	
		Колоній на чашку	% до контролю
Беноміл, 500 г/кг	10,0	47,3 ± 1,7	274
	1,0	31,0 ± 4,1	179
	0	17,3 ± 4,6	-
Флудіоксоніл, 25г/л	0,5	13,3 ± 1,7	182
	0,05	13,0 ± 3,4	178
	0	7,3 ± 0,6	-
Тіофанат-метил, 700 г/кг	25,0	45,0 ± 1,1	281
	2,5	38,0 ± 1,1	237
	0	16,0 ± 2,3	-

Примітка. Дані достовірні при $p \leq 0,05$. Модельний мутаген N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ) в концентрації 10 мкг/мл збільшував кількість Str^R мутантів *P. syringae* у 15 разів.

Найбільшою мутагенною активністю щодо фітопатогенних бактерій характеризувався тіофанат-метил (700 г/кг), який у рекомендованій дозі (2,5 мг/мл) сприяв збільшенню Str^R мутацій у 2,37 рази, а у 10 разово збільшеній дозі – у 2,84 рази (табл. 4.6).

Фунгіцид на основі беномілу (500 г/кг) у рекомендованій дозі (1,0 мг/мл) зумовлював збільшення кількості мутацій стійкості до антибіотику у *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 у 1,79 рази, у дозі 10,0 мг/мл – у 2,74 рази (табл. 4.6).

Хоча у тесті Еймса найбільшу мутагенну активність виявив препарат, що містить флудіоксоніл (25 г/л), він характеризувався найменшою серед вивчених препаратів активністю щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. У дозі 0,05мг/мл цей препарат спричинював збільшення кількості мутацій стійкості до стрептоміцину у 1,78 рази, а у дозі 0,5 мг/мл – у 1,82 рази (табл. 4.6).

Отже, нами вперше встановлено, що фунгіциди беноміл (500 г/кг), тіофанат-метил (700 г/кг), флудіоксоніл (25 г/л), які використовуються для оброблення зернових культур, не пригнічують розвиток збудників бактеріальних хвороб цих культур, але проявляють щодо них слабку мутагенну дію.

Слід відмітити, що мутагенна активність цих пестицидів є надзвичайно небезпечним екологічним фактором, що може призводити до появи патогенів із збільшеною агресивністю та пристосованістю до умов агрофітоценозу, стимулювати зростання чисельності популяції високоагресивних патогенів. Мутагенну активність пестицидів необхідно враховувати при розробленні норм їхнього застосування, а при їх практичному використанні не перевищувати рекомендованих доз.

При дослідженні мутагенного впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії необхідно приділяти увагу усім класам пестицидів, що використовуються в агрофітоценозах. Тому нами було вивчено мутагенну дію інсектициду на основі альфа-циперметрину (100г/л) та гербіциду, діючою

речовиною якого є комбінація двох сполук трибенурон-метилу (562,5 г/кг) та трифенсульфурон-метилу (187,5 г/кг).

Альфа-циперметрин один із найбільш вживаних піретроїдних інсектицидів, який має токсичні властивості [239]. Як і всі піретроїди він проникає крізь покриви та порушує функціонування нервової системи комахи, спричинюючи параліч та загибель. Циперметрин здатний тривалий час зберігатися на поверхні рослин та призводити до зміни мікробіому філосфери [557].

За даними літератури піретроїди: ресметрин, перметрин та фенвалерат, не мають мутагенної активності щодо тест-штамів *S. typhimurium* TA1535, TA100, TA1538, TA98, TA1537, TA97 та TA104 за наявності або відсутності системи метаболічної активації [312]. Інший піретроїд – алетрин був мутагенним для штамів *S. typhimurium* TA100, TA104 та TA97 за метаболічної активації [312]. Разом з тим показано, що циперметрин має мутагенну активність, викликаючи домінуючі летальні мутації у чоловічих статевих клітинах мишей. На можливу мутагенність циперметрину в тестах із клітинами кісткового мозку мишей вказують й інші дослідження [426].

Дані щодо мутагенної (генотоксичної) дії трибенурон-метилу та трифенсульфурон-метилу відсутні в доступній літературі. Однак, дані літератури свідчать про негативний вплив гербіцидів на основі трибенурон-метилу та трифенсульфурон-метилу на мікробіом ґрунту [218]. Так препарат Granstar® 75 DF, який містить 75% трибенурон-метилу, зменшував чисельність і різноманітність видів *Actinobacteria* у ґрунтах сільськогосподарських угідь [436]. Трифенсульфурон-метил був токсичним для генетично різних флуоресцентних штамів *Pseudomonas*, які виділено із сільськогосподарського ґрунту [218]. Ефекти гербіцидів групи сульфонілсечовини, що зменшують ріст бактерій, були викликані пригніченням ферменту ацетолацетатсинтази. Цей фермент бере участь у синтезі розгалужених амінокислот валіну, лейцину та ізoleyцину. Продемонстровано, що токсичні ефекти гербіцидів

сульфонілсечовини можуть бути нейтралізовані, коли штами вирощують у присутності надлишкової кількості трьох амінокислот [218].

Мутагенну активність інсектициду альфа-циперметрин та гербіциду трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил визначали стосовно штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417, які було ізольовано в агрофітоценозі пшениці. Штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 належить до серогрупи II і є високоагресивним для пшениці, а штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 належить серогрупи IV і є авірулентним для пшениці.

Нами встановлено, що інсектицид альфа-циперметрин достовірно не збільшував кількість Str^R мутантів як *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, так *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 (табл. 4.7). Кількість спонтанних Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 становила $1,7 \pm 0,6$ на чашку, за додавання альфа-циперметрину кількість Str^R мутацій цього штаму становила $2,3 \pm 0,6$ на чашку.

Кількість спонтанних Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 становила $3,3 \pm 0,5$ на чашку, за додавання інсектициду альфа-циперметрину кількість Str^R мутацій цього штаму становила $6,0 \pm 2,5$ на чашку (табл. 4.7). За статистичної обробки експериментальних даних встановлено, що така різниця не є статистично значущою.

Отже, інсектицид альфа-циперметрин не збільшував кількість Str^R мутацій у обох штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Гербіцид трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил за дії на штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 збільшував кількість Str^R мутацій у 6,47, а штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 – у 4,74 рази (табл. 4.7). Встановлене збільшення кількості Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens* було статистично значущим.

Отже, нами вперше встановлено, що гербіцид трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил та фунгіциди беноміл, тіофанат-метил, флудіоксоніл спричинюють збільшення кількості Str^R мутацій у збудника базального бактеріозу пшениці. Інсектицид альфа-циперметрин не збільшував кількість Str^R мутацій у обох штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Таблиця 4.7 – Вплив пестицидів альфа-циперметрину та трибенурон-метилу+трифенсульфурон-метилу на кількість Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Штам	Досліджуваний пестицид	Кількість Str ^R колоній	
		Колоній на чашку	% до контролю
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	альфа-циперметрин (100г/л)	2,3±0,6	137
	трибенурон-метил (562,5 г/кг)+трифенсульфурон-метил (187,5 г/кг)	11,0±0,9	647
	контроль	1,7±0,6	100
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9417	альфа-циперметрин (100г/л)	6,0±2,5	181
	трибенурон-метил (562,5 г/кг)+трифенсульфурон-метил (187,5 г/кг)	15,7±1,5	474
	контроль	3,3±0,5	100

Примітка. Дані достовірні при $p \leq 0,05$. Модельний мутаген N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ) в концентрації 10 мкг/мл збільшував кількість Str^R мутантів *P. syringae* у 15 разів.

4.3 Морфологічна дисоціація *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* за дії пестицидів

Пестициди це ксенобіотики, що є основним абіотичним стресовим фактором в агроценозах. Адаптація до існування в умовах такого абіотичного стресу передбачає зміну певних властивостей мікроорганізмів. Пристосувальні реакції до дії пестицидів виявляються в різноманітній корекції біохімічних та

фізіологічних процесів, що, відповідно, забезпечує їх подальше існування за умов абіотичного стресу [72, 490].

Одним із варіантів адаптаційних змін бактерій є морфологічна дисоціація клітин і колоній, зумовлена перебудовою поверхневих структур клітин [123]. Для фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* притаманна природна мінливість популяції з розщепленням на різні морфотипи [127, 175]. Тому подальші дослідження було зосереджено на вивченні морфологічної дисоціації збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens* за дії пестицидів.

Вважають, що морфологічна дисоціація бактерій складається з процесів: виникнення дисоціантів в результаті зміни генетичних властивостей клітини і селекція утворених варіантів під впливом зовнішніх факторів. Виникнення нових генотипів відбувається на основі спонтанних мутацій, переносом генетичного матеріалу і перебудові геному всередині однієї клітини [124].

Після культивування штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* з інсектицидом альфа-циперметрин спостерігали ріст на агаризованому середовищі колоній бактерій двох видів: типової S-форми (гладкі, блискучі, з припіднятим центром і рівними чи слабо хвилястими краями) та видозміненої R-форми колоній (шорсткі, матові, плоскіші та більші, з нерівними краями) (рис. 4.1, 4.2).

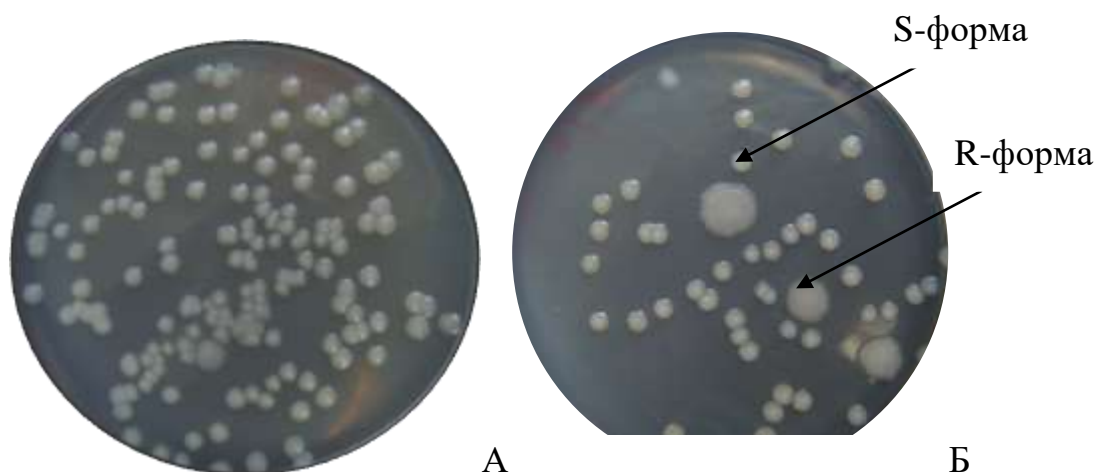


Рис. 4.1 Колонії *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на картопляному агарі: А – вихідний штам; Б – S- та R-форми після дії інсектициду альфа-циперметрину

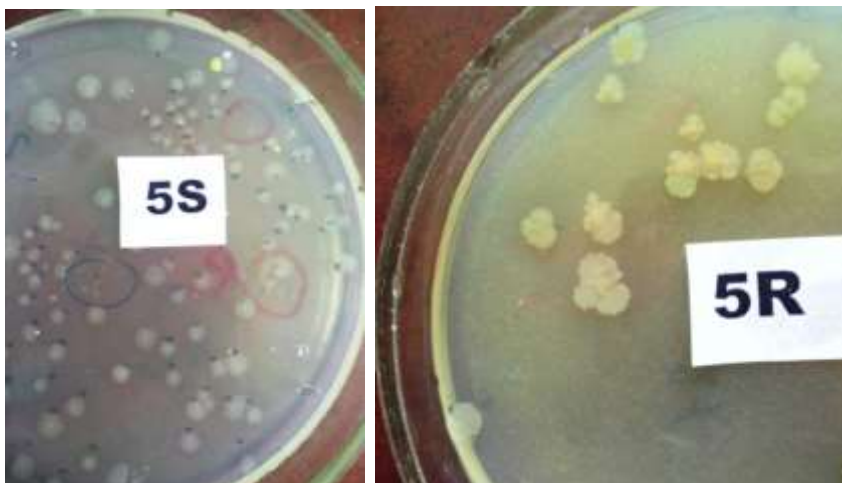


Рис. 4.2 Колонії *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на картопляному агарі: А – вихідний штам; Б – S- та R-форми після дії інсектициду альфа-циперметрину

Для *P. syringae* pv. *atrofaciens* частота спонтанної морфологічної дисоціації не перевищувала 10^{-3} , що є характерним для бактерій цього виду. Після обробки клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* альфа-циперметрином спостерігали значне у 10 – 100 разів підвищення частоти морфологічної дисоціації (табл. 4.8).

Таблиця 4.8 – Морфологічна дисоціація *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* за дії інсектициду альфа-циперметрину

Показник	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011		<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400		<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9417	
	альфа-циперметрин	конт-роль	альфа-циперметрин	конт-роль	альфа-циперметрин	конт-роль
Частота утворення R-форм	5×10^{-2}	5×10^{-3}	2×10^{-2}	1×10^{-3}	2×10^{-1}	5×10^{-3}
Час появи R-форм (години культивування)	8	24	24	48	24	48

Частота утворення R-форм залежала від штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Так, для штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 частота утворення R-форм становила 5×10^{-2} , для *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 – 2×10^{-2} . Штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 виявився найбільш чутливим до досліджуваного інсектициду – частота утворення R-форм становила 2×10^{-1} (табл. 4.8). До того ж появу індукованих інсектицидом R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* спостерігали вже на початкових та ранніх стаціонарних стадіях культивування бактерій, спонтанні ж R-форми з'являлися у пізній стаціонарній та фазі відмирання.

Частота спонтанної морфологічної дисоціації *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 під впливом гербіциду трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метил значно зростала до 5×10^{-1} (табл. 4.9). Час появи R-форм за додавання трибенурон-метил+трифенсульфурон-метилу також відрізнявся від контрольного. Спонтанні R-форми з'являлися після 24-ї години культивування. Появу R-форм на середовищі з гербіцидом трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил реєстрували з 12-ї години культивування (табл. 4.9).

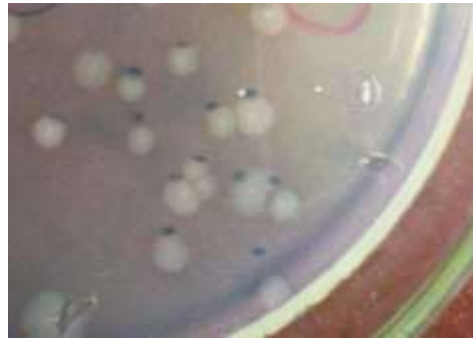
Таблиця 4.9 – Морфолого-культуральна дисоціація *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* за дії гербіциду трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил

Показник	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	
	трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метил	контроль
Частота утворення R-форм	5×10^{-1}	5×10^{-3}
Час появи R-форм (години культивування)	12	24
Реверсії від R до S-форм (№ пасажу)	Не відбувалися	3 – 4

Важливо зазначити, що у випадку утворення спонтанних R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 спостерігали їх реверсії до вихідної S-форми після 3 – 4 пасажів на картопляному агарі (табл. 4.9). Однак, реверсій до S-форми не спостерігали у індукованих трибенурон-метил+трифенсульфурон-метилом R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (рис. 4.3).



R-форма



вихідна S-форма

Рис. 4.3 Стійка R-форма *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, індукована трибенурон-метил+трифенсульфурон-метилом

Отже, нами встановлено, що інсектицид альфа-циперметрин та гербіцид трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил збільшують у 10 – 100 разів частоту морфологічної дисоціації збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

4.3.1 Біологічні властивості R-форм *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Відомо, що морфологічна дисоціація призводить не лише до зміни зовнішнього виду колоній бактерій, а й до зміни їхніх фізіолого-біохімічних властивостей, може впливати на їхню здатність виживати у довкіллі, колонізувати різні поверхні, змінювати вірулентні властивості [124, 233, 497].

При вивченні біологічних властивостей морфологічних дисоціантів нами встановлено, що всі R-дисоціанти за фізіолого-біохімічними властивостями не відрізнялися між собою і мали незначні відмінності від вихідної S-форми

P. syringae pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (табл. 4.10). Вони були оксидазонегативними, використовували як єдине джерело живлення глюкозу, фруктозу, арабінозу, інозит, дульцит і не споживали глюкозу анаеробно, лактозу і саліцин (табл. 4.10).

Таблиця 4.10 – Фізіолого-біохімічні властивості S- та R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011

Тести	S- форма	R-форма		
		Спонтанна	Індукована альфа-циперметрином R-форма	Індукована трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метилом
Фарбування за Грамом	–	–	–	–
Оксидаза	–	–	–	–
Характеристика росту на МПБ	Рівномірне помутніння	Плівка, осад	Плівка, осад	Плівка, осад
Ферментація:				
Глюкози, фруктози, арабінози, дульциту, інозиту	+	+	+	+
Глюкози (анаеробно), лактози, саліцину	–	–	–	–
Реакція мікроаглютинації із антисироваткою у розведенні:				
1:10	+	+	+	+
1:20	+	+	-	-

Примітка. - - ознака негативна, + - ознака позитивна

Різницю біохімічних властивостей між дисоціантами виявляли лише у швидкості ферментації субстрату. Так фруктозу швидше споживали ізоляти з S-

формою колоній, тоді як інозит – R-дисоціанти. У МПБ S-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 давали гомогенний ріст, а спонтанна, індукована альфа-циперметрином та індукована трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метилом R- форма цього штаму утворювали плівку і осад. Тобто, R-форма *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на відміну від S-форми цього штаму здатна формувати біоплівку на межі розділу фаз повітря – рідина. Такі відмінності у характері росту в бульйоні можуть бути зумовлені вищим вмістом ліпідів, а отже, більшою гідрофобністю R-морфотипу [497].

Всі R-дисоціанти *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 взаємодіяли із штамоспецифічною антисироваткою в реакції мікроаглютинації на склі (табл. 4.10). Однак, у випадку індукованих пестицидами R-форм, аглютинація відбувалася лише із антисироваткою в розведенні 1:10, що може бути пов'язано зі змінами в структурі O-антигена.

Як відмічають дослідники, явище дисоціації – це фенотипові прояви генетичних змін, що можуть зачіпати як ліпополісахаридні, так і білкові структури поверхневого апарату клітини [124, 166]. Однак, за даними ДСН-ПААГ електрофорезу білків цілих клітин вихідна S- форма штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, спонтанна R- форма цього штаму, індукована альфа-циперметрином R-форма та індукована трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метилом R-форма *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 мають ідентичні профілі білків зовнішньої мембрани (рис. 4.4).

Таким чином, нами встановлено, що морфологічні S- та R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 не відрізняються за фізіолого-біохімічними властивостями та не мають різниці у білкових профілях.

Слід зазначити, що нетиповість R-форми часто призводить до ускладнень при діагностиці базального бактеріозу, адже шорсткі колонії з нерівномірним краєм не враховуються як *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Вірулентні властивості фітопатогенних бактерій *P. syringae* корелюють із їх здатністю індукувати реакцію надчутливості на листках тютюну (РНЧ). Тому для перевірки збереження вірулентних властивостей у досліджуваних R-форм

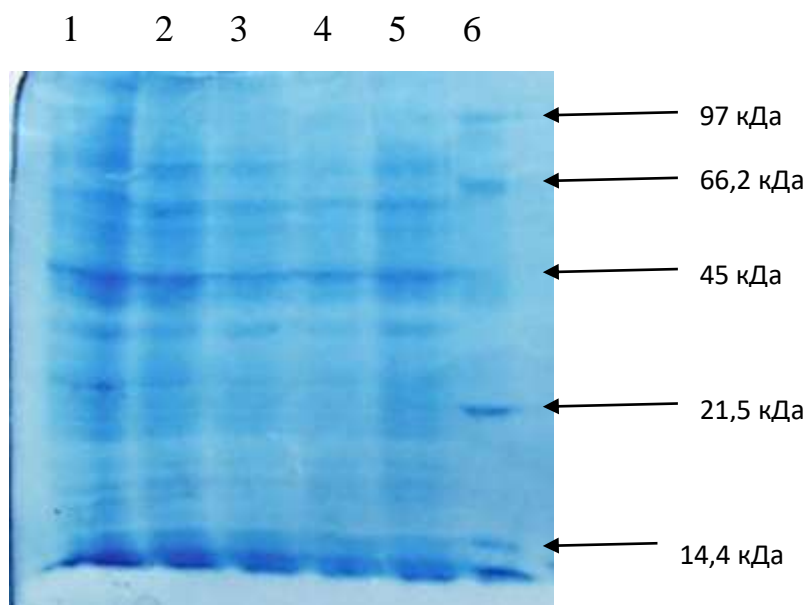


Рис. 4.4 ДСН-ПААГ електрофорез білків цілих клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011: 1 – вихідна S- форма штаму, 2 – спонтанна R- форма штаму, 3 – індукована альфа-циперметрином R-форма, 4, 5 – індукована трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метилом R-форма, 6 – маркер молекулярної маси

P. syringae pv. *atrofaciens* перевіряли їх здатність індукувати РНЧ та спричинювати симптоми ураження за штучної інокуляції пшениці. Встановлено, що як вихідна S- форма штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, так і спонтанна та індуковані пестицидами R- форми цього штаму індукують РНЧ на листках тютюну (рис. 4.5, 4.6).

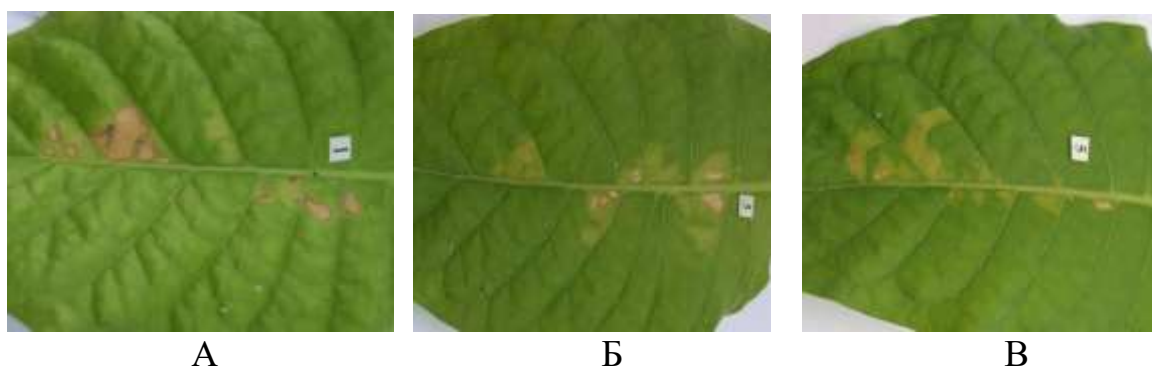


Рис. 4.5 Реакція надчутливості, спричинена S-формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (А), спонтанною R-формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (Б) та індукованою альфа-циперметрином R-формою (В)



Рис. 4.6 Реакція надчутливості, індукована S-формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (52), спонтанною R-формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (51) та індукованою трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метилом R-формою (41)

За штучної інокуляції рослин пшениці сорту Печерянка S- та R- формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 виявляли однаковий розвиток симптомів бактеріозу (рис. 4.7).



Рис. 4.7 Симптоми ураження на пшениці сорту Печерянка за штучної інокуляції S- та R- формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011

Таким чином, нами встановлено, що R- форми не втрачають вірулентних властивостей, які притаманні вихідній S- формі *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Для оцінки здатності R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* виживати в навколишньому середовищі дослідили їхню здатність рости за дії стресових факторів, якими для бактерій цього виду є дія високих (40°C) і низьких (6°C) температур та високої концентрації хлориду натрію (4%). Такі абіотичні стресові чинники є типовими для сучасних агроценозів. Встановлено, що спонтанна та індукована пестицидами R- форми штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 краще, ніж вихідна S- форма цього штаму, ростуть при температурі 40°C. Концентрація клітин R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 через 48 год культивування була у 10 разів вища, ніж S-форми (табл. 4.11). Не було виявлено достовірної різниці у здатності S- та R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 рости при температурі 6°C та за концентрації NaCl 4% (табл. 4.11).

Таблиця 4.11 – Ріст S- та R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 за різних умов культивування

Умови культивування	Концентрація клітин <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011 через 48 год культивування, КУО/мл		
	S-форма	Спонтанна R-форма	Індукована альфа-циперметрином R-форма
Ріст при температурі 40°C	3×10^5	27×10^5	25×10^5
Ріст при температурі 6°C	13×10^7	11×10^7	12×10^7
Ріст за концентрації NaCl 4%	15×10^6	11×10^6	28×10^6

Успішна колонізація поверхні рослини є необхідною умовою для виживання фітопатогенних бактерій та визначає можливість індукції ними

патологічного процесу. Утворення біоплівки розглядається як одна із стратегій колонізації бактеріями *P. syringae* рослин [405, 507].

З літератури відомо, що S- та R- форми бактерій можуть значно відрізнятися за здатністю формувати біоплівки на різних поверхнях [292, 2008] та здатністю до адгезії, як першого етапу формування біоплівки [233].

Нами встановлено, що спонтанна й індукована R- форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* краще формують біоплівку порівняно з S-формою цього штаму. Так, маса біоплівки індукованої альфа-циперметрином R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 була у 2,3 рази, а спонтанної R-форма *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 – у 3,6 рази більшою порівняно з масою біоплівки, сформованою S-формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (табл. 4.12). Маса біоплівки R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 була у 2,3 рази більша за масу біоплівки S-форми цього штаму.

Таблиця 4.12 – Накопичення біомаси у планктонній культурі та біоплівці S- і R- формами *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011

Досліджувана культура	Накопичення біомаси у планктоні, E ₅₄₀	Біомаса біоплівки, E ₅₉₂
S-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,65±0,03	0,32±0,04
Спонтанна R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,58±0,02	1,17±0,19
Індукована інсектицидом R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,55±0,01	0,75±0,04
Індукована гербіцидом R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,50±0,01	0,55±0,04
S-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	0,68±0,02	0,42±0,07
Спонтанна R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	0,56±0,01	0,97±0,03

Таким чином, встановлено, що альфа-циперметрин та трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил характеризуються низькою токсичністю щодо фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які є збудником базального бактеріозу пшениці, але за їхньої дії значно збільшується частота морфологічної дисоціації у *P. syringae* pv. *atrofaciens*. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівки та активніше ростуть при температурі 40°C за збереження вірулентності. На нашу думку, це може призводити до формування більш агресивних популяцій цього збудника в природі.

Результати досліджень свідчать, що синтетичні пестициди альфа-циперметрин, трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил сприяють дисоціації *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, чим посилюють гетерогенність популяції, що розширює межі витривалості виду. Тобто, R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 утворюються у відповідь на присутність ксенобіотиків у середовищі і є універсальним адаптаційним механізмом, зумовленим перебудовою поверхневого апарату клітин.

Отже, серед дослідженого широкого набору пестицидів переважна більшість препаратів не мають антибактеріальної активності стосовно фітопатогенних бактерій. Лише препарати, які містять манкоцеб, характеризуються високою антибактеріальною активністю і можуть бути використані як для контролю збудника базального бактеріозу пшениці, так і для контролю фітопатогенних бактерій *A. tumefaciens*, *P. carotovorum*, *X. vesicatoria*, які уражують зернобобові і овочеві культури.

Нами вперше встановлено, що беноміл, тіофанат-метил, флудіоксоніл і трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил спричинюють збільшення кількості Str^R мутацій у збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Інсектицид альфа-циперметрин не збільшував кількість Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Встановлено, що альфа-циперметрин та трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил збільшують у 10 – 100 разів частоту морфологічної дисоціації збудника базального бактеріозу пшениці

P. syringae pv. *atrofaciens*, чим посилюють гетерогенність популяції, що розширює межі виживання цього виду. Індуковані морфологічні R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* не відрізняються від S-форм цього виду бактерій за фізіолого-біохімічними, серологічними, вірулентними властивостями та не мають різниці у білкових профілях. Однак характеризуються кращим ростом при температурі 40°C та підвищеною здатністю до формування біоплівки.

Основні наукові результати розділу опубліковано в працях автора [9, 10, 12, 13, 14, 19, 27, 29, 32, 36, 40, 42, 43, 54, 55, 56, 76, 106, 148, 155, 224, 349, 442].

РОЗДІЛ 5

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Ліпополісахариди (ЛПС) грамнегативних фітопатогенних бактерій є одними із важливих чинників у взаємодії бактерій і рослин [49, 260, 414]. Вони значно впливають на перебіг фізіолого-біохімічних процесів в тканинах і клітинах рослин. Дослідженню їхньої біологічної активності приділяють багато уваги, проте і сьогодні залишаються нез'ясованими всі аспекти їх дії на рослини. Тому вивчення активності ЛПС не втрачає своєї актуальності.

5.1 Хімічний склад ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae*

На відміну від більшості грамнегативних бактерій *P. syringae* характеризуються доволі слабким закріпленням ЛПС у зовнішній мембрані і може бути екстрагований розчином хлориду натрію [48, 90]. Отримані таким шляхом ЛПС зберігають свою біологічну активність, що є важливим для подальшого вивчення біологічних властивостей ЛПС [90, 173].

Для здійснення досліджень ми отримали методом екстрагування розчином хлориду натрію ЛПС чотирьох штамів *P. syringae* pv. *atropaciens*: патотипового штаму УКМ В-1011 та штамів 9780, 9400, 9417, які було ізольовано нами із пшениці. Відібрані для дослідження штами є найбільш типовими представниками цього виду бактерій, що ізолювали із агрофітоценозу пшениці. Також, для проведення порівняльних досліджень, ми отримали ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та ЛПС штамів, які належать до патоварів, що уражують незернові культури (цукрові буряки): *P. syringae* pv. *aptata* 8544; *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922. Характеристику всіх вказаних штамів наведено в розділі 2. Хімічний склад всіх отриманих нами ЛПС представлено в табл. 5.1.

З метою визначення впливу методу отримання та хімічного складу ЛПС на його біологічну активність ЛПС штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027

було отримано класичним методом виділення ЛПС – водно-фенольною екстракцією [46]. Хімічну характеристику цього препарату ЛПС так само наведено в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Хімічний склад ліпополісахаридів *P. syringae*

№	ЛПС штаму	Вміст, %			
		вуглеводи	білки	нуклеїнові кислоти	КДО
1	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	31,8±1,27	20,0±0,80	3,6±0,14	1,5±0,06
2	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	30,7±1,23	27,7±1,10	2,3±0,09	1,7±0,07
3	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	37,5±1,50	23,4±0,94	5,1±0,20	1,9±0,07
4	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9417	34,3±1,37	28,2±1,13	3,1±0,12	1,7±0,07
5	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	18,0±0,72	24,0±0,96	6,2±0,25	0,8±0,03
6	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8544	32,5±1,30	10,3±0,41	11,7±0,47	0,5±0,02
7	<i>P. syringae</i> (<i>P. wieringae</i>) 7922	25,5±1,02	11,5±0,46	3,1±0,12	0,5±0,02
8	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027 (отриманий водно-фенольною екстракцією)	36,3±1,45	2,5±0,10	7,9±0,31	1,4±0,06

Примітка. КДО - 2-кето-3-дезоксиктонова кислота.

Одержані нами ЛПС патоварів *P. syringae* виявилися подібними за хімічним складом. Так в ЛПС усіх досліджуваних штамів містилася значна

кількість вуглеводів, що відрізняє фітопатогенні види бактерій роду *Pseudomonas* від інших досліджених представників роду, які часто характеризуються О-антигенними комплексами з низьким вмістом вуглеводів. Найнижчим вмістом вуглеводів характеризувався ЛПС типового штаму (18,0%). При цьому за отримання ЛПС цього штаму водно-фенольною екстракцією вміст вуглеводів становив 36,3%.

В ЛПС усіх досліджених штамів фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* міститься значна кількість білка. В ЛПС штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* вміст білка становив 20,0 – 28,2 %. В ЛПС штамів, які належать до патоварів, що уражують незернові культури кількість білка становила 10,3% для штаму *P. syringae* pv. *aptata* 8544 та 11,5% для штаму *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922. В ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 вміст білка становив 24,0%. Найменша кількість білка містилася в ЛПС типового штаму, що був екстрагований водно-фенольним розчином – 2,5 % (табл. 5.1). Необхідно зазначити, що використання методу екстрагування фенолом при виділенні ЛПС дозволяє отримувати препарати цих біополімерів позбавлені білків. За даними літератури кількість білка у препаратах ЛПС залежить від способу їхнього виділення і може коливатись від 6,7 до 24,5% [90]. В одержаних нами препаратах білок не відокремлюється від ЛПС за осадження їх з 3%-го розчину ультрацентрифугуванням. Це свідчить про те, що білок і ЛПС утворюють ліпополісахарид-білковий комплекс. З літератури відомо, що молекули ЛПС в клітині знаходяться в комплексі одна з одною та з речовинами іншої хімічної природи, наприклад, білками [103].

У складі досліджених ЛПС *P. syringae* міститься від 3,1 до 11,7 % нуклеїнових кислот від сухої маси ЛПС (табл. 5.1). При цьому у ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, які отримано різними методами, вміст нуклеїнових кислот був майже однаковим. 6,2% в ЛПС, який отримано екстрагуванням розчином хлориду натрію, та 7,9% в ЛПС, який отримано водно-фенольним екстрагуванням.

2-кето-3-дезоксиктонова кислота (КДО) завжди присутня в ЛПС грамнегативних бактерій. Вона зв'язує ліпід А з полісахаридною частиною молекули. Наявність КДО може бути маркером, який свідчить про ліпополісахаридну природу виділеної речовини. В інших полімерах клітин КДО не виявляється. В усіх одержаних ЛПС містилася КДО у кількості 0,5 – 1,9% (табл. 5.1).

В цілому хімічний склад отриманих ЛПС є доволі типовим для бактерій виду *P. syringae*, які отримано застосованим методом [6, 7, 90]. Найбільше від усіх препаратів відрізнявся ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, одержаний за екстрагування водно-фенольним методом. Він містив найменшу кількість білка (2,5%) (табл. 5.1).

5.2 Серологічна активність ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae*

Оскільки відомо, що ЛПС є термостабільними антигенами бактеріальної клітини, то встановлення їх серологічної активності є додатковим підтвердженням збереження цілісності і біологічної активності ЛПС під час виділення з клітини.

Серологічну активність ЛПС визначали у реакціях подвійної дифузії в агарі із антисироватками тих самих серогруп, що і штами, із яких було екстраговано ЛПС. Тобто, серологічну активність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417, *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. syringae*. (*P. wieringae*) 7922, які належать до IV серогрупи за схемою Пастушенко і Симонович, визначали у реакції із антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV). Серологічну активність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, який належить до II серогрупи, визначали у реакції з антисироваткою *P. syringae* pv. *syringae* К-1025 (серогрупа II). Серологічну активність двох препаратів ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, які отримані різними методами виділення ЛПС із клітин, визначали у реакції подвійної дифузії в агарі із антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281

(серогрупа I) та гомологічною антисироваткою до *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (серогрупа I).

Як отриманий екстрагуванням розчином хлориду натрію (0,85%), так і отриманий водно-фенольною екстракцією ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 були серологічно активними у реакції із гомологічною антисироваткою та із антисироваткою до штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 (табл. 5.2). При цьому кількість ліній преципітації, які утворював отриманий водно-фенольною екстракцією ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, була більшою за кількість ліній, утворювану екстрагованим розчином хлориду натрію ЛПС цього штаму. Обидва ЛПС не утворювали ліній преципітації з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV).

Таблиця 5.2 – Результати реакції подвійної дифузії в агарі ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027

Антисироватка	Кількість ліній преципітації	
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027 (отриманий водно-фенольною екстракцією)
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027 (серогрупа I)	2	4
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 8281 (серогрупа I)	1	3
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 4394 (серогрупа IV)	0	0

ЛПС всіх штамів *P. syringae*, які належать до IV серогрупи, були серологічно активні у реакції подвійної дифузії а агарі з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV) (табл. 5.3). Однак, кількість ліній преципітації, які утворювалася різними ЛПС була не однаковою. Дві лінії

преципітації утворилося в результаті взаємодії ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 з антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV). По одній лінії утворювалося в результаті реакції цієї антисироватки з ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 та ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544 (табл. 5.3). ЛПС штамів *P. syringae*, які належать до IV серогрупи, не взаємодіяли з антисироваткою до *P. syringae* pv. *syringae* К-1025 (серогрупа II).

Таблиця 5.3 – Результати реакції подвійної дифузії в агарі ЛПС досліджуваних штамів *P. syringae*

ЛПС штаму	Кількість ліній преципітації з антисироватками	
	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 4394 (серогрупа IV)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> К-1025 (серогрупа II)
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	1	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8544	1	0
<i>P. syringae</i> (<i>P. wieringae</i>) 7922	2	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	0	2

ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780, який належить до серогрупи II, утворював дві лінії преципітації з антисироваткою до *P. syringae* pv. *syringae* К-1025 (серогрупа II) та не взаємодіяв із антисироваткою до *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупа IV) (табл. 5.3).

Отже, нами встановлено, що всі отримані нами ЛПС *P. syringae* (включаючи отриманий водно-фенольною екстракцією ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027) є серологічно активними (табл. 5.2, 5.3). Це слугує запорукою збереження структури та біологічної активності отриманих ЛПС і є важливим для використання цих біополімерів у подальшій роботі.

Закономірності утворення ліній преципітації за взаємодії у реакції подвійної дифузії в агарі ЛПС штамів *P. syringae* співпадають з характером ліній преципітації, утворених антигенами цих штамів, одержаних за методом Грасе. Тобто, серологічна активність використаних у роботі біополімерів цілком підтверджує результати серогрупування штамів за реакцією преципітації у гелі між антигенами, одержаних за методом Грасе, та антисироватками відповідних серогруп.

Отже, ЛПС штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 серологічно активні у реакції подвійної дифузії в агарі з антисироватками до бактерій *P. syringae* відповідних серогруп. При цьому ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, який отриманий водно-фенольною екстракцією, був більш активним за ЛПС, екстрагований розчином хлориду натрію.

5.3 Жирнокислотний склад ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae*

При вивченні жирнокислотного складу виділених ЛПС було встановлено, що в препаратах ЛПС *P. syringae*, які отримано за екстрагування розчином хлориду натрію [90], містяться всі жирні кислоти, що було ідентифіковано при вивченні жирних кислот цілих клітин цих же штамів (підрозділ 3.4, табл. 5.4, додаток Д). Зокрема, 3-гідроксидеканова (3-ОН С10:0), додеканова (С12:0), 2-гідроксидодеканова (2-ОН С12:0), 3-гідроксидодеканова (3-ОН С12:0), тетрадеканова (С14:0), гексадеканова (С 16:0), октадеканова (С18:0); *cis*-9-гексадеценева (С16:1), *cis*-11-октадеценева (С18:1), *cis*-9,10-метилгексадеканова (С17:0 cyclo).

У той же час при аналізі жирних кислот ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, екстрагованого класичним методом водно-фенольної екстракції, було ідентифіковано лише 3-гідроксидеканову (3-ОН С10:0), додеканову (С12:0), 2-

гідроксидодеканову (2-ОН С12:0), 3-гідроксидодеканову (3-ОН С12:0), тетрадеканову (С14:0), гексадеканову (С 16:0) кислоти.

Зменшення кількості жирних кислот в препаратах ЛПС, що отримані методом водно-фенольної екстракції, відмічали також інші дослідники [88]. Відомо, що до складу ліпиду А *P. syringae*, як структурні компоненти входять 3-ОН С12:0, 3-ОН С10:0, 2-ОН С12:0 та С12:0 кислоти [44, 88, 92]. Варіабельний вміст інших жирних кислот, який залежить від методу екстрагування ЛПС з клітини, підтримує існуючу думку про наявність домішків інших ліпідів в аналізованих препаратах ЛПС [88].

Водночас відомо, що біологічна активність ЛПС значною мірою залежить від методу їх виділення, що впливає на фізичний стан їхніх молекул. Встановлено кореляцію між конформацією та біологічною активністю молекул ЛПС у тварин [45, 49]. Біологічно активна конформація ЛПС залежить від їх обробки різними речовинами. Ефекти ЛПС часто досліджують за допомогою високоочищених препаратів, які отримують з використанням речовин з окиснювальними властивостями. У разі обробки імуносупресивних ЛПС фенолом або трихлороцтовою кислотою вони переходили у неактивний стан.

Таблиця 5.4 – Жирнокислотний склад ліпополісахаридів *P. syringae*

Жирна кислота	Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків)				
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027 (отриманий водно-фенольною екстракцією)	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8544
3-ОН С10:0	6,0±0,05	3,4±0,20	3,9±0,20	4,2±0,21	1,4±0,07
С12:0	73,0±3,65	18,5±0,92	20,7±1,04	19,7±0,98	14,5±0,73
2-ОН С12:0	14,6±0,73	5,2±0,26	6,1±0,03	5,4±0,27	7,2±0,36
3-ОН С12:0	1,6±0,09	1,2±0,06	1,6±0,05	1,0±0,05	1,0±0,05
С14:0	–	0,4±0,02	–	–	–
С16:1	–	26,2±1,31	26,7±1,34	26,1±1,30	27,8±1,39
С16:0	4,8±0,24	27,2±1,34	23,9±1,19	25,7±1,28	24,8±1,24
С18:1	–	16,3±0,80	15,6±0,08	16,1±0,80	21,7±1,08
С18:0	–	1,6±0,07	1,4±0,07	1,8±0,09	1,4±0,07

Примітка. «–» – жирну кислоту не було виявлено.

Зміна біологічних властивостей ЛПС у результаті хімічної обробки пов'язана зі зміною конформації молекул ЛПС. Як відомо, велику роль у реалізації різних властивостей ЛПС відіграє їх молекулярна форма (наприклад, високо- й низькоагреговані препарати ЛПС відрізняються за фазністю процесу антикомплементарної дії у тварин). Біологічна активність ЛПС залежить від конформації їх молекул і форми їх ліпідної частини [256]. Встановлено тенденцію до зміни фітотоксичної активності ЛПС у результаті їх хімічної обробки [173]. У патогенних для тварин штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* та фітопатогенного штаму *Burkholderia cepacia* токсичними для рослин були екстраговані фенолом препарати ЛПС. У *Shigella sonnei* більшу фітотоксичну активність виявлено у редоксактивованого препарату.

Відмінність ефектів при обробці нативними і фенольними препаратами ЛПС свідчать про те, що захисний чи імуносупресивний ефект ЛПС у рослин визначається хімічною структурою ЛПС, яка залежить в тому числі від способу його екстрагування. Вважають, що хімічна модифікація ЛПС моделює природні процеси, які відбуваються в молекулі ЛПС у разі втрати або набуття бактеріями вірулентності [45, 49].

Встановлено, що ЛПС індукують підвищення або зниження стійкості рослин арабідопсису до фітопатогенних бактерій залежно від походження ЛПС, його хімічного стану і генотипу рослини. Нативний ЛПС із сапротрофного штаму бактерій *P. aeruginosa* 8614 істотно підвищував стійкість рослин, дефектних щодо саліцилатної сигнальної системи, і майже не впливав на рослини, дефектні щодо жасмонатної сигнальної системи. Обробка цим ЛПС рослин дикої типу призводила до значного зростання ушкодження [173]. У разі обробки рослин ЛПС із фітопатогенного штаму бактерій *P. aeruginosa* 9096 їх ураженість зменшувалась незалежно від генотипу. У той же час оброблений фенолами ЛПС фітопатогенного штаму бактерій *P. aeruginosa* 9096 підвищував стійкість лише рослин дикої типу [173].

5.4 Вплив ліпополісахаридів на індукцію реакції надчутливості на листках тютюну

Одним із найбільш вивчених ефектів ЛПС у рослин є їх здатність запобігати розвитку реакції надчутливості і водночас потенціювати розвиток інших захисних реакцій [173, 361, 414, 556]. Автори відмічають, що сама обробка рослин ЛПС із різних бактерій може безпосередньо не індукувати синтез вторинних захисних сполук, але вона праймує їх індукцію у разі наступного бактеріального інфікування [556]. Праймування, як відомо, це такий фізіологічний стан рослини, в якому вона здатна швидше і якісніше відповідати на дію стресора.

За ін'єкції розчинів ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1011, ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та отриманого водно-фенольною екстракцією ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 концентрацією 1,0 і 10,0 мг/мл під епідерміс листків тютюну реакція надчутливості не розвивалась (рис. 5.1). Тобто, ЛПС бактерій виду *P. syringae*, на відміну від цілих клітин бактерій цього виду, не індукують реакцію надчутливості у листках тютюну.

За інокуляції листків тютюну сумішшю суспензії клітин *P. syringae* з розчином ЛПС відповідного штаму концентрацією 1,0 мг/мл не спостерігали розвитку реакції надчутливості (рис. 5.2), що свідчить про біологічну активність отриманих нами ЛПС та їхню здатність запобігати розвитку реакції надчутливості у листках тютюну.

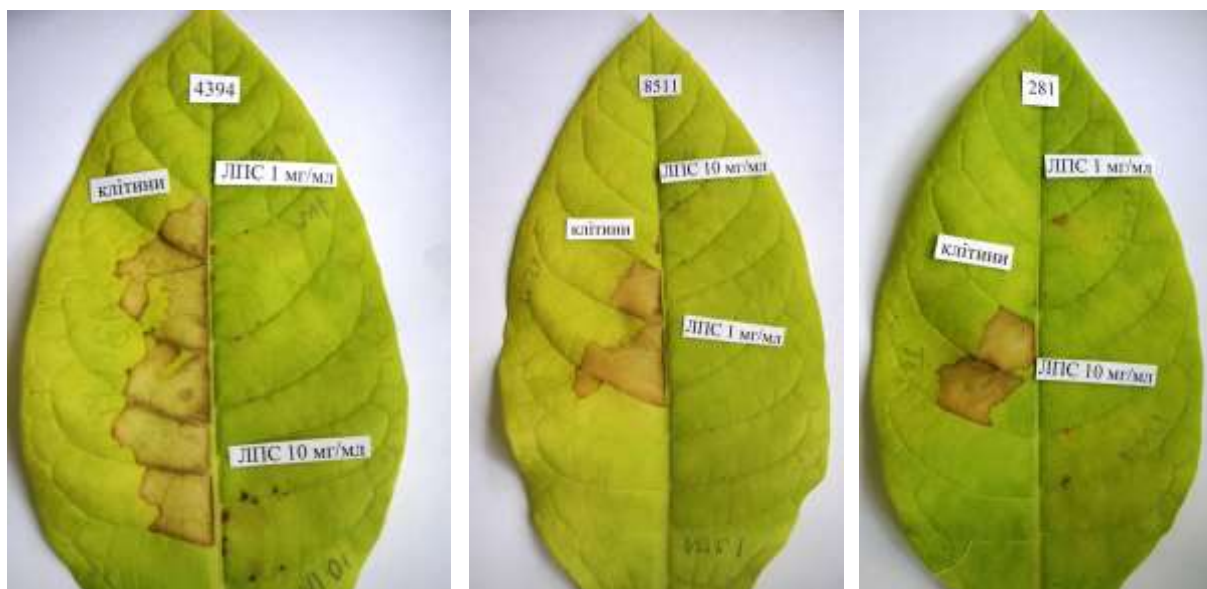


Рис. 5.1 Індукція реакції надчутливості на листках тютюну суспензією клітин та розчинами ЛПС досліджуваних штамів: 4394 – ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1011; 8511 – ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027; 281 – ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (отриманий водно-фенольною екстракцією)



Рис. 5.2 Відсутність розвитку реакції надчутливості на листках тютюну за інокуляції суспензією клітин з ЛПС: 8511 – ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027; 281 – ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (отриманий водно-фенольною екстракцією); 4394 – ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1011

Таким чином, нами було отримано препаративні кількості ЛПС семи штамів: *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922. ЛПС мали типовий для ЛПС фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* хімічний склад. Їм була притаманна серологічна активність в реакціях подвійної дифузії в агарі із антисироватками до штамів тих самих серологічних груп, що і штамів, із яких екстрагували ЛПС. Підтвердженням збереження біологічної активності ЛПС *P. syringae* є їхня здатність запобігати реакції надчутливості на листках тютюну, яка індукована введенням суспензії клітин *P. syringae*.

Основні наукові результати розділу опубліковано в працях автора [20, 22, 26, 77].

РОЗДІЛ 6

ГЕНОМОДУЛЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ТА ВПЛИВ НА ПУХЛИНОУТВОРЕННЯ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Мікроорганізми філосфери мають важливе значення для функціонування рослин та впливають на різні фізіолого-біохімічні процеси у них. Важливе значення при цьому мають фітопатогенні мікроорганізми. Вважається, що патогенні для тварин мікроорганізми можуть впливати на генетичний апарат клітин макроорганізму. Цей вплив активно досліджується [70, 95, 129, 352, 464, 524]. Однак, дані щодо дії фітопатогенних організмів і, зокрема, бактерій на генетичний апарат вкрай обмежені в науковій літературі [483], що спонукало нас до розширення уявлення про геномодулювальні властивості фітопатогенних бактерій виду *P. syringae*.

На нашу думку, вивчення геномодулювальної активності фітопатогенних бактерій є важливим як з огляду на можливість їхнього впливу на рослини та на збереження властивостей сортів рослин, так і, враховуючи, що ці бактерії надходять до споживачів рослинних продуктів, про що свідчить наявність антитіл до бактерій виду *P. syringae* у крові здорових кролів. Для визначення геномодулювальної активності нами було використано два відомі у світі тест-об'єкти: ауксотрофні за гістидином штами *Salmonella typhimurium* [243, 269, 387] та клітини апікальної меристеми *Allium cepa* [360, 378, 380, 478]. Використання декількох тест-систем дає можливість отримати більш повну інформацію щодо мутагенних властивостей досліджуваних речовин.

6.1 Активність бактерій виду *Pseudomonas syringae* в тесті Еймса

З літератури відомо, що геномодулювальною активністю може характеризуватися широкий спектр сполук, які утворюють мікроорганізми [326, 389, 551]. Окрім безпосереднього ризику збільшення мутацій, спричиненого бактеріями та їхніми метаболітами, в літературі відмічена здатність бактерій

активувати промутагени [181, 182]. Так, вільні від клітин екстракти умовно-патогенних бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium aerofaciens* спричинюють активацію промутагенів, зокрема, бензидину [181, 182]. У *P. aeruginosa*, *B. fragilis*, *E. aerofaciens* виявлено цитохром Р450 ізофермент, який присутній і у ссавців. У решти бактерій ці властивості пов'язані з іншими оксидативними ферментами [446].

Кількість ревертантів, які утворилися за додавання культуральної рідини *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011, 9400 та 9417, достовірно не відрізнялася від спонтанного сону мутацій відповідного тест штаму *S. typhimurium* (рис. 6.1).

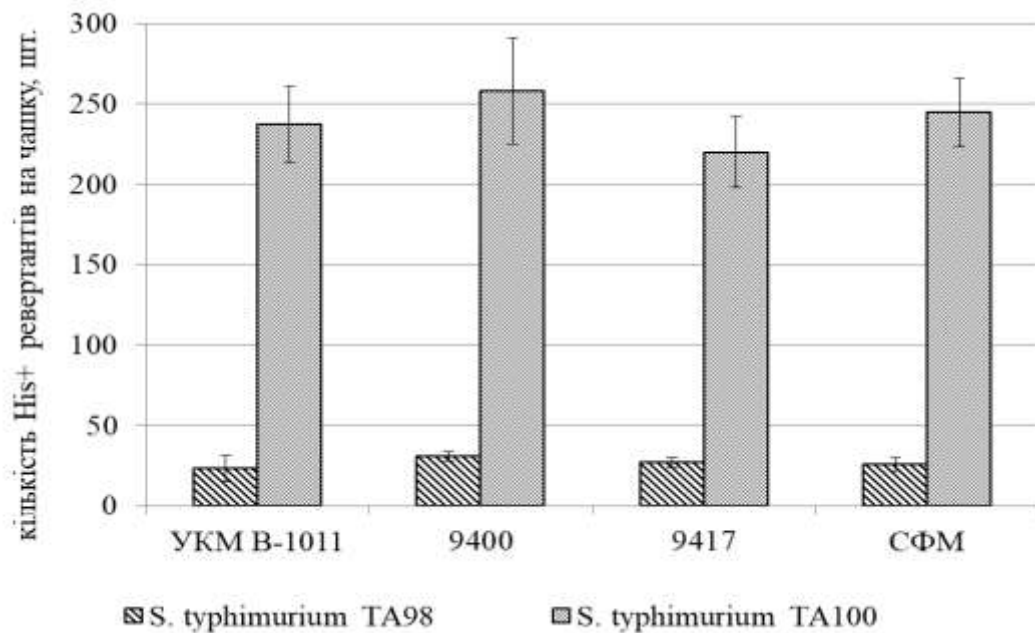


Рис. 6.1 Вплив культуральної рідини *P. syringae* pv. *atofaciens* на кількість спонтанних His⁺ реверсій тест-штамів *S. typhimurium* TA98 та TA100

Отже, штами *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011, 9400 та 9417, за культивування в лабораторних умовах не утворювали метаболітів, які здатні впливати на кількість реверсій у тест-штамів *S. typhimurium* (рис. 6.1).

Такі самі характеристики притаманні типовому штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (рис. 6.2). За культивування *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), картопляному бульйоні (КБ), середовищі Омелянського (ОМ) та середовищі Wolley D.W. et al. (W) не утворюються метаболіти, які впливають на кількість реверсій у *S. typhimurium*.

Отже, за культивування в лабораторних умовах *P. syringae* pv. *atrofaciens* та типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 не утворюють сполук із мутагенною активністю в тесті Еймса.

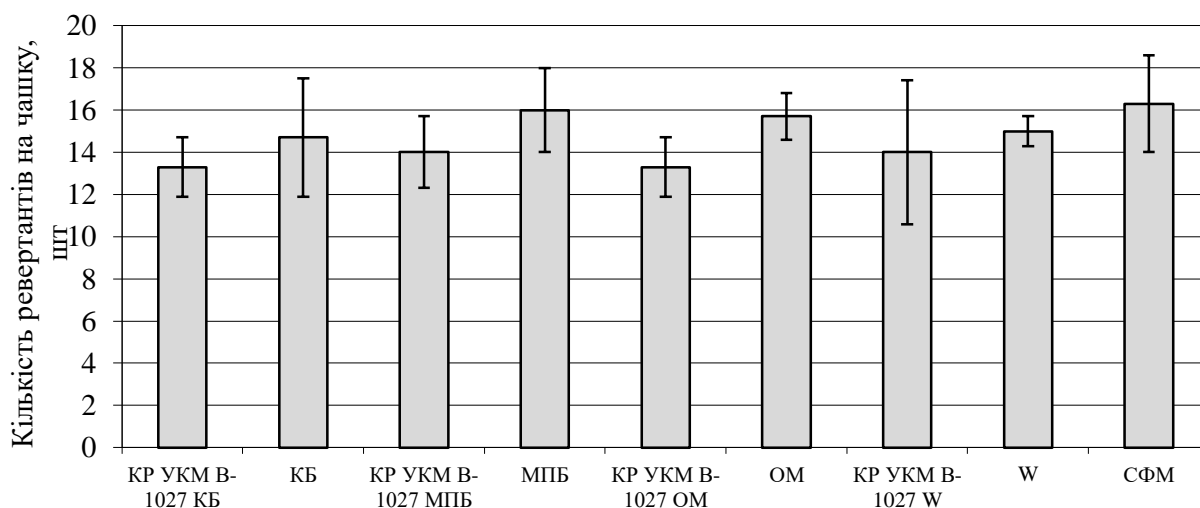


Рис. 6.2 Вплив культуральної рідини (КР) *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на кількість мутацій у *S. typhimurium* TA98

Не було виявлено також достовірного зменшення/збільшення кількості His⁺ ревертантів *S. typhimurium* TA98, індукованих біхроматом калію, за додавання культуральної рідини *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, як і відповідного середовища (рис. 6.3).

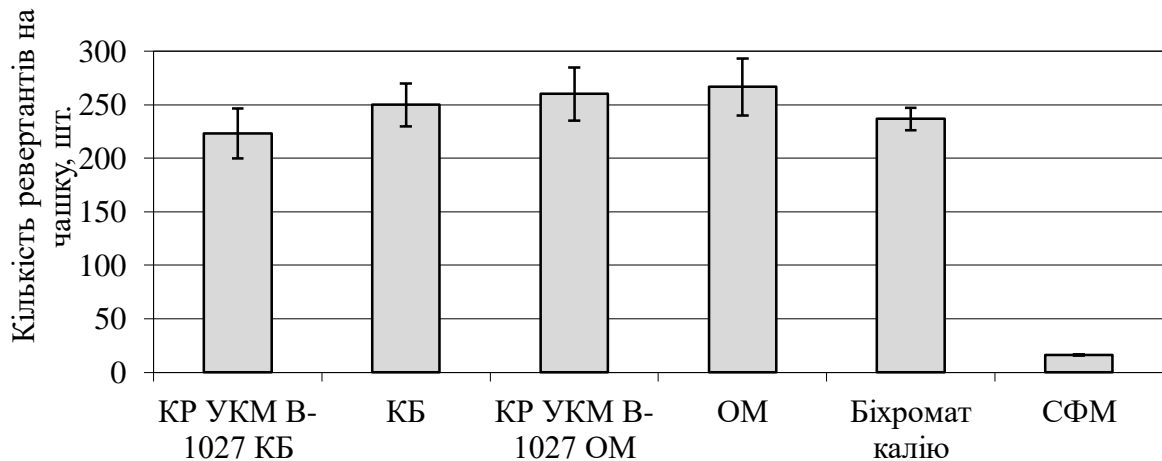


Рис. 6.3 Вплив культуральної рідини (КР) *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium* TA98

Таким чином, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 не має власної мутагенної активності і не впливає на індукований біхроматом калію мутагенез у тест-штаму *S. typhimurium* TA98.

Для вивчення здатності фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* активувати промутагени нами було використано 3,3'-діамінобензидин, який є добре відомим промутагеном [240], у концентрації 1мг/мл. Оскільки здатність бактерій активувати промутагени пов'язують із їхніми внутрішньоклітинними оксидазами чи наявністю у них цитохрому 450, ми використали лізати клітин відповідного штаму бактерій, у якому розчиняли 3,3'-діамінобензидин, для постановки тесту Еймса.

Нами встановлено, що внесення 3,3'-діамінобензидину не впливає на кількість His⁺ реверсій у обох тест-штамів *S. typhimurium* (рис. 6.4). Так, спонтанний фон мутацій *S. typhimurium* TA98 становив 36,7±3,2 колонії на чашку, а за внесення 3,3'-діамінобензидину кількість His⁺ ревертантів становила 36,3±4,4 на чашку. Кількість His⁺ реверсій у *S. typhimurium* TA98 за дії 3,3'-діамінобензидину у суміші з лізатом клітин *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 була 33,3±5,6 на чашку. За додавання лізатів клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, 9400 та 9417 із 3,3'-діамінобензидином до *S. typhimurium* TA98

спостерігали утворення $36,0 \pm 8,4$, $29,3 \pm 6,7$ та $30,7 \pm 5,3$ колоній ревертантів на чашку відповідно. Тобто кількість реверсій у цих варіантах дослідження не відрізнялася від спонтанного фону мутацій тест-штаму *S. typhimurium* TA98 (рис. 6.4).

Такі самі результати нами отримано і за використання другого тест-штаму *S. typhimurium* TA100 (рис. 6.4). Кількість His⁺ ревертантів цього штаму, що утворювалася за внесення 3,3'-діамінобензидіну та 3,3'-діамінобензидіну із лізатом клітин відповідного штаму *P. syringae*, не відрізнялася від спонтанного фону мутацій.

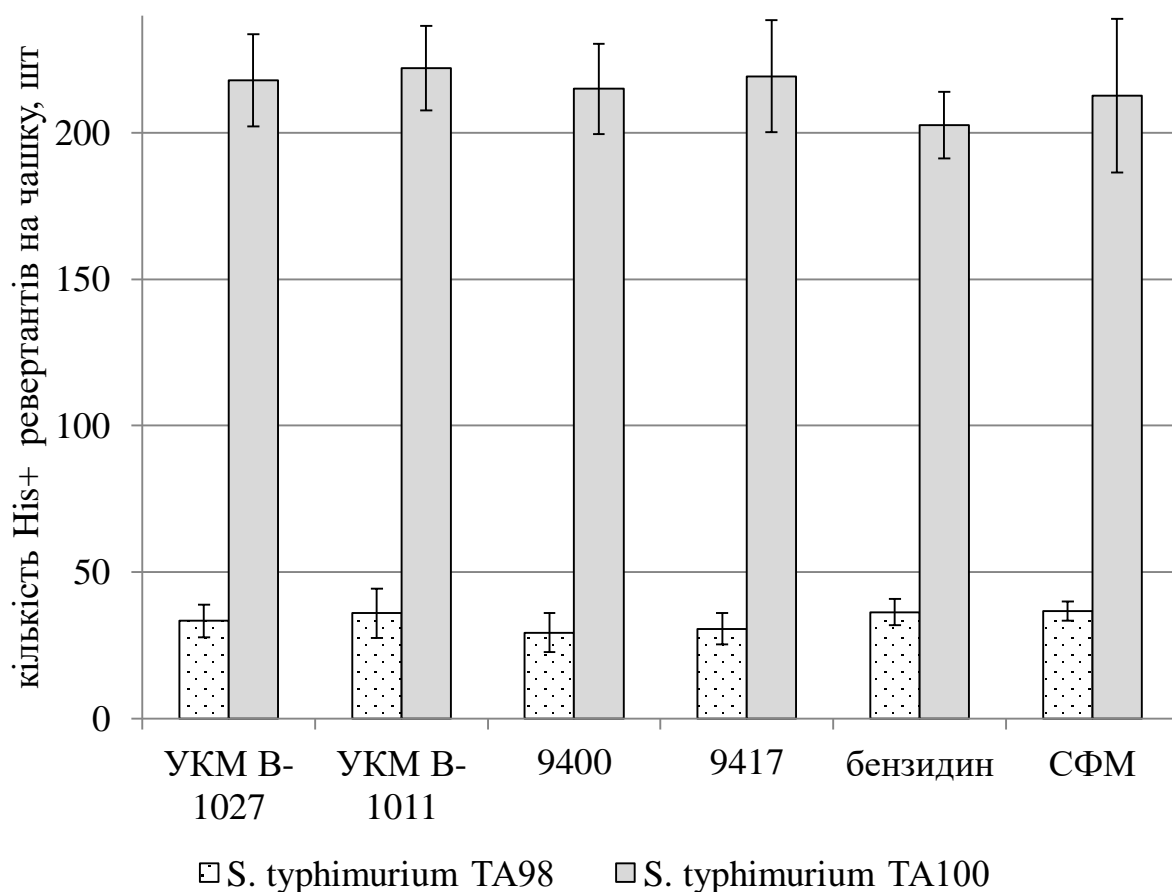


Рис. 6.4 Кількість His⁺ реверсій у *S. typhimurium* за дії 3,3'-діамінобензидіну у суміші з лізатами клітин штамів *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, 9400 та 9417

Отже, нами встановлено, що фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens* не утворюють метаболітів із мутагенною дією за культивування в лабораторних умовах та не спричинюють активацію промутагену 3,3'-діамінобензидину. Здатність активувати промутагени, за даними літератури [181, 182], виявлено у бактерій типового виду роду *Pseudomonas* - *P.aeruginosa*. У цих бактерій вона опосередковується ферментом цитохрому P450. Для тих організмів, які здатні до метаболічної активації промутагенів, але не показали піку поглинання P450 у безклітинних екстрактах, вона може бути обумовлена іншими окислювальними ферментами [181, 182]. Відомо, що фітопатогенні бактерії роду *Pseudomonas* відрізняються від інших представників цього роду відсутністю оксидази, що на нашу думку обумовило не здатність їх активувати промутагени.

6.2 Ліпополісахариди *Pseudomonas syringae* в тесті Еймса

Враховуючи дані літератури щодо мутагенної дії ЛПС патогенних для тварин бактерій [350], токсичність для макроорганізмів [44, 45, 49] та результати наших попередніх досліджень [3, 53], нами було досліджено геномодулювальну активність ЛПС неатипового штаму *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011, типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* та ЛПС близьких патоварів [385]: *P. syringae* pv. *aptata*, *P. syringae* (*P. wieringae*).

Передумовою отримання достовірних результатів щодо мутагенної/антимутагенної дії досліджуваних речовин в тесті Еймса є відсутність або низький рівень токсичності цих речовин до тест-штамів *S. typhimurium*. Встановлено, що досліджені штами фітопатогенних бактерій *P. syringae* не мають антагоністичної активності до тест-штамів *S. typhimurium* TA98 і *S. typhimurium* TA100.

ЛПС штамів *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011, 9780, як і ЛПС раніше досліджуваних нами штамів [3, 5] не мали токсичної дії на штами *S. typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100 (рис. 6.5, 6.6). Накопичення біомаси

впродовж культивування штамів *S. typhimurium* за внесення культуральної рідини цих бактерій не мало достовірно значимої відмінності ($p \leq 0,05$) від контролю. Для ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 також було підтверджено відсутність токсичного впливу на тест-штами *S. typhimurium* ТА98 та *S. typhimurium* ТА100 ЛПС, що є передумовою дослідження речовин в тесті Еймса.

Отже, оскільки ЛПС не має токсичного впливу на тест-штами *S. typhimurium* ТА98 і *S. typhimurium* ТА100, його мутагенна активність може бути визначена у тесті Еймса.

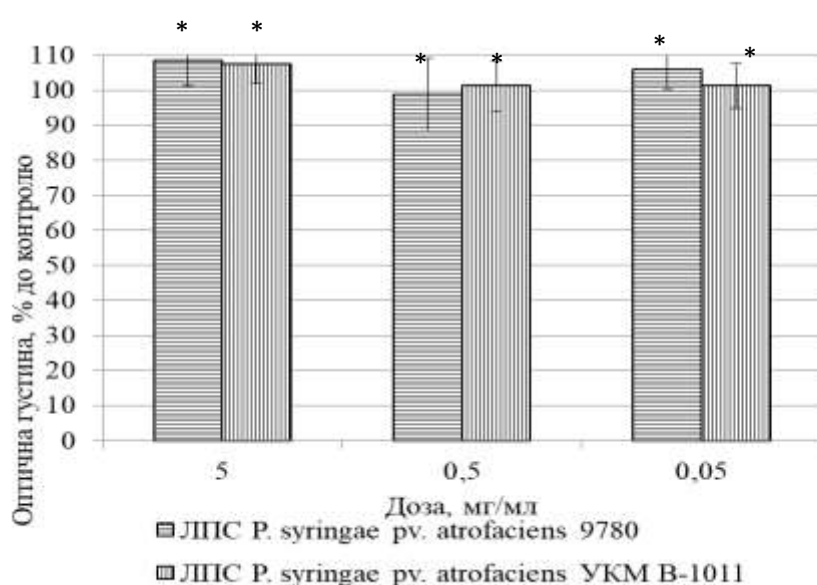


Рис. 6.5 Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на ріст *S. typhimurium* ТА98

* - відсутність статистично значимої відмінності від контролю ($p \leq 0,05$)

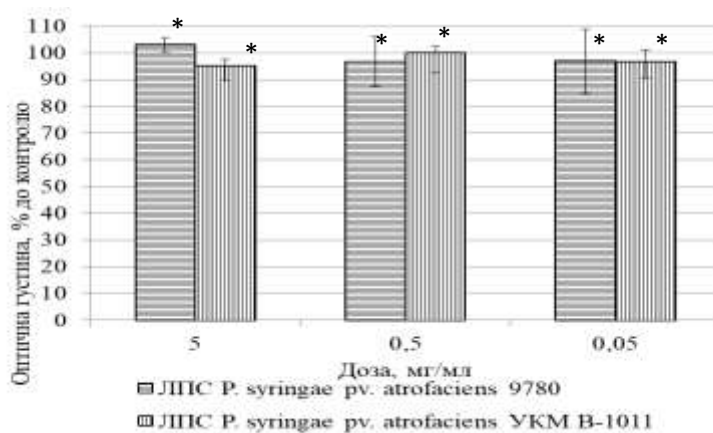


Рис. 6.6 Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на ріст *S. typhimurium* ТА100

* - відсутність статистично значимої відмінності від контролю ($p \leq 0,05$)

6.2.1 Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* на спонтанний мутагенез у тест-штамів

Першим етапом тестування мутагенної активності ЛПС в тесті Еймса стало дослідження впливу цих біополімерів на рівень спонтанного мутування тест-штамів *S. typhimurium*. За внесення в середовище ЛПС *P. syringae* рв. *atrofaciens* УКМ В-1011 в концентраціях від 0,5 до 5000,0 мкг/мл кількість реверсій у *S. typhimurium* ТА98 та *S. typhimurium* ТА100 достовірно не змінювалася (табл. 6.1).

Таблиця 6.1 – Вплив ЛПС *P. syringae* рв. *atrofaciens* УКМ В-1011 на кількість спонтанних мутацій *S. typhimurium*

Концентрація ЛПС, мкг/мл	<i>S. typhimurium</i> ТА98	<i>S. typhimurium</i> ТА100
	Кількість His ⁺ ревертантів на чашку	
5000,0	28 ± 3	119±16
500,0	26 ± 5	122±12
50,0	26 ± 3	120±10
5,0	н/д	120±30
0,5	24 ± 8	141±6
Спонтанний фон мутацій	24 ± 1	126±7
Біхромат калію (1 мг/мл)	2072±273	1829±19

Примітка. н/д – не досліджували.

Необхідно зазначити, що мутагенна активність речовини в тесті Еймса може бути встановлена у разі, якщо кількість колоній ревертантів в досліді перевищує кількість ревертантів у контролі для штаму *S. typhimurium* ТА98 у 2,0 рази, для штаму *S. typhimurium* ТА100 – у 1,8 рази [80]. Ми спостерігали деяке коливання кількості His⁺ ревертантів тест-штамів *S. typhimurium* за внесення ЛПС *P. syringae* рв. *atrofaciens*, проте у жодному варіанті дослідів не було перевищено ці значення.

Як і для ЛПС штамів патовару *P. syringae* pv. *atofaciens* геномодулювальну активність ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 визначили у концентраціях від 0,5 мкг/мл до 5000,0 мкг/мл. У разі внесення ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 у найбільшій із досліджених концентрації 5,0 мкг/мл кількість His⁺ ревертантів штаму *S. typhimurium* ТА98 становила 27,0±1,9 колоній на чашку, а кількість спонтанно утворюваних His⁺ ревертантів цього штаму 27,8±3,1 колоній на чашку. Тобто, кількість His⁺ реверсій штаму *S. typhimurium* ТА98 достовірно не змінювалася навіть за внесення ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 у найбільшій із досліджених концентрацій. Такі самі дані ми отримали і щодо впливу ЛПС цього штаму на спонтанний мутагенез у тест-штаму *S. typhimurium* ТА100. Кількість His⁺ реверсій штаму *S. typhimurium* ТА100 за внесення 5,0 мкг/мл ЛПС становила 168,0±25,0 колоній на чашку, а спонтанний фон мутації тест-штаму становив 177,0±16,0 колоній на чашку. За внесення ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 у нижчих концентраціях також не спостерігали достовірної різниці між кількістю His⁺ ревертантів у дослідних варіантах і спонтанним фоном мутацій відповідного тест-штаму (табл. 6.2).

Таким чином, ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, як і ЛПС раніше вивчених штамів фітопатогенних бактерій, не спричинює мутагенного впливу на *S. typhimurium* ТА98 і *S. typhimurium* ТА100.

Відомо, що на біологічну активність ЛПС значною мірою впливає склад та конформація молекули біополімеру [45, 49], які визначаються не лише походженням ЛПС, але й залежать від методу екстрагування полімеру із зовнішньої мембрани бактерій. Тому нами було вивчено мутагенну активність в тесті Еймса ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, який було виділено методом водно-фенольного екстрагування.

Таблиця 6.2 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на кількість спонтанних мутацій у *S. typhimurium*

Препарат ЛПС	Концентрація ЛПС, мкг/мл	Кількість His ⁺ ревертантів на чашку	
		<i>S. typhimurium</i> ТА98	<i>S. typhimurium</i> ТА100
Екстрагований розчином хлориду натрію ЛПС	5000,0	27,0±1,9	168,0±25,0
	500,0	32,0±4,5	158,0±5,0
	50,0	30,5±2,1	195,0±30,0
	5,0	27,7±3,9	179,0±35,0
	0,5	26,5±5,1	195,0±27,0
Екстрагований водно-фенольним методом ЛПС	5000,0	25,0±3,4	170,0±20,0
	500,0	25,6±1,3	138,0±19,0
	50,0	25,3±6,7	143,0±10,0
	5,0	22,3±8,9	158,0±25,0
	0,5	20,0±6,8	166,0±18,0
Спонтанний фон мутацій		26,1±3,1	177,0±16,0
Біхромат калію (1 мг/мл)		2072±273	1829±19

За дослідження екстрагованого водно-фенольним методом ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 нами отримано результати, які аналогічні результатам вивчення екстрагованого розчином хлориду натрію ЛПС цього штаму (табл. 6.2). Кількість His⁺ реверсій у тест-штаму *S. typhimurium* ТА98 за додавання ЛПС у концентрації 5,0 мг/мл становила 25,0±3,4 колоній на чашку, що не має достовірної відмінності від спонтанного фону мутацій цього тест-штаму. Кількість His⁺ реверсій у тест-штаму *S. typhimurium* ТА100 за внесення ЛПС у найбільшій концентрації була 170,0±20,0 колоній на чашку, а спонтанний фон мутацій цього штаму становив 177,0±16,0 колоній на чашку.

Таким чином, ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 не впливає на кількість His⁺ ревертантів обох тест-штамів *S. typhimurium*. При

цьому активність препаратів ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, одержаних різними методами, була однаковою.

ЛПС іншого патовару *P. syringae* pv. *aptata* 8544 також достовірно не впливає на утворення His⁺ ревертантів обох тест-штамів *S. typhimurium* (табл. 6.3).

За внесення ЛПС в середовище кількість ревертантів *S. typhimurium* ТА98 достовірно не відрізнялася від спонтанного фону мутацій тест-штаму, який в цій серії дослідів становив $30,2 \pm 1,5$ колоній на чашку. У дослідах із тест-штамом *S. typhimurium* ТА100 за внесення в середовище ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544 у концентрації 5,0 мг/мл кількість утворених колоній His⁺ ревертантів була дещо нижчою ($86,0 \pm 12,7$ колоній на чашку) за спонтанний фон мутацій, який становив $117,0 \pm 17,8$ колоній на чашку. Однак така різниця є не достовірною ($p > 0,05$) і тому пригнічення мутагенезу у цьому варіанті дослідів ми не розраховували.

Таблиця 6.3 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544 на кількість спонтанних мутацій *S. typhimurium*

Концентрація ЛПС, мкг/мл	Кількість His ⁺ ревертантів на чашку	
	<i>S. typhimurium</i> ТА98	<i>S. typhimurium</i> ТА100
5000,0	$28,3 \pm 1,9$	$86,0 \pm 12,7$
500,0	$38,3 \pm 6,21$	$115,7 \pm 6,8$
50,0	$22,0 \pm 1,0$	$115,3 \pm 8,8$
5,0	$26,0 \pm 6,3$	$123,3 \pm 2,8$
0,5	$27,3 \pm 6,9$	$106,7 \pm 19,2$
Спонтанний фон мутацій	$30,2 \pm 1,5$	$117,0 \pm 17,8$
Біхромат калію (1 мг/мл)	2072 ± 273	1829 ± 19

ЛПС штаму *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 у концентрації 5,0 мг/мл та 0,5 мг/мл достовірно зменшував кількість спонтанних His⁺ реверсій у тест-штаму *S. typhimurium* TA100 на 29 та 21% відповідно (табл. 6.4).

В менших концентраціях ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 є не активним. Досліджуваний ЛПС в усіх вивчених концентраціях достовірно не впливав на кількість ревертантів *S. typhimurium* TA98.

Таблиця 6.4 – Вплив ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 на кількість спонтанних мутацій *S. typhimurium*

Концентрація ЛПС, мкг/мл	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % *	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % *
5000,0	27,7±1,7	–	106,4±13,3	29
500,0	28,3±1,7	–	118,3±14,2	21
50,0	25,3±5,8	–	158,0±2,9	–
5,0	29,3±2,6	–	158,0±4,0	–
0,5	30,3±1,7	–	146,0±11,7	–
Спонтанний фон мутацій	30,0±2,8		150,0±2,2	
Біхромат калію (1 мг/мл)	2072±273		1829±19	

Примітка. Інгібування мутагенезу розраховували лише у тих варіантах, що мали достовірну відмінність ($p \leq 0,05$) від спонтанного фону мутацій відповідного тест-штаму.

Узагальнюючи отримані експериментальні дані можна стверджувати, що ЛПС різних патоварів фітопатогенного виду бактерій *P. syringae* не виявляє мутагенної активності в бактеріальній тест-системі з *S. typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100. Лише у одного із шести вивчених ЛПС (ЛПС *P. syringae*

(*P. wieringae*) 7922) нами було відмічено здатність пригнічувати спонтанний мутагенез в тесті Еймса з тест-штамом *S. typhimurium* TA100 у концентрації 5,0 мг/мл на 29% та у концентрації 0,5 мг/мл на 21%.

Таким чином, ЛПС патоварів *P. syringae* не проявляють мутагенної активності в тесті Еймса. Отримані результати стали поштовхом до вивчення антимутагенної активності ЛПС бактерій цього виду.

6.2.2 Протекторна активність ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* щодо індукованого мутагенезу у тест-штамів

Для досліджень з визначення антимутагенної дії ЛПС як модельні мутагени можуть бути використані різноманітні сполуки: важкі метали, нітросполуки. Як модельні мутагени ми використали дві сполуки: біхромат калію і N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідина (МННГ), які широко використовують для індукції мутацій в тесті Еймса та мають різний механізм дії [243, 269, 387].

Генотоксичні властивості хрому були неодноразово продемонстровані при вивченні сполук, які містять Cr^{+3} або Cr^{+6} в різних тест-системах [329]. Механізм генотоксичної дії металів з перемінною валентністю більшість авторів пов'язують з ініціюванням процесів утворення активних форм кисню, які спричиняють пошкодження генетичних структур [81]. Мутагенний ефект МННГ пов'язаний із здатністю спричинювати алкілування і зшивку ланцюгів ДНК, які потім вирізаються ДНКазою.

За використання як модельного мутагену біхромату калію його вносили в середовище у концентрації 1 мг/мл. У цій дозі біхромат калію не впливає на виживання тест-штамів *S. typhimurium*, але має достовірну мутагенну активність щодо них.

ЛПС неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 зменшував індукований біхроматом калію мутагенез лише за внесення його в середовище у найбільших із досліджених концентраціях. В концентрації 5 мг/мл він зменшував індукований біхроматом калію мутагенез на 17% для тест-штаму

S. typhimurium TA98, та на 22% для *S. typhimurium* TA100 (табл. 6.5). У концентрації 0,5 мг/мл був активним лише стосовно тест-штаму *S. typhimurium* TA100, інгібування індукованого біхроматом калію мутагенезу у якого становило 17%. У більш низьких концентраціях ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 не впливав на кількість індукованих біхроматом калію мутацій у обох тест-штамів *S. typhimurium*.

Таблиця 6.5 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium*

Концентрація ЛПС, мкг/мл	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % **	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % **
5000,0	1725±161	17	1428±86	22
500,0	2000±118	–	1517±138	17
50,0	1917±328	–	1885±41	–
5,0	1895±181	–	1920±200	–
0,5	1988±14	–	1856±130	–
0*	2072±273	–	1829±19	–
Спонтанний фон мутацій	32±3	–	159±14	–

Примітка. 0* – позитивний контроль, кількість реверсій, індукована біхроматом калію; ** інгібування мутагенезу розраховували лише у тих варіантах, що мали достовірну різницю ($p \leq 0,05$) із позитивним контролем.

Таким чином, ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 проявляв антимутагенну активність в концентрації 5 мг/мл для обох тест-штамів, у концентрації 0,5 мг/мл лише для тест-штаму *S. typhimurium* TA100.

Для подальшого тестування антимуутагенної дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* як модельний мутаген застосовували N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ), речовину, що використовується як алкілюючий агент та є класичним мутагеном. З літератури відомо, що ця речовина досить часто використовується в тесті Еймса для індукції мутацій у тест-штаму *S. typhimurium* TA100 [243, 269].

Для здійснення досліджень з вивчення антимуутагенної активності оптимальною дозою МННГ є 10,0 мкг/мл. За такої дози МННГ за нашими даними кількість His⁺ ревертантів *S. typhimurium* TA100 у 22,8 рази перевищує спонтанний фон мутацій цього тест-штаму і більшість (71,4%) клітин бактерій залишаються живими (табл. 6.6). Збільшення дози МННГ призводить до переважання летальної дії цієї речовини щодо *S. typhimurium* TA100 над мутагенною і тому є недоцільним. Відомо, що МННГ індукує високу частоту мутацій у дозах, які знижують виживання мікроорганізмів до 10–50 %

Таблиця 6.6 – Вплив N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину на кількість мутацій у *S. typhimurium* TA100

Концен-трація МННГ, мкг/мл	Кількість ревертантів на чашку, (X)	Перевищення спонтанного фону мутацій, (X/X _{сфм})	Виживання тест-штаму, %
500,0	3653,3 ± 365,8	49,4	7,1
50,0	4693,3 ± 685,4	63,4	57,0
10,0	1692,7 ± 240,0	22,8	71,4
5,0	540,0 ± 59,8	7,3	70,4
0,5	125,3 ± 1,3	1,7	78,5
Спонтанний фон мутацій	73,7 ± 15,6	1,0	–

ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 зменшував кількість індукованих МННГ His⁺ реверсій тест-штаму *S. typhimurium* TA100 у

концентрації 5000,0 мкг/мл на 49%, у концентрації 500,0 мкг/мл на 44%, у концентрації 50,0 мкг/мл на 33%, у концентрації 5,0 мкг/мл на 32% та у концентрації 0,5 мкг/мл на 27% (табл. 6.7).

Таким чином, нами встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 характеризуються антимуутагенною активністю щодо індукованого МННГ мутагенезу в тесті Еймса із штамом *S. typhimurium* TA100.

Таблиця 6.7 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на кількість індукованих N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідом (10 мкг/мл) мутацій у *S. typhimurium* TA100

Концентрація ЛПС, мкг/мл	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	
	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, %**
5000,0	714 ± 35	49
500,0	786 ± 37	44
50,0	942 ± 47	33
5,0	960 ± 42	32
0,5	1028 ± 46	27
0*	1414 ± 70	–
Спонтанний фон мутацій	126±7	–

Примітка. 0* – позитивний контроль, кількість реверсій, індукованих МННГ; ** інгібування мутагенезу розраховували лише у тих варіантах, що мали достовірну різницю ($p > 0,05$) із позитивним контролем.

Як уже зазначалося у роботі, значний вплив на біологічну активність ЛПС має метод його виділення із клітин. Нами було визначено антимуутагенну активність отриманих екстрагуванням розчином хлориду натрію та водно-

фенольним розчином ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. За тестування антимуtagenних властивостей ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 щодо індукованого біхроматом калію мутагенезу в тесті Еймса виявлено здатність біополімеру пригнічувати індукований мутагенез (табл. 6.8).

Таблиця 6.8 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium*

Концентрація ЛПС, мкг/мл	<i>S. typhimurium</i> ТА98		<i>S. typhimurium</i> ТА100	
	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, %**	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, %**
Екстрагований розчином NaCl ЛПС				
5000,0	1045,0 ± 15,0	27	Н/д	Н/д
500,0	1224,0 ± 61,0	14	Н/д	Н/д
0*	1423,0 ± 38,0	–	Н/д	Н/д
СФМ	46,0 ± 6,0	–	Н/д	Н/д
Екстрагований водно-фенольним розчином ЛПС				
5000,0	1140,0 ± 101,0	41	594,0 ± 15,1	39
500,0	1552,0 ± 26,0	19	832,0 ± 36,2	15
0*	1915,0 ± 101,0	–	978,0 ± 33,9	–
СФМ	32,0 ± 3,0	–	166,0 ± 6,8	–

Примітки: тут і в табл. 6.9, 6.10, 6.11, 6.12. 0* – позитивний контроль, кількість реверсій, індукованих біхроматом калію; СФМ – спонтанний фон мутацій. Н/д – не досліджували. ** Інгібування мутагенезу розраховували лише у тих варіантах, що мали достовірну різницю ($p > 0,05$) із позитивним контролем.

Внесення ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 до клітин тест-штамів *S. typhimurium* одночасно з біхроматом калію приводить до зменшення кількості His⁺ ревертантів індукованих мутагеном. Екстрагований водно-фенольним

розчином ЛПС в концентрації 5,0 мг/мл зменшував індукований біхроматом калію мутагенез на 41 % для тест-штаму *S. typhimurium* TA98 і на 39% для штаму *S. typhimurium* TA100. Екстрагований розчином хлориду натрію ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 в концентрації 5,0 мг/мл зменшував кількість індукованих мутацій у *S. typhimurium* TA98 на 27% (табл. 6.8). У концентрації 0,5 мг/мл екстраговані обома методами ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 проявляли нижчу антимуутагенну активність: екстрагований хлоридом натрію ЛПС зменшував кількість мутацій у *S. typhimurium* TA98 на 14%, воднофенольний ЛПС зменшував кількість мутацій у цього штаму на 19%.

Нами не виявлено достовірної різниці в антимуутагенній активності ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, виділених різними методами.

ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544 зменшує кількість індукованих біхроматом калію His⁺ реверсій у *S. typhimurium* TA98 в усіх досліджених концентраціях. В концентрації 5,0 мг/мл він пригнічує індукований мутагенез на 56%, в концентрації 0,5 мг/мл – на 39%, 0,05 мг/мл – 24%, 0,005 мг/мл – 17, 0,0005 мг/мл – 13% (табл. 6.9).

Деяко нижчу антимуутагенну активність цей ЛПС має щодо індукованого біхроматом калію мутагенезу у штаму *S. typhimurium* TA100. Однак, він також був активним в усіх випробуваних дозах (табл. 6.9).

ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 характеризувався меншою антимуутагенною активністю порівняно з ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544. Він пригнічував індукований біхроматом калію мутагенез у концентрації 5,0 мг/мл на 35%, 0,5 мг/мл – 22%, 0,05 мг/мл – 7%. В менших дозах ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 не впливав на кількість індукованих His⁺ реверсій у *S. typhimurium* TA98 (табл. 6.10). В досліді з тест-штамом *S. typhimurium* TA100 цей ЛПС був активним в дозах від 5,0 мг/мл до 0,0005 мг/мл і пригнічував індукований мутагенез на 6 – 30% (табл. 6.10). В концентрації 0,05 мкг/мл він не впливав на кількість індукованих His⁺ реверсій.

Таблиця 6.9 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544 на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium*

Концентрація ЛПС, мкг/мл	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % **	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % **
5000,0	525 ±26	56	79 ±2	43
500,0	723 ±47	39	109 ±17	21
50,0	907 ±25	24	166 ±46	19
5,0	987 ±40	17	112 ±14	11
0,5	1029 ±52	13	128 ±5	8
0*	1195 ±32	–	139 ±1	–
Спонтанний фон мутацій	67 ±7	–	15 ±1	–

Таблиця 6.10 – Вплив ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium*

Концентрація ЛПС, мкг/мл	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % **	Кількість ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % **
5000,0	772 ± 53	35	97 ± 8	30
500,0	931 ± 47	22	110 ± 2	20
50,0	1112 ± 36	7	118 ± 2	15
5,0	1323 ± 145	0	130 ± 2	6
0,5	1224 ± 59	0	163 ± 4	0
0*	1195 ± 31	–	139 ± 1	–
Спонтанний фон мутацій	67 ± 7	–	15 ± 1	–

Тобто, ЛПС штамів *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922 притаманні антимуутагенні властивості щодо індукованого біхроматом калію мутагенезу в тесті Еймса.

Вплив ліпополісахаридів патоварів *P. syringae* на індукований *N*-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанідином мутагенез у тест-штамів. ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 зменшує кількість індукований МННГ мутацій у *S. typhimurium* ТА100 в усіх досліджених концентраціях. В концентрації 5000,0 мкг він пригнічує індукований мутагенез на 19%, в концентрації 500,0 мкг – на 12%, 50,0 мкг – 26%, 5,0 мкг – 15%, 0,5 мкг – 17% (табл. 6.11). Тобто, ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 притаманні антимуутагенні властивості щодо індукованого МННГ мутагенезу в тесті Еймса.

Таблиця 6.11 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на кількість індукованих *N*-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанідином (10 мкг/мл) мутацій у *S. typhimurium* ТА100

ЛПС, мкг/мл	<i>S. typhimurium</i> ТА100	
	Кількість His ⁺ ревертантів на чашку	Інгібування мутагенезу, % ^{**}
5000,0	1504 ± 31	19
500,0	1634 ± 93	12
50,0	1366 ± 12	26
5,0	1570 ± 46	15
0,5	1536 ± 106	17
0*	1856 ± 150	–
СФМ	135 ± 10	–

Необхідно зауважити, що ми не встановили прямої залежності між концентрацією ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та ступенем пригнічення індукованого МННГ мутагенезу у *S. typhimurium* ТА 100. На нашу

думку, це може бути пов'язано із особливостями механізму антимуутагенної дії ЛПС, впливом досліджуваного ЛПС не лише на кількість мутацій у тест-штаму, а й на виживання бактеріальних клітин в умовах досліду.

Отже, ЛПС штамів *P. syringae* характеризуються відсутністю мутагенної активності щодо прокаріотичного тест-об'єкту *S. typhimurium*. Водночас ці біополімери виявили здатність пригнічувати індукований біхроматом калію та МННГ мутагенез у тесті Еймса.

На підставі аналізу отриманих експериментальних даних можна припустити, що антимуутагенна активність є загальною властивістю всіх ЛПС бактерій виду *P. syringae*. Можливо, така активність пов'язана з полісахаридною частиною складної молекули ЛПС. На користь такого припущення свідчать дані літератури стосовно виявлення антимуутагенної дії у екзополісахаридів *Bifidobacterium longum* [486], глікопротеїнів *Lactobacillus plantarum* [459], рослинних полісахаридів [310].

Необхідно зазначити, що у наших дослідженнях мікробний полісахарид ксампан, який утворюють фітопатогенні бактерії *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939, також характеризувався антимуутагенною активністю.

З наведених на рис. 6.7 даних видно, що внесення ксампану не впливає на кількість His⁺ ревертантів у *S. typhimurium* TA98. Так, спонтанний фон мутацій тест-штаму *S. typhimurium* TA98 становив $12,7 \pm 1,7$ ревертантів на чашку. За внесення ксампану у концентрації 0,5 мкг кількість His⁺ ревертантів становила $13,0 \pm 3,2$. У разі внесення 5,0 мкг/мл ксампану спостерігали появу $15,3 \pm 4,3$ ревертантів на чашку, що достовірно не відрізняється від спонтанного фону мутацій цього тест-штаму. При дослідженні більш високих концентрацій ксампану кількість ревертантів становила: за внесення 50,0 мкг/мл ксампану – $10,0 \pm 3,4$; 500,0 мкг/мл ксампану – $15,3 \pm 8,8$; 5000,0 мкг/мл – $14,0 \pm 3,9$. В усіх цих дослідах кількість ревертантів за внесення ксампану достовірно не відрізнялася від кількості спонтанних ревертантів тест-штаму *S. typhimurium* TA98.

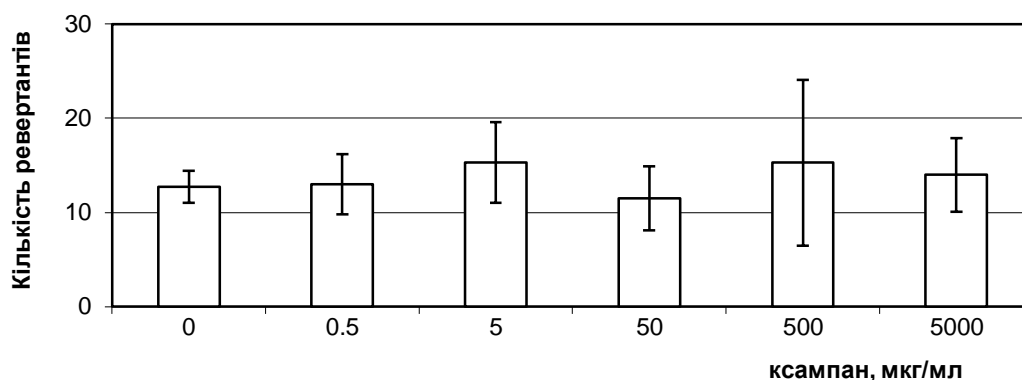


Рис. 6.7 Вплив ксампану на кількість His⁺ реверсій у *S. typhimurium* TA98

Спонтанний фон мутацій тест-штаму *S. typhimurium* TA100 становив $163,7 \pm 13,5$ колоній ревертантів на чашку. За внесення ксампану в концентрації 0,5 мкг/мл кількість His⁺ ревертантів була майже такою самою $173,2 \pm 19,1$; в концентрації 5,0 мкг/мл – $153,0 \pm 21,1$; 50,0 мкг/мл – $150,0 \pm 36,4$; 500,0 мкг/мл – $165,5 \pm 30,7$; 5000,0 мкг/мл – $174,5 \pm 15,6$ (рис. 6.8). В усіх варіантах дослідів не зареєстровано достовірної різниці між кількістю His⁺ ревертантів за внесення ксампану і кількістю спонтанних реверсій тест-штаму *S. typhimurium* TA100.

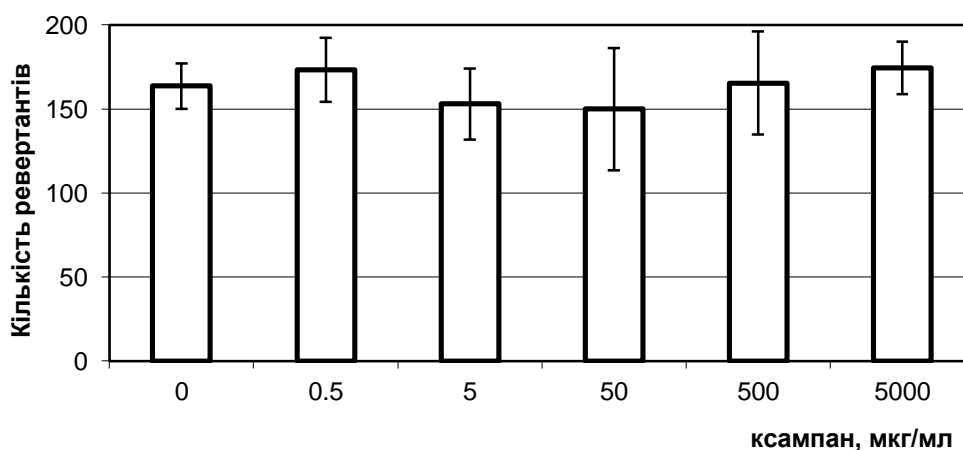


Рис. 6.8 Вплив ксампану на кількість His⁺ реверсій у *S. typhimurium* TA100

На підставі одержаних даних можна стверджувати, що ксампан не має мутагенної активності.

У випадку додавання ксампану в усіх досліджених концентраціях (від 0,5 до 5000,0 мкг/мл) спостерігали пригнічення індукованого мутагенезу. При цьому пригнічення мутагенезу майже не залежало від концентрації ксампану в середовищі. Так, за внесення 1000,0 мкг/мл ксампану спостерігали пригнічення індукованого біхроматом калію мутагенезу у *S. typhimurium* TA98 на 32%, а за внесення 0,5 мкг/мл ксампану на 25% (табл. 6. 12).

Таблиця 6.12 – Вплив ксампану на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium* TA98

Ксампан, мкг/мл	Біхромат калію, мг/мл	Кількість His ⁺ ревертантів на чашку (X)	Інгібування мутагенезу, %**
5000,0	1,0	1406,0 ± 83,7	32
500,0	1,0	1505,5 ± 11,8	27
50,0	1,0	1633,0 ± 204,8	21
5,0	1,0	1570,0 ± 20,3	24
0,5	1,0	1550,0 ± 11,3	25
0*	1,0	2053,0 ± 19,2	0
Спонтанний мутацій фон		15,5 ± 1,6	–

Примітка. 0* – позитивний контроль, кількість реверсій, індукованих біхроматом калію.

Таким чином, мікробний полісахарид ксампан виявляє антимуtagenну активність у тесті Еймса щодо індукованого біхроматом калію мутагенезу у *S. typhimurium* TA98.

Отже, нами встановлено, що ЛПС фітопатогенних бактерій патоварів *P. syringae* характеризуються здатністю зменшувати кількість індукованих біхроматом калію та МННГ реверсій у тест-штамів *S. typhimurium*.

Антимутагенна активність ЛПС у цьому тесті, на нашу думку, обумовлена наявністю полісахариду у складі молекули ЛПС.

6.3 Частота хромосомних аберацій у *Allium cepa* за дії ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

В попередніх дослідженнях нами було встановлено здатність впливати на частоту хромосомних аберацій у рослинній тест-системі ЛПС штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та авірулентного *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 [3, 5], які було ізольовано нами із рослин пшениці. Задля розширення уявлення про мутагенні властивості ЛПС збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* нами було вивчено цитотоксичну дію та здатність індукувати пошкодження хромосом ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780, який є вірулентним і належить, як і попередньо досліджуваний штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, до серогрупи II за схемою серогруповання бактерій виду *P. syringae*, та неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, який належить до серогрупи IV. Відомо, що ЛПС є важливим фактором патогенності фітопатогенних грамнегативних бактерій [87, 260], а важливе значення для вияву багатьох біологічних активностей цього біополімеру (особливо тих, що пов'язані із впливом на макроорганізми) відіграють О-специфічні полісахариди (О-ПС). О-ПС ЛПС *P. syringae* є найбільш вивченими серед фітопатогенних бактерій. Вона корелює з серологічними властивостями штамів *P. syringae* і не має кореляції з приналежністю до патовару. Наприклад, різні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* мають різну будову О-ПС [87]. Тому для дослідження нами було обрано представника тої самої серогрупи, що і раніше досліджений ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, та іншої серогрупи, яка є найбільш поширеною в агрофітоценозах України.

Встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 та ЛПС неопатитипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 є фітотоксичними для *Allium cepa* сорту Халцедон у концентрації 5 мг/мл та 10,0

мг/мл (табл. 6.13). Так ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780, у концентрації 10 мг/мл зменшує довжину корінців цибулі на 44 %, а у концентрації 5 мг/мл – на 25 %. Водночас у концентрації 2,5 мг/мл цей біополімер достовірно не впливає на ріст корінців цибулі. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 інгібує також схожість насіння цибулі у концентраціях 10,0 та 5,0 мг/мл. Таку саму активність виявив і ЛПС неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. У концентрації 10,0 мг/мл він інгібує ріст корінців проростків цибулі на 39%, а у концентрації 5,0 мг/мл на 20% (табл. 6.13). Необхідно зазначити, що фітотоксичну активність ми відмічали і у ЛПС інших штамів збудника базального бактеріозу пшениці.

Таблиця 6.13 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на проростання насіння *A. сера* сорту Халцедон

Досліджений ЛПС	Концентрація ЛПС, мг/мл	Схожість насіння, %	Інгібування схожості насіння за оброблення ЛПС, %*	Середня довжина корінця, мм	Інгібування росту корінців, %*
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	10,0	78	15	4,2	44
	5,0	86	7	5,6	25
	2,5	90	–	7,2	–
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	10,0	69	25	4,6	39
	5,0	83	10	6,0	20
	2,5	93	–	6,9	–
Контроль		92	–	7,5	–

Примітка. * - показники розраховували лише для варіантів де виявлено наявність статистично значущих відмінностей ($p < 0,05$).

Важливим показником впливу ЛПС на тест-об'єкт *A. сера* сорту Халцедон є мітотичний індекс (MI). ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 у концентраціях 10,0 і 5,0 мг/мл інгібував мітотичну активність клітин апікальної меристеми

корінців цибулі ріпчастої сорту Халцедон на 65 і 42 % відповідно порівняно з контролем (рис. 6.9). ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 виявився здатним інгібувати мітотичну активність у цих концентраціях на 44 та 27%. Порівнюючи отримані щодо інгібування мітотичної активності клітин апікальної меристеми цибулі за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 із раніше досліджуваними нами ЛПС представників цього патовару фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* можна констатувати, що досліджувані ЛПС є менш токсичними для цибулі (рис. 6.9). Однак, ми можемо стверджувати, що цитотоксична дія стосовно *A. сера* у концентраціях 10,0 і 5,0 мг/мл є загальною властивістю ЛПС бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*. У концентрації 2,5 мг/мл ЛПС збудника базального бактеріозу пшениці не виявляють цитотоксичного впливу на клітини апікальної меристеми корінців *A. сера* (рис. 6.9).

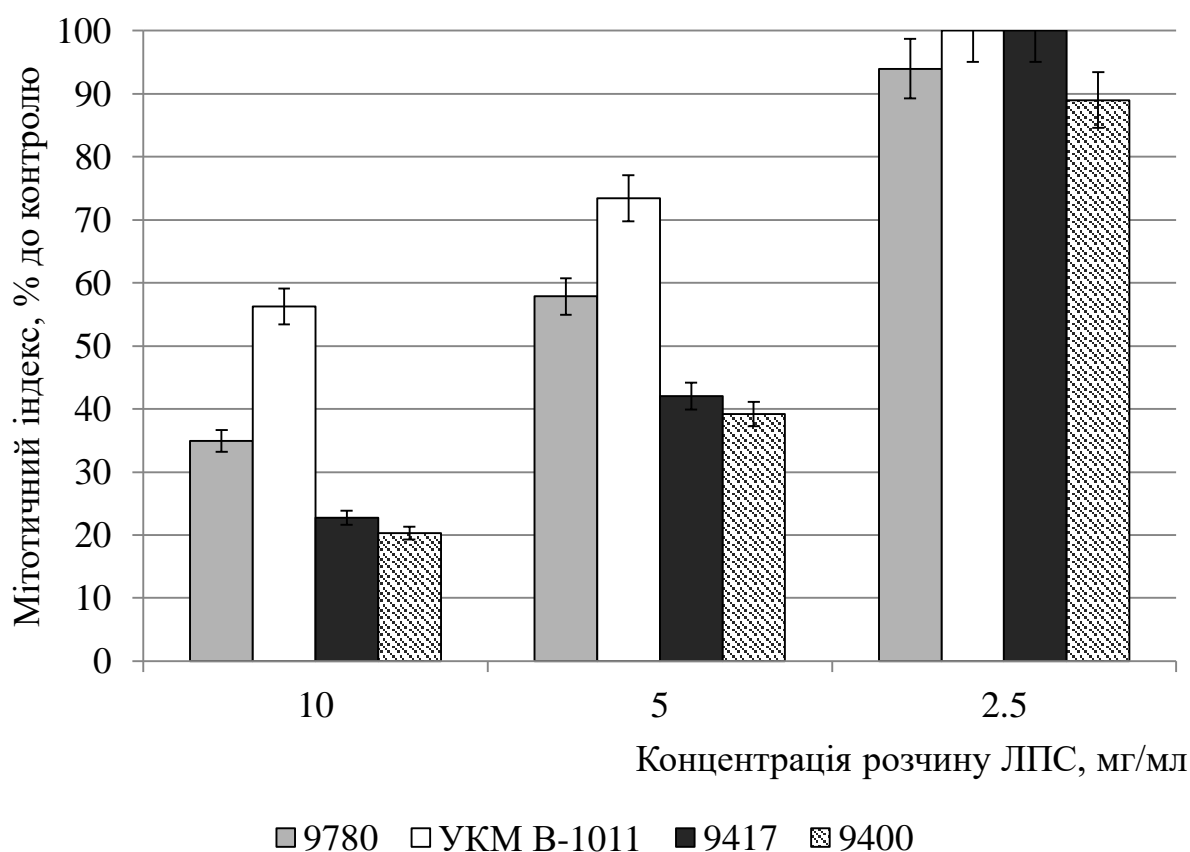


Рис. 6.9 Мітотична активність клітин апікальної меристеми корінців цибулі ріпчастої сорту Халцедон за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Нами також встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 концентрацією 5,0 мг/мл проявляє цитотоксичну активність стосовно *P. sativum* L. (горох сорту Фаворит). У дослідженій концентрації ЛПС інгібував мітотичний індекс у клітинах апікальної меристеми корінців гороху на 26%. У концентрації 1,0 мг/мл ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 не впливав на мітотичний індекс у клітинах апікальної меристеми корінців гороху. Разом із тим, при пророщуванні насіння гороху у суспензії живих клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 відмічено інгібування мітотичного індексу в у клітинах апікальної меристеми корінців на 40%.

У клітинах апікальної меристеми корінців цибулі за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* відмічали наявність клітин з такими типами пошкоджень хромосомного апарату як фрагменти хромосом, мости і іноді втрату хромосом (рис. 6.10).

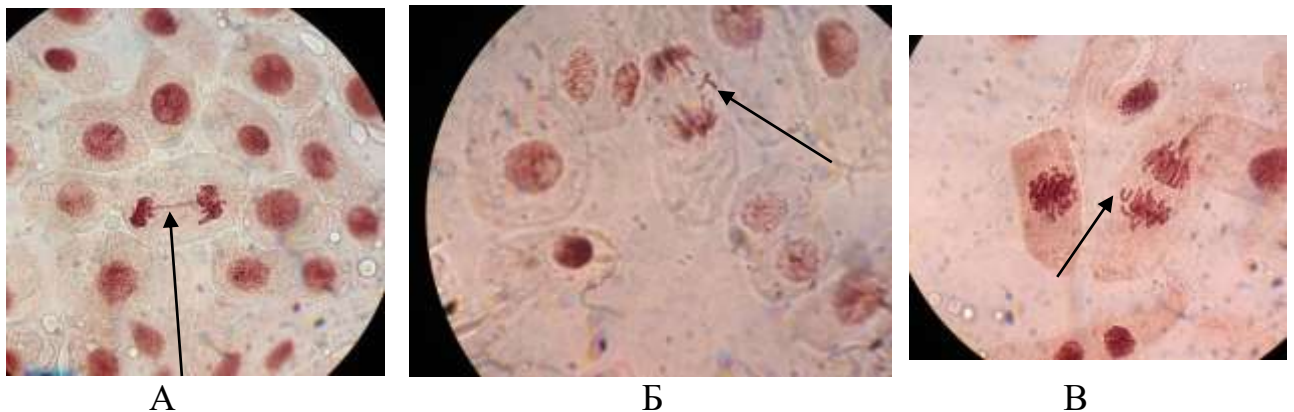


Рис. 6.10 Клітини апікальної меристеми корінців цибулі, у яких виявили пошкодження хромосом за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780: А – міст, Б – фрагмент хромосоми, В – відстаюча хромосома.

Аналіз мутагенного впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 та УКМ В-1011 здійснювали за вирощування проростків цибулі у розчинах ЛПС концентрацією 5,0 мг/мл. Встановлено, що за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 частота аберантних анафаз і телофаз (ЧААТ) становила $11,1 \pm 0,6\%$, за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 $10,8 \pm 0,5\%$ (рис. 6.11). У контролі цей показник становив $4,8 \pm 0,2\%$. Таким чином, нами

встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 та УКМ В-1011 спричинюють збільшення кількості хромосомних аберацій в *A. cerea*-тесті. Слід зауважити, що раніше проаналізовані нами ЛПС збудника базального бактеріозу пшениці [3, 5] в концентрації 5,0 мг/мл спричинювали підвищення ЧААТ у даному тесті.

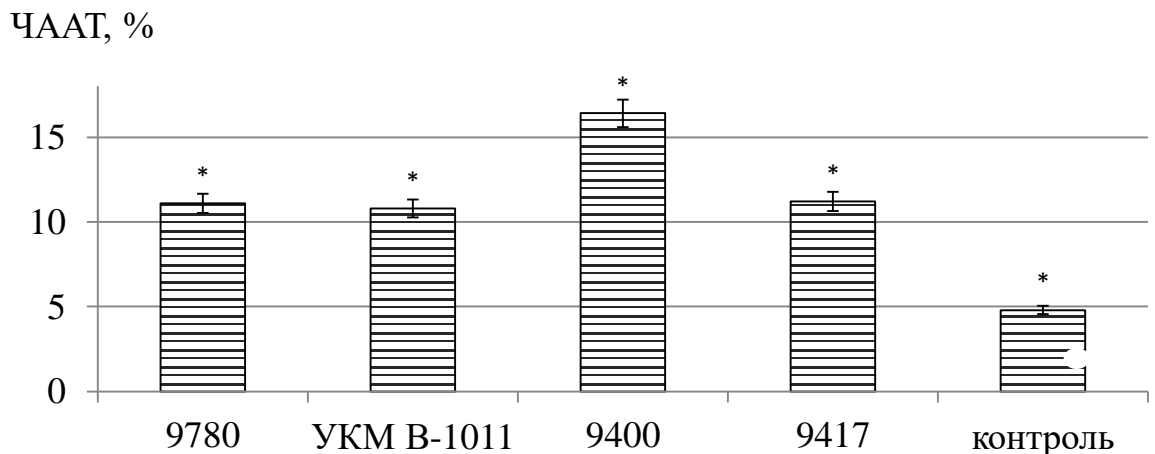


Рис. 6.11 Кількість клітин із пошкодженнями хромосомного апарату в апікальній меристемі за цибулі ріпчастої сорту Халцедон за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*: * – наявність статистично значущих відмінностей від контрольних показників ($p < 0,05$)

Значить, ЛПС фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* проявляють мутагенну активність в *A. cerea*-тесті у концентрації 5,0 мг/мл незалежно від вірулентних властивостей і серологічної приналежності штамів, із яких було виділено ЛПС.

Таким чином, ЛПС фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* виявляють генотоксичну дію в *A. cerea*-тесті у концентрації 5,0 мг/мл. Таку властивість ЛПС інших патогенних видів бактерій відмічено і за дії на клітини людини та тварин [280, 473]. Можливо, здатність зумовлювати порушення генетичного матеріалу в еукаріотичних клітинах, що діляться, притаманна усім ЛПС. Питання механізму та специфічності дії ЛПС, виділених із грамнегативних бактерій різних видів, щодо еукаріотичних клітин залишається відкритим. Відомо, що виникнення мутацій у клітинах людини і тварин за

участю ЛПС пов'язане із оксидативним стресом [492]. Ймовірно, що такі самі процеси відбуваються і за дії ЛПС на рослинні клітини. Проте дані літератури щодо здатності цього біополімеру підвищувати вміст кисневих радикалів у рослинах суперечливі [254, 260, 413].

Таким чином, нами встановлено, що ЛПС неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011 не проявляє мутагенну активність в тесті Еймса з тест-штамами *S. typhimurium* та характеризується здатністю зменшувати пошкоджуючу дію біхромата калію в тесті Еймса з обома штамми *S. typhimurium* та у концентраціях 5,0 мг/мл і антимуtagenною активністю щодо індукованого МННГ мутагенезу в тесті Еймса із штамом *S. typhimurium* ТА100. ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, як і ЛПС збудника базального бактеріозу пшениці, не спричинює мутагенного впливу на *S. typhimurium* ТА98 та *S. typhimurium* ТА100. При цьому активність ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, одержаних різними методами, була однаковою. Не мали мутагенної дії на *S. typhimurium* ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544 та ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922. ЛПС бактерій патоварів *P. syringae* характеризуються здатністю зменшувати кількість індукованих біхроматом калію та МННГ реверсій у тест-штамів *S. typhimurium*. Антимуtagenну активність ЛПС у цьому тесті, на нашу думку, обумовлено наявністю полісахариду у складі молекули ЛПС. Фітопатогенні бактерій *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens* не утворюють метаболітів із мутагенною дією в тесті Еймса за культивування в лабораторних умовах та не спричинюють активацію промутагену 3,3'-діамінобензидину. Показано, що ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* пригнічують мітотичний індекс та виявляють здатність порушувати цілісність хромосом у клітинах апікальної меристеми *A. cerea* сорту Халщедон.

6.4 Ліпополісахариди *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* і пухлиноутворення

Дослідження кількох минулих десятиліть свідчать, що інфікування макроорганізму може призвести до нестабільності геному хазяїна, що часто слугує підґрунтям для розвитку онкологічних хвороб [352]. Однак даних щодо зв'язку між інфекційними хворобами, геномодулювальною активністю інфекційних агентів та розвитком онкологічних хвороб на сьогодні недостатньо [352]. Виходячи із отриманих нами даних щодо мутагенної дії ЛПС фітопатогенних бактерій та враховуючи дані літератури стосовно зв'язку мутагенної дії та пухлиноутворення було проведено визначення впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* на процеси утворення пухлин.

Відомо, що ЛПС фітопатогенних бактерій можуть впливати на розвиток пухлин різного типу. Вплив цей може бути як позитивним, так і негативним. ЛПС фітопатогенних бактерій виду *Ralstonia solanacearum* здатні прискорювати ріст первинних пухлин карциноми легенів Льюїса, меланоми В-16, саркоми S-37. Однак, тривалість життя тварин з експериментальними лейкозами за дії ЛПС *R. solanacearum* подовжується [47]. Відомо, що ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* 90a, *P. syringae* pv. *atropfaciens* К-1025, *P. syringae* pv. *morsprunorum* CF-4, *P. syringae* pv. *tabaci* 225, *P. syringae* pv. *glycinea* L-25 характеризуються слабкою протипухлинною активністю стосовно карциноми Ерліха. Тоді як ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB 281, *P. syringae* pv. *maculicola* 381, *P. syringae* pv. *syringae* (*cerasi*) 435, *P. syringae* pv. *syringae* (*cerasi*) 467, *P. syringae* pv. *tabaci* 223, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. syringae* pv. *tomato* 141R мають стимулюючий вплив на карциному Ерліха [555]. Раніше нами було встановлено, що ЛПС окремих штамів *P. syringae* pv. *atropfaciens* притаманна протекторна активність щодо пухлин, спричинених *A. tumefaciens* на експлантатах картоплі [4].

З огляду на наведені вище дані, дослідження впливу ЛПС збудника базального бактеріозу пшениці на пухлиноутворення має важливе значення. Для

вивчення протипухлинної активності ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 нами було використано як рослинну, так і тваринні моделі пухлиноутворення.

6.4.1 Протекторний ефект ліпополісахаридів щодо спричиненого *Agrobacterium tumefaciens* пухлиноутворення

У світі не існує єдиної стандартизованої моделі для визначення протипухлинної дії. Це обумовлено як складністю процесів, які призводять до утворення пухлин, так і різноманітністю механізмів, які дозволяють певним речовинам впливати на ці процеси, а, відповідно, і різноманітністю підходів для виявлення таких сполук [252]. Пухлини рослин, індуковані *A. tumefaciens*, є легковідтворюваною моделлю пухлинного росту, якій притаманні всі ознаки пухлин тварин [158]. Для скринінгу протипухлинних речовин вже тривалий час використовують індукцію пухлиноутворення за допомогою *A. tumefaciens* на експлантатах бульб картоплі [184, 272, 283]. Показано, що пухлиноутворення, спричинене *A. tumefaciens* на експлантатах бульб картоплі, є зручною та відтворюваною моделлю для первинного скринінгу речовин із протипухлинною активністю [272, 282]. Ця модель дозволяє отримувати статистично достовірні результати ($p = 0,002$), хоча їй все ж таки притаманний незначний відсоток помилково негативних результатів [282]. Протипухлинні препарати, які запобігають утворенню корончастогалових пухлин на експлантатах картоплі, мають також протилежну активність [272].

Для коректної оцінки протипухлинної дії ЛПС в рослинній тест-системі, якою є тест-система *A. tumefaciens* - експлантати картоплі, ми пересвідчилися у відсутності впливу на ріст культури *A. tumefaciens* УКМ В-1006, яку було використано для індукції утворення пухлин на експлантатах картоплі, ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (рис. 6.12).

Нами встановлено, що оброблення експлантатів картоплі розчином ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 призводить до значного зменшення кількості утворених пухлин (рис. 6.13).

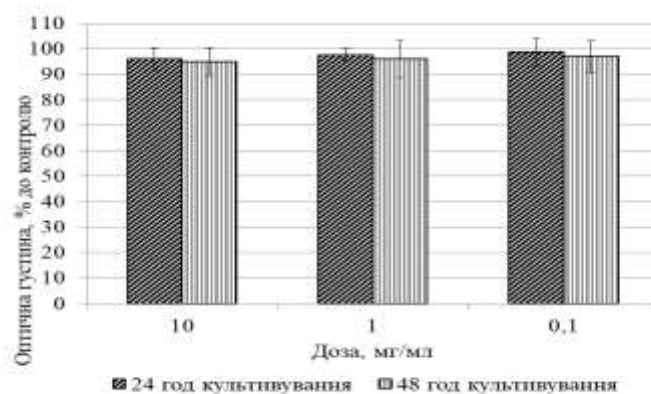


Рис. 6.12 Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на ріст *A. tumefaciens* УКМ В-1006



Рис. 6.13 Індуковане *A. tumefaciens* утворення пухлин на експлантатах картоплі: 1 – експлантати не інокулювали *A. tumefaciens*, 2 – позитивний контроль, необроблені ЛПС експлантати інокулювали культурою *A. tumefaciens*, 4 – експлантати, оброблені розчином ЛПС, 10,0 мг/мл, 5 – експлантати, оброблені розчином ЛПС, 1,0 мг/мл, 6 – експлантати, оброблені розчином ЛПС, 0,1 мг/мл.

За оброблення експлантатів ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 у концентрації 10,0 мг/мл на 70% експлантатів пухлини не утворювалися, у концентрації 1,0 мг/мл пухлини не утворилися на 50% експлантатів, у концентрації 0,1 мг/мл пухлини не утворилися на 20% оброблених експлантатів. На тих експлантатах, де після оброблення розчином ЛПС відповідної

концентрації і клітинами агробактерій утворилися пухлини, кількість їх була значно нижчою, ніж у позитивному контролі (табл. 6.14).

Таблиця 6.14 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на пухлиноутворення, спричинене *A. tumefaciens* УКМ В-1006

Концентрація розчину ЛПС, мг/мл	Послідовність оброблення експлантатів	Кількість експлантатів без пухлин, % до загальної кількості	Кількість пухлин на один експлантат	Зменшення кількості пухлин, % ³
Позитивний контроль ²		0	17,46±0,87	-
Негативний контроль ¹		100	-	-
0,1	до інокуляції <i>A.tumefaciens</i>	20	5,47±0,27	68
1,0		50	6,39±0,31	63
10,0		70	4,01±0,20	77
0,1	після інокуляції <i>A.tumefaciens</i>	3	11,30±0,57	-
1,0		18	11,28±0,56	-
10,0		20	12,56±0,63	-

Примітки: 1 – експлантати, не інокулювали *A. tumefaciens*, пухлини на них не утворювалися, 2 – необроблені ЛПС експлантати інокулювали культурою *A.tumefaciens*, 3 – відсоток зменшення кількості пухлин обчислювали за наявності статистично достовірної різниці між дослідними варіантами та позитивним контролем.

Протипухлинна активність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 залежала як від концентрації розчину ЛПС, що використали для оброблення експлантатів, так і від способу оброблення експлантатів. У разі оброблення експлантатів розчинами ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 після інокуляції агробактеріями пригнічення утворення пухлин було значно меншим. Так, на 80% експлантатів оброблених ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-

1011 у концентрації 10,0 мг/мл спостерігали утворення пухлин і кількість їх достовірно не відрізнялася від кількості пухлин на експлантатах в позитивному контролі (табл. 6.14).

При визначенні впливу на утворення пухлин, індукованих агробактеріями, ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 і 9417, також спостерігали залежність активності як від концентрації, так і від способу оброблення експлантатів [4].

Таким чином, найбільшу протипухлинну активність спостерігали за оброблення експлантатів ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* до інокуляції суспензією клітин *A. tumefaciens*. Відомо, що *A. tumefaciens* можуть індукувати пухлинний процес лише за умови прикріплення до рослинних клітин в певних сайтах зв'язування. Здатність ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* інгібувати утворення пухлин на експлантатах картоплі може бути обумовлено конкуренцією за сайти зв'язування між ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* і клітинами агробактерій. Враховуючи відсутність у ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* антибактеріальної активності, можемо припустити, що ЛПС впливає на процеси прикріплення *A. tumefaciens* до рослинних клітин.

6.4.2 Активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011 щодо формування модельних пухлини у мишей

Відомо, що ЛПС відіграють ключову роль у взаємодії між мікроорганізмами та тваринами й людиною і є надзвичайно сильними стимуляторами вроджених або природних імунітетів у різноманітних еукаріотичних видах, від комах до людей [48, 256, 267]. Ліпід А є первинним імуностимулюючим центром ЛПС [44, 45, 49]. ЛПС або ліпід А викликають численні фізіологічні імуностимулюючі ефекти у організмах ссавців, але у більш високих дозах також можуть призводити до патологічних реакцій, таких як індукція септичного шоку [544]. Було показано, що клітини міелоїдної лінії є основними клітинними датчиками для ЛПС у імунній системі ссавців. Досягнуто величезний прогрес у з'ясуванні центральної системи ЛПС/ліпід А розпізнавання в фагоцитах ссавців. Відповідно до сучасної моделі специфічне

клітинне розпізнавання антагоністичного ЛПС (або ліпиду А) зніщується позаклітинною дією ЛПС-зв'язуючого білка, мембранозв'язаних або розчинних форм рецепторів CD14 і нещодавно ідентифікованого Toll-подібного рецептора 4 (TLR4) [187]. Здатність ЛПС стимулювати імунну систему людини може бути використано для профілактики та терапії інфекційних та злоякісних захворювань.

Значний інтерес викликають дослідження впливу ЛПС на формування пухлин у тварин. Задля вивчення цього питання ми дослідили вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на розвиток карциноми Ерліха та саркоми 37 у мишей.

Встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 не впливав на ріст асцитної форми карциноми Ерліха. В той же час введення тваринам із асцитною формою саркоми 37 ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 збільшувало середній об'єм асцитної рідини (табл. 6.15).

Таблиця 6.15 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на ріст асцитних форм пухлин

Модельна пухлина	Група тварин (n=5)	Середній об'єм асцитної рідини, мл	Середня клітинність ($\times 10^9$)
Карцинома Ерліха	Контроль	2,1 \pm 0,7	1,2 \pm 0,26
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	2,4 \pm 1,6	1,3 \pm 0,23
Саркома 37	Контроль	2,4 \pm 1,7	0,7 \pm 0,18
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	5,7 \pm 2,0*	0,9 \pm 0,19

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем.

Децо зменшувалася також тривалість життя тварин з цією формою пухлини за введення розчину ЛПС (табл. 6.16), але достовірної різниці у

тривалості життя в контрольній та дослідній групах тварин не було встановлено.

Таблиця 6.16 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на виживаність мишей з трансплантованими асцитними формами пухлин

Модельна пухлина	Група тварин (n=5)	СТЖ, діб	ЗТЖ, %
Карцинома Ерліха	Контроль	15,8±4,0	-
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	17,4±4,9	10,1
Саркома 37	Контроль	25,0±5,6	-
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	23,6±2,9	-5,6*

Примітка. Тут і в табл. 6.19. * - спостерігали збільшення тривалості життя, СТЖ – середня тривалість життя, ЗТЖ – зниження тривалості життя.

За введення ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 тваринам з солідною формою карциноми Ерліха спостерігали стимулювання росту пухлини (табл. 6.17).

Таблиця 6.17 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на ріст солідних форм пухлин

Модельна пухлина	Група тварин (n=5)	Середня маса пухлини, мг	Гальмування росту пухлини, %
Карцинома Ерліха	Контроль (n=5)	86,6±63,8	-
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011 (n=10)	167,5±119,0	-93,4*
Саркома 37	Контроль (n=5)	132,6±110,2	-
	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011 (n=10)	55,5±46,5	58,1

Примітка. * - спостерігали стимулювання росту пухлини.

У разі введення ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 тваринам з солідною формою саркоми 37 середня маса пухлини зменшувалася на 58,1% (табл. 6.17). При цьому середня тривалість життя тварин з обома видами пухлин не змінювалася (табл. 6.18).

Таблиця 6.18 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 на виживаність мишей з трансплантованими солідними формами пухлин

Модельна пухлина	Група тварин (n=5)	СТЖ, діб	ЗТЖ, %
Карцинома	Контроль	54,6±13,0	-
Ерліха	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	59,1±17,	8,2
Саркома	Контроль	48,1±16,8	-
37	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	47,8±15,4	-0,6*

Таким чином, введення тваринам з відтвореними модельними системами пухлинного росту (асцитні і солідні форми різних за гістогенезом пухлин) ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 не має статистично достовірного впливу на перебіг пухлинного процесу і не відзначається помітною протипухлинною активністю.

Таким чином, дослідженому ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 притаманні протипухлинні властивості за використання його в період інокуляції експлантатів *A. tumefaciens*. Оброблення експлантатів через добу після інокуляції *A. tumefaciens* є менш ефективним. Однак, з огляду на те, що прикріплення клітин *A. tumefaciens* відбувається в основному протягом перших 15 хв, значне зниження інтенсивності утворення пухлин внаслідок оброблення експлантатів ЛПС через добу після зараження *A. tumefaciens* вказує на те, що ЛПС впливає не лише на прикріплення бактерій, але й на перебіг інфекційного процесу.

Щодо впливу ЛПС на утворення пухлин, спричинене *A. tumefaciens*, в літературі є дані про здатність ЛПС вірулентних штамів цих бактерій запобігати утворенню пухлин на рослинах. Так, у разі інфільтрації ЛПС *A. vitis* у вузлові сегменти виноградної лози (*Vitis vinifera*) за добу до інокуляції *A. vitis* попереджувалося формування пухлин [188]. ЛПС *A. tumefaciens* не інгібують пухлиноутворення, зумовлене цими бактеріями, у разі використання їх після інокуляції агробактеріями [535]. Протипухлинна дія ЛПС *A. tumefaciens* пояснюється конкуренцією за сайти прикріплення на рослинних клітинах. В літературі відсутні дані щодо впливу ЛПС інших видів бактерій на формування пухлин, індуковане *A. tumefaciens*.

Для проявлення вірулентності *A. tumefaciens* необхідні зовнішні фактори. Такі фактори надходять із пошкодженої поверхні рослин. Це, зокрема, фенольні сполуки та моносахариди – такі як D-галактоза, D-фукоза і L-арабіноза [232]. В О-ланцюзі ЛПС *A. tumefaciens* містяться протилежні тим, що необхідні для активації генів вірулентності, конфігурації цих моносахаридів L-фукоза і D-арабіноза [251]. В О-ПС ЛПС досліджуваних патоварів *P. syringae* міститься D-фукоза – моносахарид, що спричинює активацію генів вірулентності *A. tumefaciens*, однак він є ацетильованим. Тобто, в ЛПС досліджуваних бактерій не містяться моносахариди, які активують гени вірулентності *A. tumefaciens*.

Отже, ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* здатні запобігати спричиненому агробактеріями пухлиноутворенню. Протипухлинна активність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* залежала як від концентрації розчину ЛПС, що використали для оброблення експлантатів, так і від способу оброблення експлантатів. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 запобігає пухлиноутворенню за використання його в період інокуляції експлантатів *A. tumefaciens*. У разі оброблення експлантатів розчинами ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 після інокуляції агробактеріями на 80% експлантатів оброблених ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 у концентрації 10,0 мг/мл спостерігали утворення пухлин і кількість їх достовірно не відрізнялася від кількості пухлин на експлантатах в позитивному контролі. Однак, з огляду на те, що

прикріплення клітин *A. tumefaciens* відбувається в основному впродовж перших 15 хв, значне зниження інтенсивності утворення пухлин внаслідок оброблення експлантатів ЛПС через добу після зараження *A. tumefaciens* вказує на те, що ЛПС впливає не лише на прикріплення бактерій, але й на перебіг інфекційного процесу. Для ЛПС інших штамів збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 і 9417 так само спостерігали залежність протипухлинної активності як від концентрації, так і від способу оброблення експлантатів [4]. Введення тваринам з відтвореними модельними системами пухлинного росту (асцитні і солідні форми різних за гістогенезом пухлин) ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011 не має статистично достовірного впливу на перебіг пухлинного процесу і не відзначається помітною протипухлинною активністю.

Основні наукові результати розділу опубліковано в працях автора [5, 15, 20, 26, 33, 38, 39, 52, 75, 165, 228, 229].

РОЗДІЛ 7

ВПЛИВ ЗБУДНИКА БАЗАЛЬНОГО БАКТЕРІОЗУ ПШЕНИЦІ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ В РОСЛИННИХ КЛІТИНАХ

Як правило, проникнення патогена в організм хазяїна індукує у нього стрес. Одним з перших етапів відповіді рослини на біотичний стрес є утворення активних форм кисню (АФК), зокрема, пероксиду водню і супероксиданіон-радикалу [107, 253]. Індукування оксидативного стресу та синтез АФК відбувається як за участі інтактних клітин мікроорганізмів, так і окремих їхніх компонентів, наприклад, ЛПС [107, 253]. Відомо, що АФК впливають на генетичний матеріал організмів, зокрема, різке зростання вмісту цих сполук може спровокувати пошкодження ДНК [160].

Ліпополісахариди (ЛПС) фітопатогенних бактерій мають визнаний статус факторів патогенності [260, 254]. Однак більш детальний аналіз даних щодо впливу цих біополімерів на рослини доводить, що вони можуть проявляти як токсичну активність, так і бути стимуляторами росту для рослин [73, 260]. При цьому результат впливу ЛПС на рослинні клітини залежить як від властивостей (походження, метод виділення, концентрація) самого ЛПС, так і від властивостей рослини (фаза розвитку, сорт). Тому дослідження впливу ЛПС фітопатогенних бактерій на рослини не втрачають актуальності. Вважають, що мутагенна активність ЛПС для клітин ссавців опосередкована АФК [352]. Щодо впливу ЛПС на рослинні клітини однозначної відповіді в науковій літературі немає.

7.1 Перебіг фізіолого-біохімічних процесів у рослинах пшениці за взаємодії із збудником базального бактеріозу

Збудники бактеріальних хвороб значним чином впливають на перебіг фізіолого-біохімічних процесів у клітинах рослини-хазяїна. Однак, такі взаємодії детально вивчено лише для окремих видів модельних рослин і

залишається не дослідженим для широкого кола взаємодій патоген-хазяїн. Виходячи із цього нами було вивчено вплив збудника базального бактеріозу безпосередньо на рослини пшениці.

Вирощування стійких сортів зернових культур є однією із перспективних систем біоконтролю фітопатогенних бактерій. Проблема комплексної стійкості генотипів проти найнебезпечніших хвороб до теперішнього часу не вирішена. Причинами цього є генетична складність ознаки, нестабільність генома і мікроеволюційні зміни в системі "хазяїн-патоген", а також виникнення високостійких біотипів патогенів на фоні застосування підвищених обсягів пестицидів [170], поступового зростання тривалості середніх температур вегетаційного періоду, частки монокультури та генетичної однорідності сортів, які вирощують. Для забезпечення селекційних програм необхідною умовою є пошук нових джерел стійкості до бактеріальних хвороб, що дозволить ефективно і мобільно оптимізувати, прискорити й підвищити результативність селекційного процесу, створити нові сорти та гібриди з високою стійкістю до збудників хвороб [170].

За штучної інокуляції сортів пшениці збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1011 спостерігали ураження у вигляді світло-коричневих чи бежевих плям з коричневою або коричнево-бурою облямівкою на лусочках і листках. Характер розвитку некрозів був різний – від окремих плям різного розміру до ураження всієї листової пластинки. Некрози були круглі або видовжені, поширювалися вздовж листової пластинки. Необхідно зауважити, що сорти озимої і ярої пшениці мали різну стійкість за штучної інокуляції, зокрема розвиток симптомів для сорту Фаворитка дорівнював в середньому 1,5 бали (табл. 7.1). Меншою стійкістю характеризувалися сорти ярої пшениці Печерянка і Гренні, для яких середній бал розвитку симптомів штучного ураження становив 3,5 і 4 бали, за якого спостерігали поширення плями на поверхні листка та утворення хлоротичної ділянки навколо ураження.

Таблиця 7.1 – Стійкість сортів пшениці до збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011

Культура	Сорт	Розвиток симптомів штучного ураження на сходах, середній бал
Озима пшениця	Кубус	2,5
	Патрас	2,5
	Фаворитка	1,5
Яра пшениця	Гренні	4,0
	Печерянка	3,5

Увагу було приділено, зокрема, впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens* на стан, фотохімічну активність фотосинтетичного апарату, а також активність антиоксидантних ферментів рослин пшениці. Для цього здійснювали інокуляцію рослин пшениці ярої сорту Печерянка суспензією клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771.

Дослідження впливу збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 на активність антиоксидантних пігментів показало суттєве зростання каталазної (на 23%) і пероксидазної активності (на 119%) в листках інфікованих рослин пшениці ярої сорту Печерянка (табл. 7.2). Співвідношення ж ферментативної активності каталазної до пероксидазної мало наступну динаміку: 1,63 (у контролі), 0,9 (за бактеріального ураження). Отже, за штучної інокуляції рослин пшениці ярої сорту Печерянка збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 спостерігали підвищення активності термінальних оксидаз в тканинах листків, і зниження їх співвідношення у бік пероксидазної активності (через тиждень після інокуляції).

Як відомо антиоксидантна система є механізмом системної фітостійкості, зокрема, її компоненти – каталази і пероксидази. Ці ферменти підтримують стійкість рослин завдяки своїй здатності до деактивації вільних радикалів і їх похідних, що руйнують рослинну клітину [60, 126, 220]. Каталаза (ЕС 1.11.6) й

пероксидаза (ЕС 1.11.7), як компоненти антиоксидантної системи відновлюють пероксид водню до води, використовуючи як відновники різні сполуки [126].

Таблиця 7.2 – Вплив *P. syringae* pv. *atrofaciens* на активність антиоксидантних ферментів пшениці

Варіанти дослідів	Каталазна активність,		Пероксидазна активність,	
	мл O ₂ ·Г ⁻¹ 1·мин ⁻¹	% до контролю	ΔД ₆₇₀ Г ⁻¹ ·с ⁻¹	% до контролю
Контроль (без інокуляції)	1,73±0,08	-	1,062±0,053	-
Інокуляція рослин пшениці <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9771	2,13±0,10	123	2,330±0,116	219

У складі системи антиоксидантного захисту ці ферменти діють як сильні радіопротектори, нейтралізуючи метаболіти кисню й вільні радикали. Каталаза захищає клітину від пероксиду водню, що генерується внутрішньоклітинно, а пероксидаза – обумовлює специфічні внутрішньоклітинні окисні процеси за участі пероксиду, що призводять до утворення важливих метаболітів [126, 220].

Отже, через 11 діб після інокуляції рослин фітопатогеном показано підвищення ферментативної активності компонентів антиоксидантного захисту, що зумовлювало стимулювання стійкості дослідних рослин пшениці, завдяки чому гомеостаз рослинної клітини підтримувався на достатньому рівні для забезпечення захисту клітинних компонентів від руйнування вільними радикалами та їх похідними. Нами було висунуто припущення, що метаболізм спрямований на стабілізацію цілісності, ймовірно знижує підтримку біосинтетичних процесів в тканинах.

Нами встановлено зменшення вмісту в листках інфікованих рослин основних фотосинтетичних пігментів: вміст хлорофілу *a* знизився на 55,5 %, а хлорофілу *b* - на 66,7 %. Вміст каротиноїдів, що є додатковими пігментами, а

також виконують захисну функцію, знижувався вдвічі (табл. 7.3). Таке суттєве зниження вмісту пігментів могло бути зумовленим як зниженням рівня витрати асимілятів на біосинтетичні процеси в умовах окиснюваного стресу, так і більш швидким руйнуванням пігментних комплексів.

Таблиця 7.3 – Вплив *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 на вміст фотосинтетичних пігментів в листках пшениці ярої сорту Печерянка

Варіанти дослідів	Пігменти, мг/г		
	Хлорофіл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	Каротиноїди
Контроль (без інокуляції)	0,9±0,04	0,6±0,02	0,2±0,01
Інокуляція рослин пшениці <i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9771	0,4±0,01	0,2±0,01	0,1±0,003

Таким чином, на початковому етапі розвитку симптомів базального бактеріозу – через тиждень після інокуляції рослин пшениці ярої його збудником *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 спостерігали суттєве підвищення ферментативної активності компонентів антиоксидантного захисту – каталази і пероксидази, що свідчить про запуск механізмів клітинної відповіді на вторгнення патогену, але за цих умов вдвічі знижувався вміст основних фотосинтетичних пігментів в листкових пластинках, що могло бути зумовлено як зниженням рівня витрати асимілятів на біосинтетичні процеси, так і більш швидким руйнуванням пігментних комплексів в умовах окиснюваного стресу. Тому для з'ясування особливостей впливу інфікування *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 рослин пшениці ярої ми дослідили окремі функціональні ланки фотосинтетичного апарату біофізичним методом індукції флуоресценції за допомогою портативного приладу «Floratest». На рис. 7.1 показані типові індукційні криві Каутського, що відображують вплив на функціональні ланки ФС II.

Аналіз критичних параметрів індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) виявив збільшення непродуктивних витрат квантів світла при його міграції по

пігментній матриці на початку швидкої фази флуоресценції, (що показує зміна параметру F_0) коли всі реакційні центри відкриті і до них йде максимум енергії збудження (табл. 7.4).

Підвищення фонові флуоресценції (F_0) на 11,4% (через 7 діб після інокуляції збудником базального бактеріозу) та на 54,9 % (через 12 діб) свідчить про суттєве зменшення ефективності поглинання квантів світла, завдяки деградації пігментних комплексів, зменшення концентрації хлорофілу в листках, що підтверджувалося аналізом вмісту хлорофілу *a* (табл. 7.3), оскільки відомо, що саме цей пігмент має здатність до флуоресценції і входить до складу ФС II.

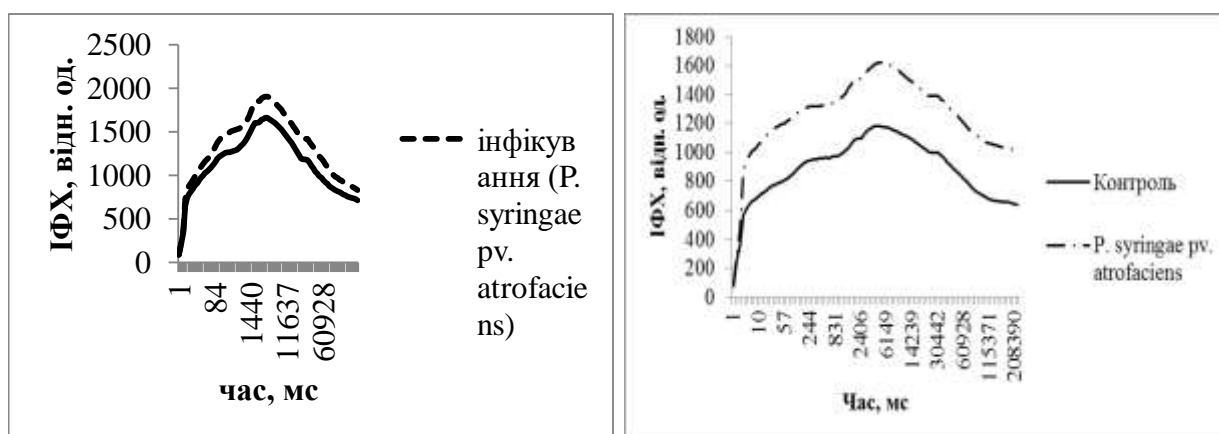


Рис. 7.1 Індуковані зміни флуоресценції хлорофілу за штучної інокуляції рослин пшениці ярої сорту Печерянка *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771: А – на 7-у і Б – 12-у добу після інокуляції

Суттєве зростання F_{pl} – на 42,0 % є показником блокування електронного транспорту в ЕТЛ, а значить зниження ефективності залучення фотонів у «світловій» фазі фотосинтезу. Про це також свідчить шестикратне збільшення показника K_{pl} при бактеріальному інфікуванні та критичне зростання вмісту Q_b – невідновлювальних комплексів, які не беруть участь у лінійному транспорті електронів (табл. 7.4).

Таблиця 7.4 – Критичні точки ІФХ за дії збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* рослин пшениці ярої сорту Печерянка

Варіанти дослідів	Параметри				
	F ₀	F _{pl}	K _{pl}	qF	K _i
7 днів після інокуляції					
Контроль (без інокуляції)	656	1189	0,58	1,32	0,57
Інокуляція рослин пшениці <i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9771	731	1456	0,65	1,28	0,56
12 днів після інокуляції					
Контроль (без інокуляції)	565	909	0,39	1,57	0,57
Інокуляція рослин пшениці <i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9771	875	1291	2,60	0,17	0,37

За цих умов коефіцієнт індукції (K_i), який корелює з активністю рибульозобісфосфат карбоксилази (основного ферменту циклу Кальвіна) й зазвичай свідчить про ефективність темнових реакцій фотосинтезу, був на рівні контролю, а на 12 день після штучної інокуляції – знижувався на 35% (табл. 7.4), що свідчить про поступове пригнічення ефективності темнових процесів із ростом впливу збудника базального бактеріозу, що поглиблювався із часом.

Однак рівень флуоресценції залежить від цілої низки молекулярно-біохімічних процесів, активація яких при адаптації до світла призводить до зниження рівня сигналу флуоресценції хлорофілу (гасіння флуоресценції, qF) [109, 317]. Фотохімічний його бік (фотохімічне гасіння) залежить від окислювально-відновлювального стану первинного переносника електронів - Q_A, тоді як не фотохімічне – від рівня теплової дисипації енергії збудження. В той же час, рівень фотохімічного гасіння може варіювати в широких межах,

підвищуючись при відновленні Q_A й знижуючись при його окисненні, що контролюється головним чином рівнем метаболізму вуглецю (цикл Кальвіна) [109]. Суттєве зниження цього показника по відношенню до його рівня у контрольних рослин через тиждень і його поглиблення через 12 діб після штучної інокуляції фітопатогеном свідчить про зростання рівня окисності первинного переносника фотохімічної енергії Q_A , а значить інгібування процесів, що підтримують електронний транспорт та процесів, у яких витрачаються АТФ і НАДФН₂.

Отже, інфікування збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* призводить до зростання активності ферментів антиоксидантного захисту – каталазної і пероксидазної на 11 добу після інокуляції. Разом з тим спостерігали суттєве зменшення кількості пігментів у листках інфікованих рослин пшениці ярої: хлорофілу *a*, хлорофілу *b* і каротиноїдів.

Відмічені функціональні порушення фотосинтетичного апарату рослин ярої пшениці, інокульованої збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771, зниження кількості активного хлорофілу, що залучається до передачі електронів на РЦ, зростання кількості Q_b – невідновлювальних комплексів, які не беруть участь у лінійному транспорті електронів, що призводить до пригнічення ефективності темної фази фотосинтезу, тобто погіршення асиміляції вуглецю.

7.2 Зміни функціонального стану фотосинтетичного апарату та активності оксидоредуктаз пшениці за дії ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

При вивченні впливу збудника базального бактеріозу пшениці на рослину особливу увагу приділяють його ЛПС, оскільки саме із цими молекулами пов'язують процеси впізнавання, індукції захисних реакцій та розвитку патологічного процесу при інфікуванні рослин фітопатогенними бактеріями [260, 555]. ЛПС фітопатогенних бактерій при потраплянні в рослину індукує

синтез низки біоактивних медіаторів, зокрема, продуктів генів захисту і антимікробних метаболітів та спричинює зміни перебігу звичайних фізіолого-біохімічних процесів в рослинних клітинах [260, 2000]. Оброблення рослин ЛПС бактерій *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa* та *E. carotovora* активує гормон-залежну NO-синтазу та індукує утворення оксиду азоту і АФК [254, 556], ЛПС *R. solanacearum* активують розчинну пероксидазу [409, 413]. Ін'єкція розчину ЛПС патогенів *P. syringae* під епідерміс листків тютюну, капусти, томатів і стручків квасолі сприяє появі початкових симптомів захворювання, а іноді – некрозів і слабкої гіперплазії тканин [297, 196].

Відомо, що ЛПС може індукувати зміни поверхні рослинної клітини. За допомогою електронної мікроскопії виявлено, що введення цієї макромолекули в листки тютюну зумовлює відокремлення плазмалемі від клітинної стінки, акумуляцію везикулярного та гранульованого матеріалу у просторі між клітинною стінкою хазяїна і плазмалею. Також цей біополімер сприяє накопиченню калози та потовщенню клітинної стінки в листках перцю [260].

Таким чином, ЛПС відіграють важливу роль у процесах патогенезу і здатні індукувати захисні реакції у рослин. Проте взаємодія ендотоксинів із макроорганізмами є складною і на сьогодні вивчена недостатньо.

Для досліджень пророщували насіння ярої пшениці сорту Печерянка у розчинах ЛПС концентрацією 5 мг/мл впродовж 7-8 діб. Виявили суттєвий стимулюючий вплив на вміст хлорофілу обробки ЛПС різних штамів *P. syringae* рв. *atofaciens* на пігментний склад листків рослин пшениці ярої сорту Печерянка. Найбільш суттєве зростання вмісту хлорофілу *a* і хлорофілу *b* – на 70,0 і 72,7 % відповідно спостерігали за дії ЛПС *P. syringae* рв. *atofaciens* УКМ В-1011 (табл. 7.4).

Таблиця 7.4 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на вміст фотосинтетичних пігментів в листках пшениці ярої сорту Печерянка

ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> (штам)	Пігменти,							
	Хлорофіл <i>a</i>		Хлорофіл <i>b</i>		Хлорофіл <i>a+b</i>		Каротиноїди	
	мг/г	% до контр.	мг/г	% до контр.	мг/г	% до контр.	мг/г	% до контр.
Контроль	0,20±0,010	100,0	0,11±0,01	100,0	0,31±0,008	100,0	0,07±0,003	100,0
УКМ В-1011	0,34±0,017	170,0	0,19±0,01	172,7	0,53±0,013	170,9	0,07±0,003	100,0
9400	0,22±0,011	110,0	0,12±0,01	109,1	0,34±0,009	109,7	0,07±0,003	100,0
9417	0,22±0,011	110,0	0,12±0,01	109,1	0,34±0,009	109,7	0,06±0,003	85,7
9780	0,23±0,011	115,0	0,13±0,0	118,2	0,36±0,009	116,1	0,05±0,002	71,4

Вміст у листках хлорофілу *a* на інших варіантах обробки – ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 і 9417 зростав однаково – на 10,0 %, а за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 – на 15,0 %. У листках проростків за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 і 9417 – концентрація хлорофілу *b* зростала слабко – на 9,1%, тоді як на 4-му варіанті більш суттєво – на 18,2%. Вміст каротиноїдів у листках, що як відомо є захисними пігментами, при пророщування у ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 і 9400 залишався на рівні контрольних рослин, тоді як при застосуванні ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 знижувався – на 14,3%, а у варіанті із застосуванням ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 знижувався більш суттєво – на 28,6 % (табл. 7.4).

За дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 каталазна активність в листках паростків ярої пшениці сорту Печерянка зменшувалася на 22,9 %, тоді як за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 каталазна активність достовірно не відрізнялася від контролю (табл. 7.5).

Таблиця 7.5 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на активність оксидоредуктаз рослин пшениці

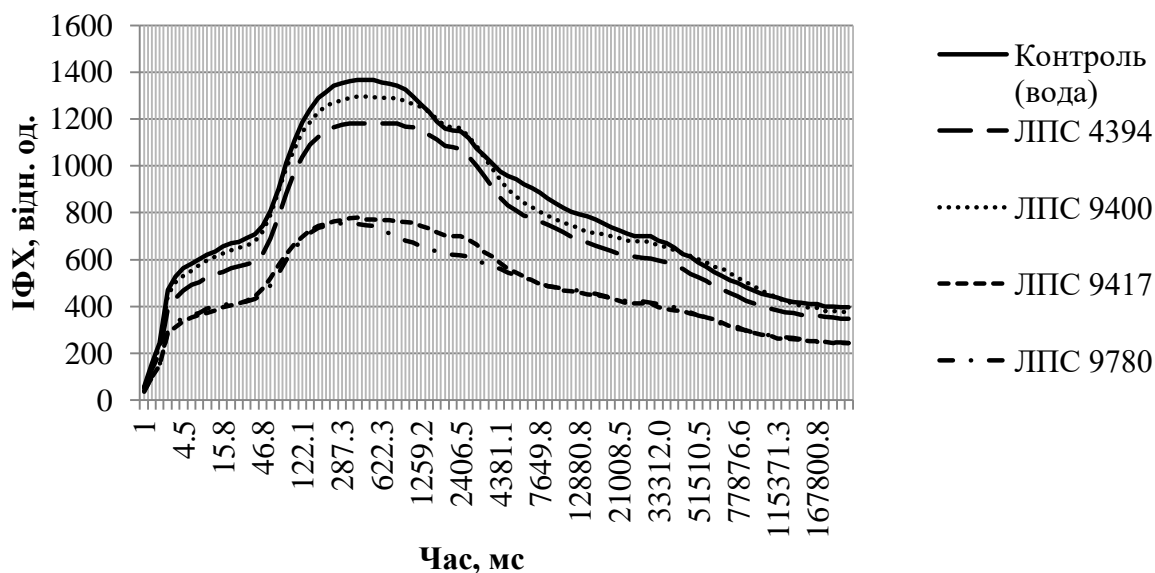
ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> (штам)	Каталазна активність,		Пероксидазна активність,	
	мл O ₂ ·Г ⁻¹ ·мин ⁻¹	% до контролю	ΔД ₆₇₀ Г ⁻¹ ·с ⁻¹	% до контролю
Контроль (вода)	189,6±9,4	100,0	4,45±0,22	100,0
УКМ В-1011	146,2±7,3*	77,1	3,88±0,19*	87,2
9400	174,3±8,7	94,5	4,57±0,22	102,6
9417	184,5±9,2	97,3	4,67±0,23	104,9
9780	191,5±9,5	101,0	4,64±0,23	104,3

* – статистично достовірні відмінності від контролю при $p < 0,05$

Пероксидазна активність в листках паростків ярої пшениці сорту Печерянка знижувалася у варіанті з розчином ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 і достовірно не відрізнялася від контролю за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* штамів 9417, 9780 і 9400 (табл. 7.5).

Враховуючи вплив збудника *P. syringae* pv. *atrofaciens* на вміст фотосинтетичних пігментів у листках пшениці було визначено фотохімічну активність листків цієї культури за дії ЛПС збудника біофізичним методом індукції флуоресценції хлорофілу (ІФК).

Відомо, що флуоресціює в основному хлорофіл *a* фотосистеми II (ФС II). Зміна його флуоресценції відображає зміни окислювально-відновлювального стану реакційних центрів (РЦ) цієї фотосистеми [278, 309]. Отримані індукційні криві Каутського наведено на рисунку 7.2. Для детального аналізу ланок впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на фотосинтетичний апарат рослин були розраховані критичні параметри цих кривих, що відображують функціональний стан ФС II.



ІФХ – індукція флуоресценції хлорофілу

Рис. 7.2 Індуковані зміни флуоресценції хлорофілу у листках рослин пшениці за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Відомо, що такий показник, як фонові флуоресценція (F_0) характеризується емісією фотонів на початку швидкої фази флуоресценції, коли всі реакційні центри молекул хлорофілів-уловлювачів відкриті і поглинута енергія мігрує по пігментній матриці. Зазвичай така флуоресценція мінімальна – близько 3%, а її зростання свідчить про порушення зв'язків між молекулами хлорофілу, їх деградацію чи синтез нових молекул [8]. Зазвичай, величина F_0 зростає за дії будь-яких стресових чинників – підвищення температури, дефіциту живлення, дії фітопатогенів та ін., а значить зменшується частка поглинутої енергії збудження [8, 109]. Нами виявлено суттєве зниження фонові флуоресценції у листках пшениці сорту Печерянка, яке відбувалось у варіантах із обробкою ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* штамів 9417 і 9780 – на 38,7 і 37,4% відповідно, за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 – на 16,6%, тоді як у варіанті з ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 фонові флуоресценція достовірно не відрізнялася від контролю (табл. 7.6). Таке зниження фонові флуоресценції відбувалось за зростання загального вмісту хлорофілу у листках (табл. 7.4).

Таблиця 7.6 – Термінальні параметри індукції флуоресценції хлорофілу рослин пшениці за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*

ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	Параметри флуоресценції хлорофілу				
	F_0	$K_1=Fv/F_0$	K_{pl}	K_i	qF_2
Контроль (вода)	470±23,5	0,64±0,03	0,220±0,01	0,77±0,03	2,44±0,12
ЛПС УКМ В-1011	392±19,6	0,65±0,03	0,213±0,01	0,77±0,03	2,39±0,12
ЛПС 9400	448±22,4	0,65±0,03	0,215±0,01	0,81±0,04	2,45±0,12
ЛПС 9417	288±14,4	0,63±0,03	0,225±0,01	0,69±0,03	2,16±0,11
ЛПС 9780	294±14,7	0,60±0,03	0,239±0,01	0,74±0,04	2,09±0,10

Інший розрахунковий показник – K_1 , що відповідає потенційній ефективності фотохімії ФС II та збагаченню листків фотохімічно активними центрами, що відображає ефективність запасання енергії світла на початкових етапах фотосинтезу, дорівнював контролю у листках паростків ярої пшениці сорту Печерянка за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, 9400, 9417. У варіанті із обробкою ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 цей показник дещо знижувався (від 0,64±0,03 у контролі до 0,60±0,03 у досліді). За обробки цим ЛПС також відмічене суттєве пригнічення вмісту каротиноїдів (табл. 7.4). Таке зниження K_1 свідчить про деструктивний вплив досліджуваних ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 на функціональну активність первинних процесів фотосинтезу в листках пшениці. Отже, хоча за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 зростав вміст хлорофілу у листках, але його функціональна активність пригнічувалась.

За розрахунками показника K_{pl} , зростання якого свідчить про сповільнення лінійного транспорту електронів до реакційних центрів ФС II (що

є показником стресу), ми виявили найбільш суттєве зростання його величин за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780, тоді як у варіанті з ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 спостерігали лише тенденцію до його зростання, а застосування ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 не впливало на цей показник (табл. 7.6).

Величина коефіцієнту індукції, що корелює із активністю ключового ферменту циклу Кальвіна рибулозобісфосфаткарбоксилазою і опосередковано відповідає ефективності перебігу темної фази фіксації вуглецю [8], зростала лише за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 – на 5,2 %. За дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 величина коефіцієнту індукції (K_i) була на рівні контролю (табл. 7.6).

Величина параметру гасіння флуоресценції (qF_2) у варіантах із застосуванням ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* штамів УКМ В-1011 і 9400 сягала контрольного рівня (табл. 7.6). Цей параметр знижувався за дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 на 11,5 % та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 – на 14,3%. Варто зазначити, що зміни параметру гасіння флуоресценції відображують зміни окисно-відновного стану компонентів у ланцюзі електронного транспорту й первинного переносника електронів Q_A . Зростання qF , пов'язано із активуванням реакцій, які йдуть з використанням АТФ і НАДФН₂, що прискорює окислення компонентів в ланцюзі електронного транспорту, відтік електронів від Q_A й залучення їх у реакціях циклу Кальвіна [8, 109]. Відповідно до отриманих нами даних ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 пригнічували ці процеси, сповільнюючи перебіг темної фази фотосинтезу.

Узагальнюючи можна сказати, що за дії ЛПС усіх досліджених штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* у листках 7-добових рослин пшениці сорту Печерянка збільшувалася кількість хлорофілів $a+b$, яке супроводжувалося зниженням функціональної активності фотосинтетичного апарату, що розповсюджувалося не лише на «світлову» ланку фотосинтезу, а й на ефективність «темнових» реакцій циклу Кальвіна, знижуючи їх ефективність.

Отже, досліджувані ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* спричинювали зростання вмісту фотосинтетичних пігментів – хлорофлів *a* і *b* при зниженні вмісту каротиноїдів (для ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* 9417 і ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* 9780), а також відмічено тенденцію до сповільнення як «світлової» так і «темної» фаз фотосинтезу. Необхідно зазначити, що ступінь прояву пригнічуючого впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* на процеси фотосинтезу залежала від штаму, із якого виділяли біополімер.

7.3 Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrogena* на фізіолого-біохімічні процеси у *Allium cepa*

Питання механізму та специфічності дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* щодо еукаріотичних рослинних клітин залишається відкритим. Відомо, що виникнення мутацій у клітинах людини і тварин за участю ЛПС пов'язане із оксидативним стресом [492]. Ймовірно, що такі самі процеси відбуваються і за дії ЛПС на рослинні клітини. Проте дані літератури щодо здатності ЛПС підвищувати вміст кисневих радикалів у рослинах суперечливі [260].

Рівень АФК у клітинах регулюється ферментними системами антиоксидантного захисту, зокрема, супероксиддисмутазою, каталазою, пероксидазою [74]. Для виявлення у проростках цибулі оксидативного стресу, індукованого дією ЛПС, ми визначили пероксидазну і каталазну активність, а також вміст малонового альдегіду (МА).

Серед зазначених ферментів велика увага приділяється встановленню участі пероксидази у життєдіяльності рослин. Цей фермент активує пероксид водню, внаслідок чого останній набуває здатності окислювати феноли і ароматичні аміни, діючи як донор електронів. Пероксидаза задіяна як у знешкодженні пероксиду водню, так і в утворенні цієї молекули [74]. Вона відіграє істотну роль у життєдіяльності рослин: процесах органогенезу, регуляції росту, старіння, катаболізму ауксину, захисті від патогенів, регенерації клітин та синтезі клітинної стінки [159].

Встановлено, що розчини ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* впливають на пероксидазну активність проростків *A. cerea*. При цьому у концентраціях 5,0 та 10,0 мг/мл ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, 9400, 9417 спричинюють більш значне зростання активності пероксидази, ніж каталази (табл. 7.8). Найвища пероксидазна активність спостерігається при вирощуванні проростків *A. cerea* у розчинах ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 концентрацією 5,0 мг/мл. За цих умов показники активності зростають у 2,6-2,8 рази порівняно із контролем без оброблення ЛПС.

Таблиця 7.8 – Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* на активність оксидоредуктаз та кількість малонового альдегіду у *A. cerea*

ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> (штам)	Концентрація ЛПС, мг/мл	Пероксидазна активність,% до контролю	Каталазна активність,% до контролю	Малоновий альдегід,% до контролю
УКМ В-1011	10,0	205	97	120
	5,0	260	89	185
9400	10,0	225	75	125
	5,0	280	88	380
9417	10,0	155	102	100
	5,0	140	98	195

Каталаза задіяна переважно у захисті організму від дії АФК. Вміст цього ферменту може збільшуватися після індукування оксидативного стресу у рослин, проте у деяких випадках, зокрема, при інфікуванні мікроорганізмами, його активність не змінюється або навіть пригнічується [74]. МА є біомаркером перекисного окиснення ліпідів і, водночас, може пошкоджувати такі макромолекули як білки та ДНК [248].

У проростках цибулі не спостерігали значної зміни каталазної активності за дії на них розчинів ЛПС (табл. 7.8). У разі пророщування цибулі у розчині ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 концентрацією 10,0 мг/мл каталазна активність знижувалася (76% від контролю).

МА є продуктом перекисного окиснення ліпідів і його наявність часто використовують як маркер оксидативного стресу [293]. За дії на проростки цибулі ЛПС усіх штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* у концентрації 5,0 мг/мл зростає вміст МА. Вміст цього продукту окиснення ліпідів при цьому перевищує контрольний показник у 1,85 - 3,8 рази (табл. 7.8). Необхідно зауважити, що вміст МА збільшується у разі дії на рослини ЛПС у тих концентраціях, які спричинюють підвищення частоти хромосомних аберацій у апікальній меристемі корінців *A. cepa*. Отже, одержані результати дають підстави вважати, що деструкція хромосом у клітинах апікальної меристеми цибулі може бути опосередкована оксидативним стресом, який індукується ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Таким чином, оброблення ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* призводить до підвищення пероксидазної активності у проростках *A. cepa*. Зростання такої антиоксидантної активності свідчить про стресову дію ЛПС досліджуваних штамів на *A. cepa*. Здатність активувати пероксидазу була виявлена і у інших бактерій [260, 496]. Наприклад, виявлено, що пероксидаза і поліфенолоксидаза підвищується за дії *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* та пов'язана із підвищенням стійкості рослин до фітопатогенних бактерій [362, 418]. Підвищення активності пероксидази виявлено також за впливу ЛПС фітопатогенних бактерій на *Nicotiana tabacum* [260]. Водночас відомо, що ураження фітопатогенами рослин може не впливати на активність каталази [357], а у разі індукування мікроорганізмами реакції надчутливості у рослин спостерігається навіть інгібування цього ферменту.

Отже, показано здатність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* змінювати фізіологічний стан рослинного тест-об'єкта, зокрема його оксидативний стан.

Про такі зміни свідчить зростання пероксидазної активності, а також інтенсифікація процесів перекисного окиснення ліпідів. За дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* зростає вміст індикатора оксидативного стресу МА передусім у тих концентраціях, у яких ці ЛПС підвищують частоту появи аберантних анафаз і телофаз у клітинах апікальної меристеми *A. cerea*. Таким чином, можна припустити, що пошкоджувальна дія ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* на генетичний апарат *A. cerea* опосередкована оксидативним стресом.

7.4 Ріст калюсних клітин і тканин пшениці за дії *Pseudomonas syringae* pv. *atrogena*

Збільшення частоти хромосомних аберацій, яке індуковане ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena*, можна розглядати як явище негативного характеру, що призводить врешті до втрати цінних властивостей вирощуваних сортів рослин. З іншого боку, враховуючи мутагенні властивості ЛПС фітопатогенних бактерій, їх можна розглядати одночасно як мутагенний та як селективний фактор при здійсненні клітинної селекції на стійкість до збудників бактеріальних хвороб.

Клітинна селекція є високоефективним шляхом створення вихідного матеріалу із ознаками тривалої стійкості до збудників бактеріальних хвороб. Оскільки втрата сортами стійкості є закономірним процесом через зміни у популяціях збудників, мінливість умов середовища, то і пошук нових джерел стійкості до хвороб, розширення генетичної різноманітності існуючих сортів пшениці, вивчення складу популяції та ідентифікація нових генів стійкості мають бути постійною складовою селекційного процесу цієї культури [116]. Методи такої селекції базуються на визначенні загальної та специфічної реакції калюсних ліній на середовищах з ефективною дозою селективних агентів у контрольованих умовах, подальшій регенерації в умовах *in vitro* із відібраних експлантатів рослин-регенерантів, їхнього прискореного розмноження, первинній адаптації та отриманні генеративного покоління [96]. Задля відбору

на стійкість необхідно використовувати токсини, які мають вирішальне значення для розвитку хвороби. У випадках коли не має повних даних про значення кожного із токсинів в етіології хвороби, доцільно використовувати повний набір метаболітів бактерій – культуральний фільтрат або інактивовані клітини [96].

Саме тому нами було здійснено дослідження клітин та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* як селективного фактору у клітинній селекції пшениці.

При застосування різних видів експлантатів встановлені відмінності в типах і швидкості формування первинного калюсу. За культивування насіння пшениці на поверхні поживного середовища впродовж перших трьох днів спостерігали значне його набухання. На четвертий день культивування в районі щитка у 33% експлантатів відмічали початок калюсоутворення, а на 10 добу калюс утворювався у 100% експлантатів. За використання апікальних ділянок асептичного коріння калюс формувався на 7–10 добу, першого сегменту базальної частини листкових пластинок на 5–7 добу.

Відмінності також були зафіксовані у ступені оводненості, щільності, кольору, вмісті елементів диференціації і виявленні морфогенетичного потенціалу. Із зрілих зародків формувався сильно оводнений, рихлий, майже прозорий, злегка білуватий калюс (рис. 7.3, А). Із асептичного коріння – більш щільний, менше оводнений, жовтуватий калюс (рис. 7.3, Б), для якого характерна наявність елементів диференціації. Такого ж типу калюс – щільний, жовтуватий формувався при використанні первинних листків як експлантатів.

Найкращу інтенсивність калюсоутворення для всіх експлантатів спостерігали на середовищі МС3. На апікальних ділянках асептичного коріння утворювався калюс з частотою 81–88 %, при цьому приріст калюсної маси в середньому складав 0,41–0,52 г. На листкових експлантатах на середовищі МС3 частота калюсоутворення становила 82–93 %, приріст калюсної маси 0,60–0,71 г. З дозрілого насіння на цьому ж середовищі калюс утворювався з частотою 90–97 %, приріст калюсної маси в середньому складав 0,82–0,95 г.



А

Б

Рис. 7.3 Калюсогенез на експлантатах пшениці: А – рихлий калюс із зрілих зародків; Б – щільний калюс із апікальних ділянок асептичних коренів

Отже, для проведення подальших досліджень відібрано середовище МС з додаванням 0,5 мг/л 6-бензиламінопурина (6-БАП) і 3,0 мг/мл 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) і рихлий калюс із зрілих зародків, який легко фрагментується на окремі клітини або невеликі агрегати. Саме такий калюс використовують для вивчення впливу екзогенних факторів на метаболізм і ріст клітинних популяцій, оскільки клітини в однаковій мірі стають доступними для зовнішньої дії фітотоксичних метаболітів збудника.

Для встановлення впливу ЛПС та інактивованих клітин (ІК) *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та ІК *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039 на калюсні тканини озимої пшениці здійснювали визначення концентрації максимального інгібування ІК₈₀ в діапазоні від 0,4 до 1 %. Одночасно висівали калюсні клітини пшениці на поживне середовище без селективного чинника.

Наявність в середовищі ІК і ЛПС вірулентного для пшениці штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 зумовлювало пригнічення поділу та проліферації калюсних клітин, різке зменшення кількості утворених колоній у присутності чинників патогенності бактерій порівняно з контролем, що пов'язано з генетичними і адаптаційними змінами. Навіть за низького вмісту в середовищі (0,4 % і 0,5 %) ІК та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 виявляли значний

токсичний вплив на життєздатність калюсної культури. Вживання калюсних тканин становило 17,5 – 43,2 %. За наявності в середовищі 0,8 % досліджуваних фітотоксичних речовин відбувалося побуріння калюсної тканини та зменшення кількості життєздатних клітин. Практично повне пригнічення проліферації калюсів спостерігали за наявності у середовищі 1 % суспензії ІК або розчину ЛПС (табл. 7.9). Надалі життєздатні колонії переносили на середовища ІК та ЛПС в концентрації максимального інгібування ІК₈₀ 0,4 % і 0,5 % та культивували протягом 7 пасажів для визначення впливу на приріст калюсних клітин.

Таблиця 7.9 – Проліферація калюсних тканин пшениці на середовищах з фітотоксичними метаболітами

Досліджувана речовина	Проліферація, %			
	Вміст суспензії ІК або розчину ЛПС, %			
	0,4	0,5	0,8	1
ІК <i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> 9400	39,0±1,7	18,8±1,5	9,4±0,8	4,7±0,5
ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> 9400	37,6±1,9	17,5±1,6	8,6±0,7	3,8±0,4
ІК <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> УКМ В-1039	99,0±2,3	99,0±2,4	98,0±2,5	98,0±2,3

На середовищі з ІК авірулентного для пшениці штаму *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039 не відмічали пригнічення росту калюсних тканин пшениці.

За дії 0,4 % і 0,5 % ІК і ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 до кінця першого пасажу вижило до 41,3–44,6 % калюсів, а після трьох – від 14,3–28,5 %. Після пасажу на середовищі без селективного чинника і наступної перевірки росту в селективних умовах було виділено від 7,4 до 10,5 % живих колоній (табл. 7.9). Таким чином, клітини і ЛПС *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 проявляли токсичний вплив, який супроводжувався пригніченням життєздатності калюсних клітин пшениці, що скоріше всього пов'язано з порушенням нормальної роботи ферментів, стану цитоплазматичних мембран і

клітинної стінки та процесів передачі генетичної інформації під час ділення клітин.

Таблиця 7.9 – Проліферація калюсів на середовищах з ЛПС і ІК в концентрації максимального інгібування ІК₈₀

Досліджувана речовина	Кількість живих калюсів у пасажах, %		
	3 пасаж	4 пасаж	6 пасаж
ІК <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	28,5±1,9	14,1±0,6	10,5±0,5
ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	14,3±1,8	10,6±0,8	7,4±0,4
ІК <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> УКМ В-1039	97,2±2,3	98,4±2,5	97,8±2,4

Відомо, що у відповідь на інфікування або обробку фітотоксичними метаболітами у тканинах рослини-хазяїна відбувається утворення активних форм кисню, пероксиду водню і гідроксильного радикалу, з яких лише пероксид водню відносно стабільний у розчині. Фермент пероксидаза залучений в реакціях оксидазного, пероксидазного і оксигеназного окиснення субстратів, що передбачає їхню активну участь в контролі рівня активних форм кисню, і, як наслідок, механізмів формування реакцій рослин на дію селективного фактора [60].

Визначення активності пероксидази калюсних тканин пшениці на середовищі з ІК збудника *P. syringae* pv. *atrofaciens* показало, що в цілому активація цього ферменту у калюсів дослідних варіантів вища, ніж в контролі. За дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на 10 годину культивування пероксидазна активність становила 10 в.о./г ваги калюсу, на 17 год – 24 в.о./г ваги калюсу і на 31 год активність зменшувалася до 18,5 в.о./г ваги калюсу. За обробки калюсних клітин ІК авірулентного для пшениці штаму *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039 пероксидазна активність залишалася на рівні контролю (табл. 7.10).

Таблиця 7.10 – Пероксидазна активність за дії фітотоксичних метаболітів

Варіант	Пероксидазна активність, в.о./г ваги		
	10 год	17 год	31 год
Контроль	5,4±1,2	3,8±0,8	3,6±0,6
ІК <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	7,2±0,8	11,8±0,5	9,3±0,4
ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	10,3±0,6	24,1±0,3	18,5±0,4
ІК <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> УКМ В-1039	5,5±0,9	4,0±0,7	3,8±0,5

Проведені нами дослідження підтверджують ефективність використання ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* як селективного фактора для визначення чутливості сортів пшениці до збудника базального бактеріозу.

Таким чином, на етапі проліферації калюсів інактивовані клітини бактерій і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* в дозах 0,4 до 1 % проявляли токсичний вплив на калюсні тканини пшениці сорту Хуторянка.

З літератури відомо, що пероксидаза бере участь в процесах укріплення клітинних стінок рослинних клітин за проникнення патогенів шляхом прискорення процесів синтезу фенольних полімерів лігніну [347, 348]. Показано, що кислі та аніонні форми пероксидази здатні секретуватися у простір між плазмалемою та клітинною стінкою рослин і, таким чином, першими вступати у контакт з фітопатогенами [279]. Крім каталізу окиснювальних реакцій, пероксидаза виконує регуляторну роль в процесах диференціації клітин і організації конституційної стійкості рослин до стресових абіотичних та біотичних чинників [74].

Результати проведених гістохімічних та фізіологічних досліджень показали, що у проростків пшениці, які вирощувались в умовах прямого впливу ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens*, пероксидазна активність порівняно з контрольними рослинами збільшувалась в 1,7-1,8 раз. В нормальних умовах при вирощуванні проростків пшениці *in vitro* фермент гістохімічно (бензидинова

реакція) було виявлено в клітинних стінках та вакуолях епідермісу колеоптиля, в мезофілі та флоемі першого асиміляційного листка (рис. 7.4).

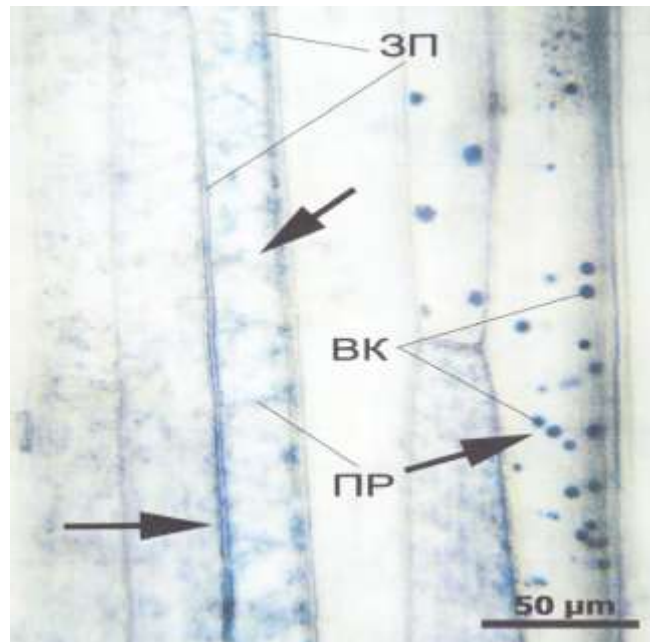


Рис. 7.4 Локалізація пероксидази в клітинах епідермісу колеоптиля пшениці в умовах *in vitro*: пр – пероксидаза, яка не зв'язана з клітинними стінками та дифузно розподілена в цитоплазмі епідермісу; вк – вакуолі, що містять пероксидазу; зп – пероксидаза, яка зв'язана з клітинними стінками

Кислі пероксидази дифузно розподілялись в цитоплазмі епідермальних клітин. Вакулі з високим вмістом ферменту були чисельні (від 10 до 18-20 шт.) та невеликі за розміром (3-5 мкм). Гістохімічна реакція продуктів ферментативного каталізу на бензидин в тканинах здорових проростків протікала досить повільно (15-20 хв.). Перші ознаки реакції, що характерні для цієї реакції в ацетатному буфері проявлялись за 1,5-2 хв. В тканинах колеоптиля та асиміляційного листка проростків пшениці, що знаходились під прямим впливом метаболітів, спостерігали збільшення загального пулу пероксидази, особливо її вільної та слабо зв'язаної форм. В протопласті епідермальних клітин гістохімічно встановлено, що найбільша кількість ферменту зосереджена в вакуолях, дифузно у перивакуолярному просторі цитоплазми, в антиклінальних та периклінальних стінках клітин пшениці (рис. 7.5).

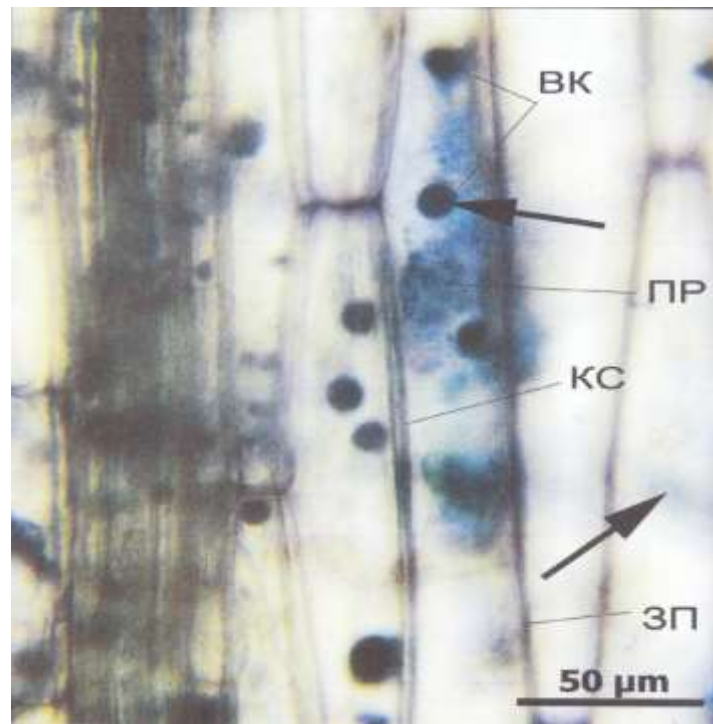
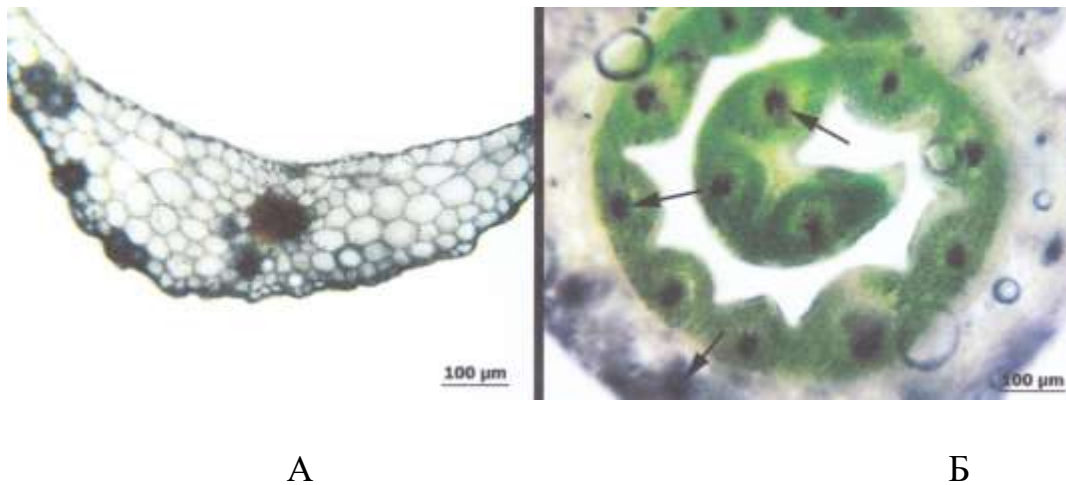


Рис. 7.5 Активізація синтезу пероксидази в клітинах епідермісу колеоптиля пшениці під впливом ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens*: кс – клітинна стінка; пр – пероксидаза, яка не зв'язана з клітинними стінками та сконцентрована в перивакуолярному просторі цитоплазми; вк – вакуолі з значним вмістом пероксидази; зп – пероксидаза, що зв'язана з клітинними стінками.

Високий вміст пероксидази, який було виявлено у флоемі провідних пучків першого справжнього листка (рис. 7.6), свідчить про те, що в системі тканин проростка активізується процес захисної реакції рослинного організму на дію токсинів та інших біологічно активних метаболітів фітопатогена. Висока концентрація ферменту в ситовидних трубках та клітинах-супутниках, можливо, є неспецифічною адаптаційною реакцією рослини до конкретного фітопатогена, яку можна розглядати як універсальний засіб боротьби рослинного організму з паразитами на тканинному та клітинному рівнях.



Стрілками вказано місця локалізації пероксидази.

Рис. 7.6 Локалізація пероксидази в тканинах колеоптиля - А та першого листка - Б пшениці, що вирощувалась на середовищі з ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Субстратами пероксидази в першу чергу є пероксид водню та фенольні сполуки. Окиснення фенолів до більш токсичних хінонів запобігає транслокації паразитів в живих тканинах рослини та забезпечують інгібування метаболізму та росту фітопатогенів.

7.5 Відбір стійких до збудника базального бактеріозу калюсних культур озимої пшениці

Перспективним підходом до створення стійких до бактеріальних хвороб сортів є використання методу прямої клітинної селекції на основі культури ізольованих клітин, тканин і органів рослин *in vitro*. Метод прямої селекції використовують також для виділення мутантних форм калюсних культур, стійких до гербіцидів, антибіотиків, токсинів патогенів, важких металів, посухи і засолення [78, 79]. В основі методу лежить підбір селективних концентрацій токсичних речовин в складі поживних середовищ. Ефективність використання методу прямої клітинної селекції на стійкість до збудників офіобольозної кореневої гнилі *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, фузаріозу колоса *Fusarium graminearum*, септоріозу колоса *Septoria nodorum* була продемонстрована для

ряду сортів пшениці. При цьому для створення селективних умов автори вводили в склад поживного середовища культуральний фільтрат (КФ) гриба в різних концентраціях. За даними Волощук С. І. та ін. середня сублетальна концентрація КФ *F. graminearum* становила 25–27% і тривалість періоду субкультивування з КФ 4 тижні [58]. Частина стійких варіантів за селекції *in vitro* на рівні проліферуючого калюсу складала порядку 10^{-4} , тоді як на рівні регенераційного калюсу – до 10^{-3} . В роботі Бавол А.В. методом прямої клітинної селекції здійснено добір калюсних ліній пшениці сорту Зимоярка, стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici* в концентрації 50% [2]. Показано, що стійкі калюсні лінії характеризуються стабільно – гетерогенною структурою клітинних популяцій, постійним рівнем росту (5–7%) і схожим типом структурних перебудов хромосом.

Наступним етапом роботи став відбір *in vitro* калюсних культур *Triticum aestivum*, що характеризуються високими значеннями ростового індексу і регенераційним потенціалом на поживних середовищах в умовах бактеріального стресу, спричиненого *P. syringae* pv. *atofaciens*.

Матеріалом для селекційної роботи було насіння озимої пшениці сортів Смуглянка, Фаворитка, Столична, Подолянка, яке культивували в умовах лабораторії на безгормональному поживному середовищі Мурасіге і Скуга (Murashige, Skoog, 1962) (МС).

Для відбору клітинних ліній пшениці, стійких до дії збудника базального бактеріозу, використовували листові експлантати та базове поживне середовище – модифіковане нами МС4 (доповнене 3,0 мг/л 2,4-ДХФ і 0,5 мг/л 6-БАП) із додаванням селективного чинника інактивованих за температури 100°C клітин (ІК) *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 в концентраціях 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1,0 %. Основною фітотоксичною складовою ІК є ліпополісахарид.

Для встановлення сублетальної концентрації ІК *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400, яка необхідна для здійснення відбору *in vitro*, було встановлено стійкість генотипів озимої пшениці до фітотоксичних метаболітів збудника. Відмінності вивчених генотипів за реакцією на фітотоксичні метаболіти в середовищі

найбільш чітко проявилися за основними показниками – частотою проліферації і приростом калюсу (табл. 7.11, рис. 7.7).

Таблиця 7.11 – Вплив концентрації ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* на частоту проліферації в культурі калюсних клітин сортів озимої пшениці

Концентрація ІК, %	Частота профілерації калюсу сортів, %			
	Подольанка	Столична	Фаворитка	Смуглянка
0	96,8±2,8	98,2±3,0	96,2±2,8	96,5±2,8
0,2	83,5±3,2	81,8±3,0	75,3±3,2	71,4±3,2
0,4	77,4±2,4	75,6±2,6	64,3±2,2	30,0±2,4
0,6	52,8±2,2	50,4±2,0	34,5±2,0	12,5±2,2
0,8	42,8±2,0	38,7±1,8	17,2±1,4	5,9±0,6
1,0	24,1±1,8	20,6±1,6	10,0±0,8	4,5±0,6

Проведення клітинної селекції можливе за пригнічення проліферації калюсу в межах 60–80% (сублетальна концентрація). Сублетальні концентрації ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, за яких можна отримати нормально розвинені проростки, залежали від стійкості генотипу. У сортів Подольанка і Столична сублетальна концентрація ІК була 0,8%, за якої частота проліферації калюсу становила 42,8% і 38,7% відповідно (табл. 7.11). При цьому приріст калюсної маси був у межах від 40 до 43% (рис. 7.7) Для сорту Фаворитка сублетальна концентрація ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 становила 0,6%, за якої проліферація калюсу була 34,5%, що на 61,7% менше ніж у контролі (табл. 7.11). За даної концентрації ІК приріст калюсної маси не перевищував 40% (рис. 7.7). Для сорту Смуглянка сублетальна концентрація ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 була 0,4%, при цьому частота проліферації калюсу становила 30% (табл. 7.11). Сорти за стійкістю до фітотоксичних метаболітів були розділені на дві групи, зокрема, більш стійкі сорти – Подольанка і Столична, менш стійкі сорти – Фаворитка і Смуглянка.

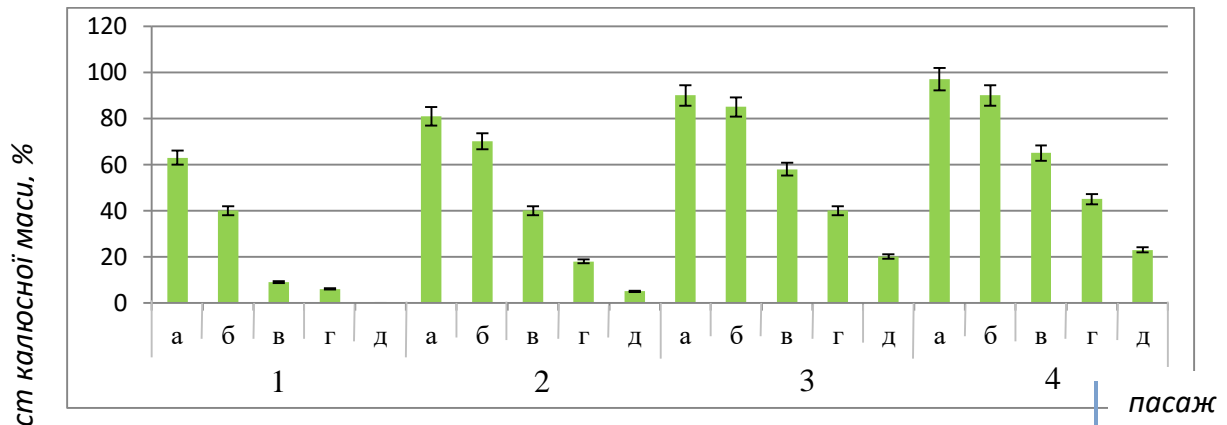


Рис. 7.7 Приріст калюсної маси сортів пшениці залежно від концентрації *P. syringae* рв. *atrofaciens* 9400: 1 – Смуглянка, 2 – Фаворитка, 3 – Подольянка, 4 – Столична, а – 0,2% інактивовані клітини (ІК), б – 0,4% ІК, в – 0,6% ІК, г – 0,8% ІК, д – 1,0% ІК.

Для створення рослин стійких до певного фактору, одержані калюси на середовищі із сублетальними концентраціями токсичних метаболітів повинні бути морфогенними і здатними до регенерації рослин. При проведенні цитологічних досліджень калюсних культур пшениці, вирощених на середовищі із ІК *P. syringae* рв. *atrofaciens* 9400, були виявлені клітини меристематичного типу, клітини паренхімного типу різних розмірів і форми, трахеїдоподібні клітини, а також морфогенні ділянки, пов'язані з закладкою адвентивних бруньок (рис. 7.8).

Клітини меристематичного типу мали відносно невеликі розміри, великі ядра і розташовувалися великими скупченнями в місцях локалізації трахеїдоподібних клітин (рис. 7.8). Клітини паренхімного типу відрізнялися більшими розмірами, невеликою кількістю цитоплазми і сильною вакуолізацією. Такі клітини мали округлу і подовжену форму. У калюсних культурах пшениці нами була виявлена диференціація вегетативних бруньок, пов'язана з проліферацією клітин меристематичного типу. Це свідчить про здатність калюсних культур, вирощених на середовищі із ІК *P. syringae* рв. *atrofaciens* 9400, до морфогенезу і подальшого розвитку рослин-регенерантів шляхом органогенезу.



Рис. 7.8 Формування морфогенних модулів у калюсі пшениці: 1 – морфогенний модуль з проваскулярними тяжами; 2 – паренхіматозні клітини калюсу

Відбір здійснювали пасируванням морфогенних калюсних культур, визначених в ході цитологічних досліджень, на селективні середовища з одержанням стійких рослин-регенерантів (рис. 7.9).



Рис. 7.9 Схема відбору стійких до збудника базального бактеріозу сортів пшениці *in vitro*.

Субкультивування калюсних культур пшениці на поживні середовища, які містять ІК, показало істотну залежність числа колоній, що вижили, від генотипу досліджуваних сортів.

У першому пасажі число життєздатних клітинних колоній зменшувалось до 31,2–47,5% (табл. 7.12). Після третього селективного пасажу кількість живих колоній становила 8,2–23,2%. Отримані калюсні лінії з стійкістю до стресового чинника характеризувались щільною, глобулярною структурою, пастельного забарвлення і відзначались повільним ростом. Індекс стабільності стійкості в процесі пасирування калюсу досліджуваних сортів становив від 26,3 до 48,4, що свідчить про успішне використання методу для отримання рослин-регенерантів *T. aestivum* L., стійких до збудника базального бактеріозу.

Таблиця 7.12 – Індекс стабільності стійкості в процесі пасирування калюсу сортів пшениці на середовищах з ІК *P. syringae* pv. *atropaciens* 9400

Сорт	Число живих колоній у пасажах (% від числа висаджених на середовище з селективними чинниками)			Індекс стабільності стійкості
	1	2	3	
Смуглянка	31,2±2,9	14,1±1,1	8,2±0,8	26,3
Фаворитка	34,7±3,2	15,0±1,2	10,7±0,9	30,8
Подольянка	44,3±4,1	23,7±2,1	18,1±0,9	40,8
Столична	47,5±4,3	26,8±2,4	23,2±1,1	48,4

Найбільшою регенераційною здатністю характеризувався стабільні калюсні лінії, відібрані після третього пасажу, більш стійких сортів Столичний і Подольянка, у яких частота регенерації рослин з морфогенних калюсів становила 40,8–42,4 % (рис. 7.10). Низькою здатністю до регенерації відрізнялись калюсні клітини після третього пасажу сортів Смуглянка і Фаворитка, у яких частота регенерації була на рівні 26,5 – 31,2 %.

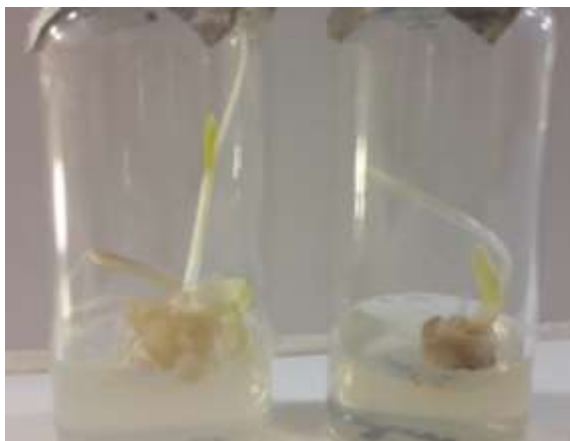


Рис. 7.10 Рослини-регенеранти пшениці сорту Подолянка на середовищі МС9 з ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400

Таким чином, в результаті проведених досліджень показана можливість одержання здатних до регенерації калюсних культур пшениці, стійких до фітотоксичних метаболітів збудника базального бактеріозу при пасируванні на поживні середовища з сублетальними концентраціями ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400.

Отже, показано здатність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* змінювати фізіологічний стан рослинного тест-об'єкта *A. cerea*, зокрема, його оксидативний стан. Про такі зміни свідчить зростання пероксидазної активності, а також інтенсифікація процесів перекисного окиснення ліпідів. За дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* зростає вміст МА передусім у тих концентраціях, у яких ці ЛПС збільшують ЧААТ у клітинах апікальної меристеми *A. cerea*. Інфікування збудником базального бактеріозу призводить до зростання активності ферментів антиоксидантного захисту – каталази і пероксидази. Разом з тим спостерігали суттєве скорочення пігментного складу листків інфікованих рослин пшениці: хлорофілу *a*, хлорофілу *b* і каротиноїдів. Відмічені функціональні порушення фотосинтетичного апарату рослин пшениці, інокульованої збудником базального бактеріозу, зниження кількості активного хлорофілу, що залучається до передачі електронів, призводить до пригнічення ефективності темної фази фотосинтезу.

ЛПС і ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 проявляли фізіологічну активність на клітинному рівні в зниженні життєздатності клітин у калюсній культурі та субклітинному в підвищенні активності пероксидази. Зміна активності пероксидази як ключового ферменту неспецифічної стійкості рослин входить в число захисних реакцій індукованих патогенами або продуктами їхньої життєдіяльності.

Встановлено, що за реакцією калюсних клітин пшениці на фітотоксичні метаболіти *P. syringae* pv. *atrofaciens* сорти Подолянка і Столична є більш стійкими до збудника базального бактеріозу, тоді як сорти Фаворитка і Смуглянка – менш стійкі. Встановлено, що відбір стійких до збудника базального бактеріозу ліній пшениці можна здійснювати для сортів Подолянка і Столична за сублетальної концентрації 0,8% ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, сорту Фаворитка – 0,6%, сорту Смуглянка – 0,4%. Методом культури *in vitro* отримано стійкі, здатні до регенерації калюсні лінії пшениці сортів Подолянка і Столична перспективні для селекційної роботи зі створення сортів стійких до збудника базального бактеріозу пшениці, а одержані рослини-регенеранти потребують подальшої перевірки на стійкість в польових умовах.

Основні наукові результати розділу опубліковано в працях автора [11, 16, 17, 21, 35, 37, 105, 139, 143, 144].

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Бактеріальні хвороби рослин створюють серйозні проблеми для отримання продукції рослинництва і призводять до значних щорічних втрат у глобальному масштабі [93, 443, 491, 494, 503]. Зростання кількості бактеріальних хвороб у всьому світі має різноманітні причини (як зміни клімату, так і наслідки господарської діяльності людини), їхнє розуміння є критично важливим для розроблення ефективних стратегій контролю фітопатогенних бактерій [183, 197, 494]. Стратегії ефективного і сталого управління збудниками бактеріальних хвороб рослин вимагають досконалого знання патосистеми: закономірностей функціонування популяції патогена, його адаптивних можливостей, розвитку стійкості патогенів до існуючих засобів контролю, механізмів стійкості рослин до патогенів і роблять актуальними дослідження в галузі ідентифікації і характеристики фітопатогена та взаємодії між патогенами і рослинами [450]. Розуміння еволюції фітопатогенних бактерій має першорядне значення для встановлення і реалізації практичних стратегій управління хворобами рослин для зменшення або запобігання їхньому виникненню і поширенню.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню збудника базального бактеріозу пшениці, який належить до виду *Pseudomonas syringae*, що, за визнанням багатьох дослідників, є найважливішим з економічної і наукової точки зору бактеріальним патогеном рослин [383]. *P. syringae* pv. *atrofaciens* спричинює базальний бактеріоз пшениці у Росії, Болгарії, Італії, Німеччині, Новій Зеландії, Ірані [189, 193, 208, 211, 339, 394, 499, 519, 538]. Дані наукової літератури підтверджують високу шкодочинність і здатність цього збудника спричинювати епіфітотії [111, 395, 432]. Його небезпека полягає у здатності ефективно колонізувати філосферу як рослини-хазяїна, так й інших видів рослин, формуючи епіфітні популяції, які є первинним інокулюмом для інфікування рослин і, за настання сприятливих умов, є причиною масового ураження рослин [135, 262, 313, 476, 495, 498].

За обстеження посівів пшениці різних сортів у Київській, Полтавській, Черкаській областях України ми реєстрували наявність рослин пшениці із характерними для базального бактеріозу ураженнями вегетуючих частин на усіх полях. Найчастіше спостерігали ураження у вигляді світло-коричневих чи бежевих плям з коричневою або коричнево-бурою облямівкою на лусочках і листках, що є характерною ознакою ураження *P. syringae* pv. *atrofaciens* [483, 262]. На основі морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей виділених ізолятів, а також за врахування їхньої вірулентності для пшениці і здатності за штучної інокуляції індукувати розвиток симптомів базального бактеріозу ізольовані бактерії ідентифіковано як *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Виявлено епіфітні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які вірулентні для пшениці. Отже, встановлено постійне функціонування збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens* у посівах цієї культури.

Враховуючи значну забур'яненість полів в Україні [163], здатність бур'янів слугувати екологічною нішею збудників бактеріальних хвороб [64, 68, 174, 308, 386] обстежено сегетальну рослинність в агрофітоценозах пшениці за інтенсивного і органічного землеробства. На полях виявлено осот польовий, мак польовий, берізку польову, будяк польовий, підмаренник чіпкий, пирій повзучий, плоскуху звичайну, хвощ польовий. Наявність більшості із вказаних видів рослин у посівах пшениці відмічено також іншими дослідниками [163].

Для аналізу і виявлення збудника відібрали зразки рослин із характерними для бактеріальних хвороб ознаками. В результаті ізолювання та ідентифікації фітопатогенних бактерій виділено 7 ізолятів бактерій *P. syringae* із маку польового та осоту польового, які росли в агрофітоценозах пшениці. Подальшу ідентифікацію виділених ізолятів з визначенням належності до певного патовару було ускладнено високою спорідненістю патоварів *P. syringae* за біохімічними, фізіологічними і навіть генетичними ознаками [206, 296, 383, 546]. Приналежність до патовару для бактерій виду *P. syringae* визначається зазвичай за рослиною-хазяїном. Необхідно зауважити, що статус такої таксономічної одиниці як патовар у межах виду *P. syringae* активно

обговорюється у науковій літературі [366, 447, 546]. Деякі дослідники вважають розділення на патовари невиправданим [206, 366, 383, 424] і стверджують, що маємо справу з одним надзвичайно універсальним патогеном. Однак в інших роботах показано можливість диференціації патоварів за патогенними властивостями і деякими іншими ознаками [384, 385, 468, 542, 546].

Штами бактерій *P. syringae*, які було виділено із сегетальної рослинності, є вірулентними за штучної інокуляції рослини-хазяїна і пшениці. За штучного зараження пшениці утворювалися світло-коричневі плями з темною облямівкою, які з часом збільшувалися у розмірах і охоплювали стебло, що призводило до потемніння серцевини стебла. Такі симптоми є характерними для збудника базального бактеріозу пшениці [262, 263, 384, 385].

Для вивчення гетерогенності популяції *P. syringae* pv. *atrofaciens* в Україні і встановлення спорідненості між штамми цього збудника і штамми *P. syringae*, які було ізольовано із уражених бактеріозом бур'янів в агрофітоценозах пшениці, визначено серологічні властивості, склад жирних кислот, ДСН-ПААГ профілі білків цілих клітин бактерій і здійснено RAPD-ПЛР аналіз.

Л.Т. Пастушенко і І.Д. Симонович [140, 141] на великому наборі представників патоварів розробили схему серотипування фітопатогенних бактерій *P. syringae*, яка складається із 9 серологічних груп. Доповненням до даної схеми є результати, що стосуються серотипування штамів *P. syringae* pv. *coronafaciens* і *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що були ізольовані з жита, і які відрізняються за антигенним складом і розподілені на серологічні групи залежно від рослини-хазяїна [130, 135]: штамми *P. syringae* pv. *coronafaciens*, виділені з рослин вівса, належать до двох серологічних груп (I і V), а штамми *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані з жита – до п'яти серогруп (I, II, IV, V, VI) [130].

Аналізуючи результати наших серологічних досліджень збудника базального бактеріозу пшениці і дані літератури [130, 135, 140, 141], можна

зробити висновки, що штами, ізольовані із пшениці і сеgetальної рослинності, подібні за антигенним складом і належать до II, IV, V і VI серогруп.

Переважає певних серогруп визначається рослиною-хазяїном, а також, на нашу думку, пов'язано з більшою пристосованістю 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.

Те, що до серогруп II та IV за результатами агарпреципітації було віднесено більшість досліджених штамів, виділених з бур'янів, свідчить про переважання даних серогруп не тільки для збудників, виділених з пшениці, а й для інших рослин даного агрофітоценозу.

До серогрупи V належать штами *P. syringae* pv. *atofaciens*, виділені з пшениці за органічної системи землеробства, а також штами бактерій, виділені з бур'янів, але кількість їх незначна. Штами *P. syringae* pv. *atofaciens*, виділені з пшениці різних країн (Україна, Росія і США), теж представлені у цій серогрупі поодинокими штамами. Проте представників цієї серогрупи не було виявлено серед штамів *P. syringae* pv. *atofaciens*, ізольованих з пшениці в Болгарії [135].

Наявність штамів *P. syringae* серогрупи V, виділених з бур'янів, дає підстави припустити, що ці штами мають ширші можливості до пристосування і виживання за зміни умов навколишнього середовища порівняно зі збудниками хвороб, виділеними з пшениці.

Отже, всі досліджені штами бактерій *P. syringae* pv. *atofaciens* проявили серологічну спорідненість з антисироватками до штамів II, IV, V, VI серологічних груп *P. syringae*. Враховуючи це, нами запропоновано використання для виявлення збудника базального бактеріозу полівалентної антисироватки II, IV, V, VI серологічних груп до фітопатогенних бактерій виду *P. syringae*.

Разом із тим, серологічна спорідненість штамів, які було ізольовано нами із агрофітоценозу пшениці, не може бути підставою для твердження, що ці штами належать до одного патовару виду *P. syringae*. За серологічними

властивостями штами патоварів *P. syringae* гетерогенні і штами одного патовару можуть належати до кількох серологічних груп [342, 434, 461, 467]. За даними літератури перехресні реакції преципітації не дозволили розділити патовари *P. syringae* pv. *atrofaciens* і *P. syringae* pv. *syringae* [241]. Тому нами було використано низку біохімічних методів досліджень для встановлення спорідненості штамів, ізольованих з пшениці, і штамів, ізольованих з бур'янів.

Визначення складу жирних кислот загальних клітинних ліпідів є ефективним, швидким і точним хемотаксономічним методом, який успішно застосовують для ідентифікації фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* [324, 336, 421, 488, 489, 522, 533]. Дослідники відмічають особливе значення оксизаміщених жирних кислот для встановлення таксономічного статусу цієї групи бактерій [489, 533].

Усі досліджені штами бактерій незалежно від джерела їх виділення є подібними за якісним складом жирних кислот, а саме, містять додеканову, тетрадеканову, гексадеканову, октадеканову, *cis*-9-гексадецену, *cis*-11-октадецену, *cis*-9,10-метилгексадеканову, *cis*-9,10-метилоктадеканову жирні кислоти. Всі штами містять також важливі для ідентифікації оксизаміщені (3-гідроксидеканову, 2-гідроксидодеканову і 3-гідроксидодеканову) жирні кислоти, що підтверджує їх належність до виду *P. syringae* [488, 489, 522]. Наявність відмінностей у спектрі жирних кислот є особливістю кожного штаму і не співвідноситься з розподілом на патовари і серогрупуванням. Нами не було виявлено закономірностей у складі жирних кислот клітинних ліпідів ізольованих в агрофітоценозі пшениці штамів, які б дозволили розділити їх на групи, приурочені до джерела ізоляції штаму та (або) підтвердити належність ізольованих із сегетальної рослинності штамів до патовару *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Для визначення генетичної гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу в Україні було застосовано метод RAPD-ПЛР, який успішно використовується й іншими дослідниками для генетичного аналізу фітопатогенних бактерій *P. syringae* [296, 325]. На основі аналізу даних

літератури [296, 469] і власних досліджень було визначено, що оптимальним праймером для вивчення ізольованих в агрофітоценозі пшениці штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* є ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3'). За використання цього праймеру для ампліфікації ДНК штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* отримано спектри ампліфікованих фрагментів, які були подібними для всіх штамів (як ізольованих із пшениці, так і жита). Діапазон поліморфних локусів становив від 500 до 1300 т.п.н. Для всіх штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* домінуючим продуктом був фрагмент ДНК з розміром близько 700 т.п.н.

Усі штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, незалежно від географічного регіону виділення, рослини, з якої було ізольовано бактерії, належності до серогрупи та агресивності, утворили споріднену групу, що дозволяє зробити висновок, що досліджені штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* є генетично однорідною групою.

Використання праймеру ОРА-13 дозволяє отримати продукти RAPD-ПЛР, за якими можна диференціювати патовари виду *P. syringae* на дві групи. До першої входять переважно збудники хвороб зернобобових культур (*P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *tabaci*), а до другої – патовари, що є збудниками хвороб овочевих культур (*P. syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. wieringae*, *P. syringae* pv. *syringae*). Можливість диференціації патоварів за використання цього методу показано і в роботах інших авторів [296, 325]. Наприклад, методом RAPD-ПЛР було встановлено, що ізольовані з манго штами *P. syringae* утворюють один кластер, що було підтверджено і за використання методу гер-ПЛР [296]. Також за використання RAPD-ПЛР з праймерами SPH1, DJP 17, DJ 15, DJ 16 показано існування двох кластерів збудників хвороб черешні, які відповідали патоварам: *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *morsprunorum*. Всередині кожного з цих кластерів автори виокремили групи, які пов'язані з географічним місцем ізолювання штамів [325]. У наших дослідженнях використано штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які було ізольовано в 11 областях України, проте нами не встановлено групування штамів залежно від регіону ізолювання.

Таким чином, виділені з різних рослин-хазяїнів в 11 областях України штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що є гетерогенними за серологічними властивостями та агресивністю до рослини-хазяїна, представляють генетично однорідну групу на основі RAPD-профілювання з праймером ОРА-13. Здійснення RAPD-ПЛР аналізу з праймером ОРА-13 дозволило встановити високий ступінь спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens* більшості штамів *P. syringae*, які було ізольовано із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці.

Дані наукової літератури вказують на цінність вивчення білкових профілів методом ДСН-ПААГ електрофорезу для ідентифікації фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* [222, 515]. Методом ДСН-ПААГ електрофорезу білків цілих клітин бактерій було показано, що штами бактерій, які належать до одного патовару, *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, мають ідентичні профілі білків зовнішньої мембрани. Штами *P. syringae* 684б, 662г, 650а, 560а, 646а, які ізольовано з бур'янів у посівах пшениці, мали ідентичні ДСН-ПААГ профілі білків. Їхні білкові профілі були ідентичні до профілю неопатотипового штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 і білкових профілів штамів збудника базального бактеріозу, ізольованих із уражених рослин пшениці в Україні. До ДСН-ПААГ профілі білків цілих клітин входили білки із молекулярною масою від 17 до 98 кДа (домінуючими були білки з молекулярною масою 30 і 45 кДа). Іншими дослідниками також було показано можливість використання білкових профілів для встановлення різниці між штамми, що належать до різних патоварів. Так, було показано відмінності у білковому профілі *P. syringae* pv. *pisi* незалежно від певної раси, серогрупи, біохімічних ознак від *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *glycinea* (відсутній білок 60 кДа) і *P. syringae* pv. *aptata* [379].

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що штами *P. syringae*, виділені з різних видів сегетальної рослинності пшеничного поля, і збудники бактеріальних хвороб пшениці є однорідною групою. Це підтверджує припущення про те, що бур'яни можуть бути резерваторами збудників

бактеріозів і, за сприятливих умов, є джерелом бактеріальної інфекції для сільськогосподарських рослин. Однак, науковцями з Каліфорнії, які досліджували генетичну мінливість штамів *P. syringae* pv. *syringae*, ізольованих у фруктових садах, за допомогою ПДРФ і ЕРІК-ПЛР аналізу не підтверджено припущення, що бур'яни забезпечують перезимівлю штамів *P. syringae* і є джерелом поширення інфекції [367]. Результати наших досліджень мають важливе значення для розуміння генетичної структури і динаміки популяції патогена *P. syringae* pv. *atrofaciens* в агрофітоценозі пшениці і є підґрунтям для розвитку практичних стратегій профілактики та управління захворюваннями сільськогосподарських культур.

Вивчення впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії в основному здійснюються з міркувань пошуку препаратів для захисту рослин від них. Проте, обсяги застосування пестицидів настільки великі, що спричинюють значні екологічні зсуви і забруднення навколишнього середовища ксенобіотиками, в тому числі з мутагенною і генотоксичною дією [171, 178]. Потрапивши в клітину, пестициди порушують її нормальне функціонування. Слід зазначити, що більшість пестицидів не є високоселективними і тому спричинюють негативний вплив не лише на ті групи організмів, проти яких пестициди використовують, а й на біологічно віддалені [72, 178, 261, 490].

Присутність пестицидів може призвести до розвитку у мікроорганізмів толерантності до них та/або здатності їх руйнувати. Мікроорганізми набувають і використовують кілька механізмів для позбавлення від ксенобіотиків: хемотаксис, мембранні транспортні системи, ефлюксні насоси, ферменти і гени для деградації, що кодуються плазмідами. Внаслідок подібності мікробних реакцій адаптації до пестицидів і антимікробних речовин, включаючи антибіотики, мікроорганізми-деструктори пестицидів мають вищі шанси набувати стійкості до протимікробних препаратів як надлишкову функціональну характеристику [456]. На думку вчених, стійкість до пестицидів сприяє розвитку стійкості до антибіотиків [247].

Враховуючи значний практичний інтерес, який обумовлено збільшенням в останні роки кількості бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур і відсутністю зареєстрованих в Україні комерційних препаратів для захисту рослин від бактеріальних хвороб, було вивчено антибактеріальну активність широкого кола пестицидів стосовно штамів *P. syringae* pv. *atropfaciens* і інших фітопатогенних бактерій, зокрема, *P. syringae* pv. *aptata* (збудник чорної плямистості листя буряків), *P. syringae* pv. *coronafaciens* (збудник ореольного бактеріозу вівса), *P. syringae* pv. *lachrymans* (збудник кутастої плямистості листків огірка), *P. syringae* pv. *tomato* (збудник бактеріальної крапчастості томатів), *Agrobacterium tumefaciens* (збудник корончастого галу), *Pectobacterium carotovorum* (збудник м'яких гнилей), *Xanthomonas vesicatoria* (збудник чорної бактеріальної плямистості).

Встановлено, що лише препарати, які містять манкоцеб, характеризуються високою антибактеріальною активністю щодо всіх видів фітопатогенних бактерій і можуть бути використані для контролю збудників бактеріальних хвороб. Іншими дослідниками показано, що лише використання гідроксиду міді і манкоцебу пригнічує розвиток бактеріального раку, що підтверджує синергічний ефект, оскільки окреме застосування манкоцебу не зменшує популяції і поширення *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [304]. У той же час підтверджено активність манкоцебу у контролі *Xanthomonas perforans* [328]. Нами виявлено, що препарати беноміл, флудіоксоніл, пенконазол, дифеноконазол, тіофанат-метил не можуть використовуватися для захисту рослин від фітопатогенних бактерій, оскільки навіть у лабораторних умовах не пригнічують ріст фітопатогенних бактерій.

При цьому нами встановлено наявність у комерційних біопрепаратів на основі *B. subtilis*, *P. fluorescens* та *P. aureofaciens* антибактеріальної активності, що дає підставу вважати перспективним застосування мікробних препаратів для контролю фітопатогенних бактерій виду *P. syringae*. Цю думку підтверджують численні дані літератури [213, 274, 276, 403, 500, 526] щодо антагоністичної активності бактерій роду *Bacillus* стосовно фітопатогенних бактерій. Однак,

низький рівень антибактеріальної активності комерційних препаратів свідчить про відсутність спрямованого відбору біологічних агентів із антагоністичною дією стосовно *P. syringae*. У перспективі необхідно здійснювати цілеспрямований відбір та підвищувати активність бактерій, які можуть бути використані у складі препаратів для контролю збудників бактеріальних хвороб виду *P. syringae*.

Результати проведених досліджень дозволили встановити, що фунгіциди беноміл, тіофанат-метил, флудіоксоніл і гербіцид трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил спричинюють збільшення кількості Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Інсектицид альфа-циперметрин не збільшував кількість Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Нами також показано, що фунгіциди тіофанат-метил (700 г/кг) і флудіоксоніл (25 г/л) виявляють мутагенну активність в тесті Еймса з тест-культурою *S. typhimurium* TA98. Необхідно зауважити, що дані наукової літератури щодо мутагенної активності пестицидів неоднозначні. Так, щодо фунгіциду беномілу, для якого нами встановлено здатність спричинювати збільшення кількості Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виявлено індукування утворення мікроядер в клітинах кісткового мозку мишей після одноразового перорального введення в дозі 2500 мг/кг [466]. В той же час беноміл та його комерційні препарати Фундазол 50WP і Бенлат 50WP, метил-2-бензімідазолу карбамат за тестування у тест-системі з *Salmonella typhimurium* TA100, TA1530, TA1535 і TA1950 з метаболічною активацією і без неї не виявляли мутагенної активності [273]. Хоча за повідомленням інших авторів фунгіцид на основі беномілу (Фундазол 503П) спричинює збільшення кількості мутацій у тест-штамів *S. typhimurium* TA98, *S. typhimurium* TA100, *E. coli* WP2 [97]. Аналізуючи дані наукової літератури необхідно зауважити, що в цілому результати вивчення мутагенної дії залежать від використаної для дослідження моделі, що підтверджує необхідність тестування мутагенної дії пестицидів на широкому колі організмів [57].

Морфологічна дисоціація у бактерій є одним із проявів мінливості мікроорганізмів [127, 497]. Внаслідок морфологічної дисоціації бактерії, які утворюють на щільних середовищах гладенькі блискучі колонії (зазвичай вони позначаються як S-форма (від англ. smooth – гладенький)), починають утворювати мутантні складчасті матові колонії (R-форма (від англ. rough — шорсткий) [123]. Морфологічна дисоціація у бактерій може виникати спонтанно або за впливу фізичних і хімічних чинників [124, 497]. Необхідно зазначити, що при морфологічній дисоціації змінюються також фізіологічні, біохімічні та імунологічні властивості бактерій. Явище дисоціації сприяє гетерогенності бактеріальної популяції, підвищує її стійкість, розширює межі виживання виду [124, 497]. Для фітопатогенів *P. syringae* характерна природна мінливість популяції з розщепленням на різні морфотипи, однак частота такої дисоціації невелика [23, 127].

Фітопатогенні бактерії, разом з іншими біотичними та абіотичними факторами стресу, становлять загрозу світовому виробництву продукції рослинництва. Тому розуміння стратегій виживання бактерій є важливим кроком до розробки нових стратегій захисту від збудників хвороб рослин. Показано, що одним з механізмів для виживання бактерій в стресових умовах, є утворення персистуючих клітин. Персистери – це невелика частка фенотипових варіантів в ізогенній популяції, яка проявляє високу толерантність до лікарських препаратів не зазнаючи генетичних змін. Вони є дрімаючими клітинами, які переживають дію антимікробних препаратів шляхом інактивації метаболічних функцій, що порушуються цими сполуками. Таким чином, вони відповідають за персистенцію багатьох хвороб людини, і таким же чином, як вважають, вони сприяють виживанню бактеріальних фітопатогенів в умовах ряду стресів, з якими вони стикаються в навколишньому середовищі. Вважається, що персистуючі клітини бактеріальних фітопатогенів можуть призвести до повторного виникнення захворювання шляхом відновлення росту і відновлення рослини-хазяїна після закінчення стресу. Однак, порівняно з

патогенами людини, мало відомо про персистуючі клітини фітопатогенів, особливо про їхню генетичну регуляцію [390].

Вперше встановлено, що альфа-циперметрин і трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил збільшують частоту морфологічної дисоціації збудника базального бактеріозу пшениці. За культивування штамів фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* з інсектицидом альфа-циперметрин спостерігали значне у 10 – 100 разів підвищення частоти морфологічної дисоціації з формуванням колоній видозміненої R-форми. Частота появи індукованих альфа-циперметрином R-форм залежала від штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Так, для штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 частота появи R-форм становила 5×10^{-2} , для *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 – 2×10^{-2} . Штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 виявився найбільш чутливим до дослідженого інсектициду – частота появи R-форм становила 2×10^{-1} . Частота морфологічної дисоціації *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 під впливом гербіциду трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метилу становила 5×10^{-1} .

R-дисоціанти за фізіолого-біохімічними властивостями не відрізнялися між собою і мали незначні відмінності від вихідної S-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. Усі R-дисоціанти *P. syringae* pv. *atrofaciens* взаємодіяли із штамоспецифічною антисироваткою в реакції мікроаглютинації на склі. Однак, у випадку індукованих пестицидами R-форм, аглютинація відбувалася лише із антисироваткою в розведенні 1:10, що може бути пов'язано зі змінами в структурі O-антигена, який відповідає за серологічну специфічність [87]. За даними ДСН-ПААГ електрофорезу білків цілих клітин вихідна S-форма штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, спонтанна R-форма цього штаму, індукована альфа-циперметрином R-форма та індукована трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метилом R-форма *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 мають ідентичні профілі білків зовнішньої мембрани. Встановлено, що як спонтанна, так й індуковані пестицидами R-форми штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 спричиняють РНЧ на листках тютюну. За штучної інокуляції пшениці R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* викликають появу

типових симптомів базального бактеріозу. Тобто, R-форми зберігають свої вірулентні властивості. Спонтанна та індуковані пестицидами R-форми штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 краще, ніж вихідна S-форма цього штаму ростуть при температурі 40°C. Не було виявлено достовірної різниці у здатності S- і R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 рости при температурі 6°C та за концентрації NaCl 4%.

Спонтанна та індукована R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 краще формують біоплівку порівняно з S-формою цього штаму. Так, маса біоплівки, індукованої альфа-циперметрином R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, була більш ніж у 2 рази, а спонтанної R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 – більш ніж у 3 рази більшою порівняно з масою біоплівки, сформованої S-формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. Дані наукової літератури свідчать про важливість здатності формувати біоплівку для успішної колонізації філосфери [203, 238, 264, 365, 381, 508, 509], а успішна колонізація цієї ніші фітопатогенними бактеріями є передумовою інфікування рослин [313, 498].

На нашу думку, збільшення у популяції *P. syringae* pv. *atrofaciens* кількості особин, що характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівки, може призводити до формування більших популяцій цього збудника на рослинах-хазяїнах і посилювати ризик виникнення епіфітотій. Наявність R-форм у популяції збудника призводить до ускладнень при діагностиці базального бактеріозу.

Одним із факторів патогенності бактерій, які здатні уражувати рослини, є ліпополісахариди. ЛПС є одними із найбільш активних молекул грамнегативних бактерій [45, 48, 49, 260, 413, 415], тому вивченню активності цих молекул присвячено значну частину роботи. Для отримання ЛПС було обрано метод екстрагування розчином хлориду натрію [90], оскільки відомо, що ЛПС локалізується виключно у зовнішньому моношарі бішарової зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій і така локалізація обумовлює легке вивільнення ЛПС при м'яких маніпуляціях типу вимивання слабкими

розчинами солей [90, 510] та його спонтанне вивільнення у навколишнє середовище [91]. Було отримано ЛПС штамів *P. syringae* pv. *atropaciens* (УКМ В-1011, 9780, 9400) та ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і ЛПС штамів, які належать до патоварів, що уражують не зернові культури (цукрові буряки): *P. syringae* pv. *aptata* 8544; *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922. З метою визначення впливу методу отримання і хімічного складу ЛПС на його біологічну активність ЛПС штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 було отримано класичним методом виділення ЛПС – водно-фенольною екстракцією. Одержані ЛПС патоварів *P. syringae* виявилися подібними за хімічним складом. Так, в ЛПС усіх досліджених штамів містилася значна кількість вуглеводів, що відрізняє фітопатогенні види бактерій роду *Pseudomonas* від інших досліджених представників роду [90].

Від усіх препаратів відрізнявся ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, одержаний за екстрагування водно-фенольним методом. Він містив найбільшу кількість вуглеводів (36,3%).

В ЛПС усіх досліджених штамів виду *P. syringae* концентрація білка була значною і складала від 10 до 24%. Найменше білка (2,5%) містив ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, що був екстрагований водно-фенольним розчином. За даними літератури фітотоксичність ЛПС фітопатогенів (*P. syringae* pv. *morsprunorum*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. fluorescens*), виявляється тільки у взаємозв'язку з білком [305].

До складу ЛПС *P. syringae* входить від 3,1 до 11,7 % нуклеїнових кислот від сухої маси ЛПС. В усіх одержаних ЛПС виявлена КДО у кількості 0,56 – 1,50%. ЛПС *P. syringae* містили типові для цих біополімерів жирні кислоти і були серологічно активними. Підтвердженням збереження біологічної активності ЛПС методи *syringae* є також їхня здатність запобігати реакції надчутливості на листках тютюну, яка індукована введенням суспензії клітин *P. syringae*.

Патогенні мікроорганізми досить активно вивчаються дослідниками як фактор біологічного мутагенезу [70, 85, 95, 464, 477, 524]. Однак переважна

більшість досліджень стосується патогенів ссавців. Вивчення геномодулювальної активності фітопатогенних бактерій є важливим як з огляду на можливість їхнього впливу на рослини і збереження властивостей сортів рослин, так і враховуючи, що ці бактерії разом із рослинною їжею потрапляють до людини і можуть впливати на її здоров'я.

При вивченні геномодулювальної активності *P. syringae*, перш за все, увагу було приділено ЛПС цього виду бактерій, адже саме ці біополімери характеризуються різноманітним впливом на макроорганізми, у тому числі токсичним [49, 92, 260, 307].

ЛПС *P. syringae* не мають мутагенної активності в тесті Еймса. ЛПС усіх досліджених штамів *P. syringae* у концентраціях 5,0 і 0,5 мг/мл виявилися здатними зменшувати кількість індукованих біхроматом калію His⁺ реверсій в тесті Еймса на 17–49% залежно від походження і концентрації біополімера і використаного тест-штаму *S. typhimurium*. Такою самою активністю щодо індукованого N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном (МННГ) мутагенезу в тесті Еймса характеризувалися ЛПС штамів патоварів *P. syringae*: ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* 8544, ЛПС *P. syringae* (*P. wieringae*) 7922.

За тестування антимуtagenних властивостей ЛПС типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 щодо індукованого біхроматом калію мутагенезу в тесті Еймса виявлено здатність біополімера пригнічувати індукований мутагенез. Екстрагований водно-фенольним розчином ЛПС в концентрації 5,0 мг/мл зменшував індукований біхроматом калію мутагенез на 41% для тест-штаму *S. typhimurium* ТА98 і на 39% для штаму *S. typhimurium* ТА100. Екстрагований розчином хлориду натрію ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 у концентрації 5,0 мг/мл зменшував кількість індукованих мутацій у *S. typhimurium* ТА98 на 27%. Не виявлено достовірної відмінності в антимуtagenній активності ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, виділених різними методами.

На підставі аналізу отриманих експериментальних даних можна передбачити, що антимуtagenна активність є загальною властивістю всіх ЛПС. Можливо, така активність пов'язана з полісахаридною частиною складної молекули ЛПС. На користь такого припущення свідчать дані літератури стосовно виявлення антимуtagenної дії у екзополісахаридів [310, 354, 355, 486, 505, 530] та отримані експериментальні дані, які вказують на наявність у мікробного полісахариду ксампану антимуtagenної активності на тому самому рівні, що і досліджених нами ЛПС. Так, за внесення 1000,0 мкг ксампану спостерігали пригнічення індукованого біхроматом калію мутагенезу у *S. typhimurium* TA98 на 32%, а за внесення 0,1 мкг ксампану – на 25%.

Окрім безпосереднього ризику збільшення мутацій, спричиненого бактеріями та їхніми метаболітами, в літературі відмічено здатність бактерій активувати промутагени [181, 182, 446]. Активація промутагенів бактеріями, які у філосфері контактують із пестицидами, може мати негативні наслідки і посилювати токсичну дію пестицидів на нецільові організми у біоценозах. Однак у наших дослідженнях фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens* не спричинювали активацію відомого промутагена 3,3'-діамінобензидіну. На нашу думку, це обумовлено відсутністю оксидази у фітопатогенних бактерії роду *Pseudomonas*, що відрізняє їх від інших представників цього роду. Відсутність оксидази, яка зумовлює нездатність активувати промутагени, дозволяє говорити про відсутність екологічної небезпеки, яка обумовлена утворенням мутагенно активних метаболітів пестицидів. Разом із тим відсутність оксидази робить фітопатогенні бактерії більш сприйнятливими до токсичної дії пестицидів, які вже мають мутагенну активність.

Основна роль в процесі індукції мутацій патогенними мікроорганізмами належить утворенню вільних радикалів у клітинах хазяїна, яке індуковане патогеном чи його окремими структурами [129]. Утворення вільних радикалів рослинними клітинами у відповідь на абіотичні чи біотичні фактори є однією із перших реакцій рослини на стрес [107]. Зважаючи на це, вивчення мутагенної

дії ЛПС *P. syringae* pv. *atropaciens* було доцільно здійснити у рослинній тест-системі, як такий було використано *Allium cepa*-тест [291, 380, 457]. Для визначення мутагенного ефекту враховували хромосомні аберації – зміни структури хромосом, серед яких виділяють делеції (видалення ділянки хромосоми), інверсії (зміна порядку генів ділянки хромосоми на зворотній), дуплікації (повторення ділянки хромосоми), транслокації (перенесення ділянки хромосоми на іншу). Найлегше виявляти такі хромосомні аберації: фрагменти хромосом (є результатом делецій), мости (є результатом злиття різних хромосом), відставання та втрати хромосом (є результатом ушкодження центромери хромосом) [152, 291].

Проведені дослідження дозволили встановити здатність ЛПС штамів *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ 1011 і 9780 порушувати цілісність хромосом у клітинах апікальної меристеми *A. cepa* сорту Халцедон. Слід зауважити, що таку властивість ЛПС інших патогенних видів бактерій виявлено і за дії на клітини людини і тварин [280, 350, 473]. Виникнення мутацій у клітинах людини і тварин за участю ЛПС пов'язане із оксидативним стресом [492]. Однак, за вивчення здатності *P. syringae* pv. *tomato* спричинювати пошкодження ДНК, було встановлено, що утворення таких пошкоджень у *Arabidopsis* не може бути активацією захисних механізмів рослини та оксидативним вибухом. Тому авторами висунуто припущення, що фітопатогенні мікроорганізми можуть спричинювати пошкодження ДНК рослин без залучення механізму утворення активних форм кисню [483].

Зважаючи на отримані дані та враховуючи існуючу думку про зв'язок між мутагенною активністю і пухлиноутворенням [352], вивчено вплив на утворення пухлин ЛПС *P. syringae* pv. *atropaciens*. Дослідження було проведено за використання рослинної [184, 272, 283] і тваринних моделей пухлинного росту.

Найбільшу протипухлинну активність спостерігали за оброблення експлантатів ЛПС *P. syringae* pv. *atropaciens* до інокуляції суспензією клітин *A. tumefaciens*. Відомо, що *A. tumefaciens* можуть індукувати пухлинний процес лише за умови прикріплення до рослинних клітин в певних сайтах зв'язування

[188, 535]. Враховуючи встановлену відсутність у ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* антибактеріальної активності, ми припускаємо, що ЛПС впливає на процеси прикріплення *A. tumefaciens* до рослинних клітин.

Іншу дію ЛПС спостерігали у тест-системі з тваринами. Введення тваринам з відтвореними модельними системами пухлинного росту (асцитні і солідні форми різних за гістогенезом пухлин) ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 не має статистично достовірного впливу на перебіг пухлинного процесу і не відзначається помітною протипухлинною активністю.

Отримані дані узгоджуються з даними літератури, що вказують на залежність впливу на розвиток пухлин ЛПС фітопатогенних бактерій від типу пухлини і джерела отримання ЛПС [47, 555].

Одним з перших етапів відповіді рослини на проникнення фітопатогена є утворення активних форм кисню (АФК), зокрема, пероксиду водню і супероксиданіон-радикалу [107]. Індукування оксидативного стресу і синтез АФК відбувається як за участі інтактних клітин мікроорганізмів, так і їхніх окремих компонентів, наприклад, ЛПС [107]. АФК є продуктами нормального клітинного метаболізму і, за фізіологічно нормального утворення в умовах функціонування антиоксидантного захисту, є безпечними для клітини [81]. Однак, за посилення утворення АФК (окислювальний стрес) під впливом інфекційних агентів, відмічають різноманітні цитотоксичні пошкодження [160]. Рівень АФК у клітинах регулюється ферментними системами антиоксидантного захисту, зокрема, супероксиддисмутазою, каталазою, пероксидазою [107]. Для виявлення у проростках цибулі оксидативного стресу, індукованого дією ЛПС, ми визначили пероксидазну і каталазну активність, а також вміст малонового альдегіду, який утворюється в результаті перекисного окислення ліпідів.

Встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* підвищують пероксидазну активність проростків *A. cepa*. У проростках цибулі не спостерігали значної зміни каталазної активності за дії ЛПС, але виявляли значне збільшення кількості малонового альдегіду в рослинних екстрактах проростків цибулі. Одержані результати дають підстави вважати, що

пошкодження хромосом у клітинах апікальної меристеми цибулі опосередковані оксидативним стресом, який індукується ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Підвищення активності пероксидази виявлено також за впливу ЛПС фітопатогенних бактерій на *Nicotiana tabacum* [260]. Водночас відомо, що ураження фітопатогенами рослин може не впливати на активність каталази [357], а у разі індукування мікроорганізмами реакції надчутливості у рослин спостерігається навіть інгібування цього ферменту.

Збудники бактеріальних хвороб значною мірою впливають на перебіг фізіолого-біохімічних процесів у клітинах рослини-хазяїна. Тому увагу було приділено впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens* на стан, фотохімічну активність фотосинтетичного апарату, а також активність антиоксидантних ферментів рослин пшениці. Встановлено, що на початковому етапі розвитку симптомів базального бактеріозу – через тиждень після інокуляції рослин пшениці ярої його збудником *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 виявляли суттєве підвищення ферментативної активності компонентів антиоксидантного захисту – каталази і пероксидази, що свідчить про запуск механізмів стійкості рослини до патогену, але за цих умов вдвічі знижувався вміст основних фотосинтетичних пігментів: хлорофілу *a*, хлорофілу *b* і каротиноїдів в листових пластинках, що могло бути спричиненим як зниженням рівня витрати асимілятів на біосинтетичні процеси, так і більш швидким руйнуванням пігментних комплексів в умовах окиснюваного стресу.

Збільшення частоти хромосомних аберацій, яке індуковане ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*, можна розглядати як негативне явище, що призводить врешті рещт до втрати цінних властивостей вирощуваних сортів рослин. З іншого боку, враховуючи мутагенні властивості ЛПС фітопатогенних бактерій, їх можна розглядати одночасно як мутагенний і як селективний фактор при здійсненні клітинної селекції на стійкість до збудників бактеріальних хвороб.

Наявність у середовищі інактивованих клітин (ІК) або ЛПС вірулентного для пшениці штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 зумовлювало пригнічення поділу і проліферації калюсних клітин, різке зменшення кількості утворених

колоній у присутності чинників патогенності бактерій порівняно з контролем, що пов'язано з генетичними і адаптаційними змінами. Навіть за низького вмісту в середовищі (0,4 % і 0,5 %) ІК і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 виявляли токсичний вплив на калюсну культуру пшениці – виживання становило 17,5–43,2%. За наявності у середовищі 0,8% досліджених фітотоксичних речовин відбувалося побуріння калюсної тканини і зменшення кількості життєздатних клітин. Практично повне пригнічення проліферації калюсів спостерігали за наявності у середовищі 1% суспензії ІК або розчину ЛПС.

За дії 0,4% і 0,5% ІК і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 до кінця першого пасажу вижило до 41,3–44,6% калюсів, а після трьох – від 14,3–28,5%. Після пасажу на середовищі без селективного чинника і наступної перевірки росту в селективних умовах було виділено від 7,4 до 10,5% живих колоній. Таким чином, клітини і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 проявляли токсичний вплив, який супроводжувався пригніченням життєздатності калюсних клітин пшениці, що може бути пов'язано з порушенням нормальної роботи ферментів, стану цитоплазматичних мембран і клітинної стінки та процесів передачі генетичної інформації під час ділення клітин.

Визначення пероксидазної активності калюсних тканин пшениці на середовищі з ІК збудника *P. syringae* pv. *atrofaciens* показало, що в цілому активація цього ферменту у калюсів дослідних варіантів вища, ніж у контролі. За дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на 10 годину культивування пероксидазна активність становила 10 в.о./г ваги калюсу, на 17 год – 24 в.о./г ваги калюсу і на 31 год активність зменшувалася до 18,5 в.о./г ваги калюсу. За обробки калюсних клітин ІК авірулентного для пшениці штаму *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039 пероксидазна активність залишалася на рівні контролю.

Отже, ЛПС і ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* проявляли фізіологічну активність на клітинному рівні в зниженні життєздатності клітин у калюсній культурі та субклітинному – в підвищенні пероксидазної активності. Зміна пероксидазної активності як ключового фермента неспецифічної стійкості

рослин є однією із захисних реакцій, індукованих патогенами або продуктами їхньої життєдіяльності. Відомо, що фітотоксичні метаболіти фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *aptata* та *P. syringae* (*P. wieringae*) за тривалого спільного культивування в середовищі Мурасіге-Скуга для калусної тканини цукрових буряків зберігали свою фітотоксичну і серологічну активність, що підтверджує доцільність їхнього використання для проведення клітинної селекції для одержання стійких клітинних ліній цукрових буряків [128]. Використання ЛПС *P. syringae* pv. *aptata* і *P. syringae* (*P. wieringae*) у концентрації 0,8% дозволяло отримати клітинні лінії цукрових буряків із підвищеною стійкістю до збудників бактеріальних хвороб [128].

Проведені дослідження підтверджують ефективність використання ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* як селективного фактора для визначення чутливості сортів пшениці до збудника базального бактеріозу та здійснення селекції. На етапі проліферації калюсів інактивовані клітини бактерій і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* в дозах 0,4 до 1% проявляли токсичний вплив на калусні тканини пшениці сорту Хуторянка. Встановлено можливість застосування ЛПС і ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* у концентрації максимального інгібування ІК₈₀ як селективного фактора для визначення стійких ліній пшениці.

Результати проведених гістохімічних і фізіологічних досліджень показали, що у проростків пшениці, які вирощували в умовах прямого впливу ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens*, пероксидазна активність збільшувалась в 1,7–1,8 раз порівняно з контрольними рослинами. В нормальних умовах вирощування проростків пшениці *in vitro* пероксидазну активність було виявлено гістохімічно (бензидинова реакція) у клітинних стінках і вакуолях епідермісу колеоптіля, в мезофілі та флоемі першого асиміляційного листка.

Високий рівень пероксидазної активності, який виявлено у флоемі провідних пучків першого справжнього листка, свідчить про те, що в системі тканин проростка активізується процес захисної реакції рослинного організму на фітотоксичну дію токсинів та інших біологічно активних метаболітів фітопатогена. Висока пероксидазна активність у ситовидних трубках і клітинах-

супутниках, можливо, є неспецифічною адаптаційною реакцією рослини до конкретного фітопатогена, яку можна розглядати як універсальний засіб боротьби рослини з паразитами на тканинному і клітинному рівнях.

ЛПС і ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 проявляли фізіологічну активність на клітинному рівні в зниженні життєздатності клітин у калюсній культурі та субклітинному в підвищенні пероксидазної активності. Встановлено можливість застосування ЛПС і ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* у концентрації максимального інгібування ІК₈₀ як селективного фактора для визначення чутливості ліній пшениці та проведення клітинної селекції для одержання стійких генотипів до збудника базального бактеріозу.

За реакцією калюсних клітин пшениці на фітотоксичні метаболіти *P. syringae* pv. *atrofaciens* сорти Подолянка і Столична є більш стійкими до збудника базального бактеріозу, тоді як сорти Фаворитка і Смуглянка – менш стійкі. Методом клітинної селекції отримано стійкі, здатні до регенерації калюсні лінії озимої пшениці сортів Подолянка, Столична, Фаворитка і Смуглянка. Калюсні лінії сортів Подолянка і Столична перспективні для селекційної роботи зі створення сортів стійких до збудника базального бактеріозу пшениці, а одержані рослини-регенеранти потребують подальшої перевірки на стійкість у польових умовах.

Таким чином, нами встановлено, що збудник базального бактеріозу поширений на всій території України як патоген пшениці, епіфіт цієї культури і збудник хвороб сегетальної рослинності в посівах пшениці. Показано, що ефективним пестицидом для контролю збудника є манкоцеб у рекомендованих виробником концентраціях. Встановлено, що фунгіцидам, які використовують у посівах пшениці – беноміл, тіофанат-метил і флудіоксаніл, притаманні мутагенні властивості щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Виявлено здатність пестицидів індукувати морфологічну дисоціацію *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що ускладнює діагностику базального бактеріозу. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризуються підвищеною здатністю до утворення біоплівки за збереження вірулентності, що може призводити до підвищення здатності

збудника до виживання у філосфері. Встановлено, що фітопатогенні бактерії *P. syringae* не мають мутагенної активності, не здатні активувати відомі промутагени, а їхні ліпополісахариди характеризуються антимуtagenними властивостями в бактеріальній тест-системі та здатністю збільшувати кількість хромосомних аберацій у рослинного тест-об'єкта *Allium cepa*. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* активують системи захисту (оксидативний стрес) у рослини-хазяїна пшениці та *A. cepa*, що призводить до утворення активних форм кисню і є можливим механізмом мутагенної активності цих біополімерів в рослинних тест-системах. Показано можливість одержання здатних до регенерації калюсних культур пшениці, стійких до фітотоксичних метаболітів збудника базального бактеріозу при пасируванні на поживні середовища з сублетальними концентраціями ІК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400.

Встановлені в роботі закономірності є теоретичним підґрунтям для розроблення методів діагностики і контролю збудника базального бактеріозу пшениці шляхом екологічно обґрунтованого використання пестицидів і створення стійких до збудників сортів пшениці.

Отже, збудник базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens* постійно присутній в агрофітоценозі пшениці і здатний уражувати не лише пшеницю, а й бур'яни у її посівах, що вимагає здійснення моніторингу збудника. Популяція збудника є однорідною за ознаками фенотипу і генотипу, ефективним методом виявлення збудника є застосування поліштамової антисироватки, для створення якої використовують антисироватки до штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* К-1025 (серогрупа II), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 (серогрупи IV), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 948 (серогрупа V) і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7194 (серогрупа VI). Застосування пестицидів не дозволяє ефективно контролювати збудник базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, разом із тим широко використовувані в посівах зернових культур альфа-циперметрин і трибенурон-метил+трифенсульфурон-метил збільшують у 10 – 100 разів частоту морфологічної дисоціації *P. syringae* pv. *atrofaciens*, чим посилюють гетерогенність популяції, що розширює межі виживання цього виду,

оскільки індуковані морфологічні R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівок.

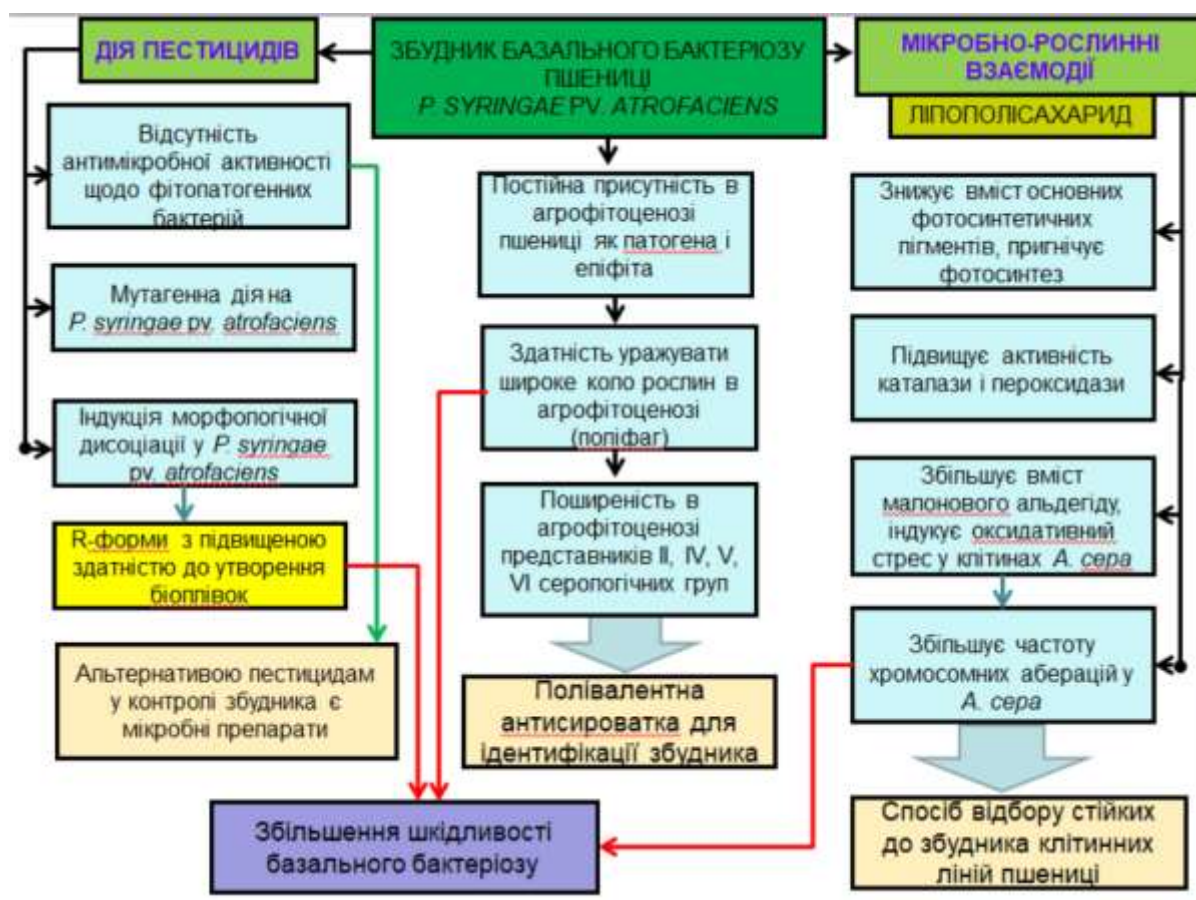


Рис.1. Концептуальна схема функціонування збудника базального бактеріозу

Ефективним з метою контролю збудника базального бактеріозу пшениці може бути використання біологічних препаратів на основі мікроорганізмів з антагоністичною активністю. Хоча *P. syringae* pv. *atrofaciens* не має мутагенної дії та не спричинює активації промутагену, а його ЛПС проявляє антимутагенну активність в бактеріальній тест-системі, в рослинній тест-системі з *A. cerea* ЛПС збудника базального бактеріозу спричинюють збільшення частоти хромосомних аберацій, яке може бути наслідком оксидативного стресу, що індукується цим біополімером у рослинних клітинах. Мутагенна активність ЛПС збудника щодо рослинних клітин може бути використана у клітинній селекції пшениці на стійкість до *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі комплексного дослідження біологічних властивостей і взаємодії з рослиною сформульовано наукову концепцію про відсутність спеціалізації збудника базального бактеріозу пшениці й здатність уражувати широке коло рослин в агрофітоценозі, де застосування пестицидів посилює гетерогенність його популяції і є одним із факторів зростання шкідливості, та встановлено негативний вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на генетичний матеріал рослин, що визначає науково обґрунтовані підходи для розроблення методів його діагностики і контролю.

1. Встановлено, що *P. syringae* pv. *atrofaciens* поширений в агрофітоценозах пшениці як патоген, епіфіт і збудник хвороб сеgetальної рослинності, що становить значну загрозу виникнення епіфітотій та потребує здійснення заходів моніторингу збудника.

2. Популяція *P. syringae* pv. *atrofaciens* є однорідною за фенотиповими і генотиповими властивостями. Вперше встановлено, що для всіх штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* домінуючим продуктом за RAPD-ампліфікації з праймером ОРА-13 є фрагмент розміром 700 т.п.н., наявність якого відрізняє представників цього патовару від інших патоварів. Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділені із агрофітоценозу пшениці, належать до чотирьох серологічних груп, що використано для розроблення поліштамової антисироватки для ідентифікації збудника.

3. Показано, що антибактеріальна активність щодо збудника базального бактеріозу пшениці та інших патоварів *P. syringae*, а також *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas vesicatoria* притаманна лише препаратам, що містять манкоцеб. Перспективними у контролі збудника базального бактеріозу є мікробні препарати на основі *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* і *Pseudomonas aureofaciens*.

4. Вперше встановлено, що пестициди, які використовують у посівах пшениці, чинять мутагенну дію на збудника базального бактеріозу пшениці, що необхідно враховувати при розробленні екологічно обґрунтованих методів

контролю патогенів. Найбільшу мутагенну активність має трибенурон-метил + трифенсульфурон-метил, який збільшував кількість Str^R мутацій *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 у 4,7 – 6,5 рази. Беноміл, тіофанат-метил, флудіоксоніл проявляють слабку мутагенну активність, підвищуючи кількість Str^R мутацій у *P. syringae* pv. *atrofaciens* у 1,8 – 2,4 рази.

5. Альфа-циперметрин і трибенурон-метил+ трифенсульфурон-метил підвищують у 10 – 100 разів частоту морфологічної дисоціації *P. syringae* pv. *atrofaciens* з утворенням R-форм, які, за збереження вірулентних властивостей, мають підвищену у 2,3 – 3,6 рази здатність до утворення біоплівки, що сприяє виживанню збудника у філосфері і призводить до ускладнень при діагностиці базального бактеріозу.

6. Виявлено, що загальною властивістю ліпополісахаридів (ЛПС) бактерій виду *P. syringae* є антимуутагенна активність у тесті Еймса. Ці біополімери зменшують пошкоджуючу дію біхромату калію і N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіну на 20 – 40%. Вперше виявлено, що *P. syringae* pv. *atrofaciens* не активують промутаген 3,3'-діамінобензидін.

7. Показано, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризуються токсичними і мутагенними властивостями щодо рослинних клітин, зменшуючи мітотичний індекс і підвищуючи у 2,3 рази частоту хромосомних аберацій у клітинах апікальної меристеми *Allium cepa*.

8. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* не впливають на процес пухлиноутворення у мишей з відтвореними модельними карциномою Ерліха і саркомою 37, але запобігають індукованому *A. tumefaciens* пухлиноутворенню на експлантатах картоплі.

9. За дії ЛПС збудника базального бактеріозу у клітинах *A. cepa* зростає пероксидазна активність, інтенсифікуються процеси перекисного окиснення ліпідів і збільшується вміст малонового альдегіду, що свідчить про індукування оксидативного стресу у рослинних клітинах, який є ймовірним механізмом генотоксичної дії ЛПС.

10. *P. syringae* pv. *atrogena* на початковому етапі розвитку симптомів базального бактеріозу підвищує активність ферментів антиоксидантного захисту рослин пшениці – каталази і пероксидази, знижує вміст основних фотосинтетичних пігментів, пригнічує процеси фотосинтезу.

11. Інактивовані клітини і ЛПС *P. syringae* pv. *atrogena* зумовлюють пригнічення поділу і проліферації калюсних клітин пшениці, на основі чого розроблено схему відбору стійких до патогена форм пшениці *in vitro*. Отримано стійкі, здатні до регенерації калюсні лінії пшениці сортів Подолянка і Столична, перспективні для селекційної роботи зі створення сортів, стійких до збудника базального бактеріозу пшениці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Абишев СК, Глазер ВМ. Мутагенез с основами генотоксикологии. СПб.: Нестор-История; 2015. 304 с.
2. Бавол АВ, Дубровна ОВ, Лялько П. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2008; 6(2):191–200.
3. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гвоздяк РІ. Антимутагенна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2008; 24:110–113.
4. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гвоздяк РІ. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9417 на процеси мутагенезу в про- та еукаріотній системах. Biopolymers and Cell. 2010; 26(1):23–28.
5. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Дзяман ХЗ. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на хромосомні аберації у *Allium cepa* L. В: Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 21-25 вересня 2010: Ялта, Україна. Сімферополь, 2010. с. 177–178.
6. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фізіологічний стан *Allium cepa* L. В: Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 9-13 серпня 2011; Березне, Україна; Київ, 2011. с. 163–164.
7. Богдан ЮМ, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Гвоздяк РІ, Патица ВП. Вплив ліпополісахарид-білкового комплексу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на *Agrobacterium tumefaciens* та пухлиноутворення. Наукові доповіді НУБіП. 2010; 1(17): <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2010-1/10bymatf.pdf>.
8. Брайон ОВ, Корнєєв ДЮ, Снегур ОО, Китаєв ОІ. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції

хлорофілу: Методичні вказівки для студентів біологічного факультету. К.: «Київський університет», 2000; 15 с.

9. Булеца НМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Патика ВП. Фізіологія росту *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens* за впливу пестицидів. Мікробіол журн. 2016; 78(3):52–60.

10. Булеца НМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Патика ВП. Чутливість фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів. Мікробіол журн. 2015; 77(6):62–69.

11. Буценко Л, Дуб'янська С, Коломієць Ю. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens* 9400 на калюсні клітини пшениці. В: Матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»; 15 листопада 2018 р: Київ, Україна. Київ: НУХТ, 2018. с. 45.

12. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА, Патика ВП. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів. В: Збірник тез IV^ї Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 21–22 травня 2015: Київ, Україна. Київ: ВЦ НУБіП України, 2015. с. 171–172.

13. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів. Вісник аграрної науки. 2015; 9:31–35.

14. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА. Морфологічна дисоціація фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* за дії пестицидів. В: Матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017»; 20-22 квітня 2017: Тернопіль, Україна. Тернопіль, 2017. с. 171–175.

15. Буценко ЛМ, Дуб'янська СА. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens* 9780 на мітотичний індекс у *Pisum sativum*. В: Матеріали наукової конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та

імунології»; 5 листопада 2019: Київ, Україна. Вінниця: Нова Книга, 2019. с. 34–35.

16. Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ. Вплив фітопатогенних бактерій та їхніх ліпополісахаридів на калюсні клітини пшениці. Біологічні системи: теорія та інновації. 2019; 10(2):17–24.

17. Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ. Клітинна селекція калюсних культур *Triticum aestivum* L. на стійкість до збудника базального бактеріозу. Наукові доповіді НУБіП України. 2019; 4(80): Режим доступу: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/issue/view/511>.

18. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Богдан ЮМ, Хархота МА. Жирнокислотні профілі ізольованих із сеgetальної рослинності агрофітоценозу пшениці штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens*. В: Збірник тез VII Міжнарод. наук.-практичн. онлайн конференції «Біотехнологія: звершення та надії»; 15 листопада 2019: Київ, Україна. Київ, 2019. с. 42–43.

19. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Булеца НМ, Патика ВП. Вплив інсектициду Альфа супер на фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* агрофітоценозу пшениці. Вісник аграрної науки. 2017; 3: 18–22.

20. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Булеца НМ, Патика ВП. Протипухлинна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* PDDCC 4394 в рослинній і тваринній тест-системах. В: Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку; гол. ред. В.В. Моргун. К.: Логос; 2017: с. 61–68.

21. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гуляєва ГБ, Патика ВП. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* на фотосинтетичний апарат пшениці. Вісник аграрної науки. 2019; 11: 48–54.

22. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гуляєва ГБ. Ліпополісахариди *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* та їх вплив на сільськогосподарські рослини. В: Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України; 11-15 вересня 2017: Одеса, Україна. Львів: СПОЛОМ; 2017. с. 123.

23. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Калініченко АВ, Патица ВП. Діагностика і контроль збудників бактеріальних хвороб пшениці. Методичні рекомендації. К.: ФОП ЯМЧИНСЬКИЙ, 2019. 37 с.

24. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ, Богдан ЮМ, Гвоздяк РІ. Використання RAPD-типуювання для вивчення гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу в Україні. В: Тези доповідей XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; 25-30 травня 2009: Ужгород, Україна. Ужгород: «Патент», 2009. с. 291.

25. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ, Дуб'янська СА. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в агрофітоценозі пшениці. Миронівський вісник. 2019; 8:91–107.

26. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ. Генотоксична дія ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* у *Allium cepa*-тесті. Біологічні системи: теорія та інновації. 2019; 10(3):44–54.

27. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ. Сучасні методи контролю збудників бактеріальних хвороб зернових і овочевих культур виду *Pseudomonas syringae*. Захист і карантин рослин. 2019; 9-10:1–5.

28. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Савенко ОА, Патица ВП. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів *Pseudomonas syringae*, ізольованих з агрофітоценозу зернових культур. Мікробіол журн. 2017; 79(3): 56–64.

29. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карева Ю. Антибактеріальна та мутагенна дія фунгіцидів на *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Агроєкологічний журнал. 2010; 4:71–79.

30. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА. Генетична гетерогенність штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на основі RAPD-ПЛР аналізу. Мікробіол журн. 2018; 80(5):48–62.

31. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА. Фітопатогенні бактерії в агрофітоценозах України. Пропозиція. 2018; 11:116–119.

32. Буценко ЛМ, Пирог ТП. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник. Київ: Ліра-К, 2018. 346 с.

33. Буценко ЛМ, Терещук ОО. Протипухлинна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. В: Тез. доп. VII Всеукраїнської науково-практичної конф. «Біотехнологія XXI століття»; 24 квітня 2013: Київ, Україна. К.: НТУУ «КПІ», 2013. с. 21–22.

34. Буценко ЛМ. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* – збудник базального бактеріозу пшениці. В: Матеріали Всеукраїнської наукової конференції «Інноваційні агротехнології»; 28 березня 2018; Умань, Україна. Уманський НУС: Редакційно-видавничий відділ, 2018. с. 40–42.

35. Буценко ЛМ. Активність пероксидази у проростках пшениці за дії *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. В: Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції «Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі»; 26 червня 2019: Умань, Україна. Умань, 2019. с. 8–9.

36. Буценко ЛМ. Біотехнологічні препарати у контролі збудника базального бактеріозу пшениці. В: Програма та тези матеріалів VIII міжнарод. науково-технічна конф. «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції»; 5-6 листопада 2019: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2019. с. 62–64.

37. Буценко ЛМ. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фізіолого-біохімічні процеси у клітинах *Allium cepa*. Мікробіол журн. 2016; 78(5): 65–74.

38. Буценко ЛМ. Геномодулювальна активність *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Біоресурси і природокористування. 2019; 11(3-4): 31–40. Режим доступу: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Bio/article/view/bio2019.03.003/11349>.

39. Буценко ЛМ. Геномодулювальна активність культуральної рідини та ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2008; 22:80–83.

40. Буценко ЛМ. Екологічні наслідки дії пестицидів на фітопатогенні бактерії. В: Збірник наукових праць VII-го Всеукраїнського з'їзду екологів з

міжнародною участю; 25 – 27 вересня 2019: Вінниця, Україна. Вінниця, 2019. с. 120.

41. Буценко ЛН, Гвоздяк РИ, Пасичник ЛА, Коломиец ЮВ, Парий МФ. Генетический полиморфизм *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* и *P. syringae* pv. *coronafaciens*. В: Материалы Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии»; 2–6 июня 2008: Минск, Белорусь. Минск, 2008. Т.1. с. 63–65.

42. Буценко ЛН, Пасичник ЛА, Патыка ВФ, Терещук ЕА. Фунгициды и бактериоз: идет борьба в лаборатории. Зерно. 2013; (1):148–151.

43. Буценко ЛН, Пасичник ЛА, Патыка ВФ. Использование коммерческих пестицидов для защиты от возбудителей бактериозов зерновых культур. В: Материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений – проблемы и перспективы»; 30-31 октября 2012: Кишинев, Молдова. Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2012; 41:357–360.

44. Варбанец Л.Д. Эндотоксины грамотрицательных бактерий: структура и биологическая роль. Мікробіол журн. 1994; 56(3):76–92.

45. Варбанец ЛД, Винарская НВ. Структура, функция, биологическая активность эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Сучасні проблеми токсикології. 2002; 1:9–13.

46. Варбанец ЛД, Здоровенко ГМ, Книрель ЮА. Методы исследования эндотоксинов. К.: Наук. думка; 2006. 237 с.

47. Варбанец ЛД, Шалько ЮП, Придатко ОЕ, Жукова ЕВ, Москаленко НВ. Биологическая активность липополисахарида *Pseudomonas solanacearum*. Мікробіол журн. 1995; 57(2):80–85.

48. Варбанец ЛД. Гликополимеры микроорганизмов: достижения и перспективы исследований. Прикладная биохимия и микробиология. 2014; 50(6):547-560.

49. Варбанец ЛД. Структура, функція та біологічна активність ліпиду А ліпополісахариду. Мікробіол журн. 2016; 78(6):37–49.

50. Васильева Г. Оценка воздействия пестицидов на окружающую природную среду Учебно-методическое пособие. Великий Новгород.: Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого - Институт сельского хозяйства и природных ресурсов, 2010. 33 с.

51. Ващенко ЛМ, Гвоздяк РІ, Пасічник ЛА. Протипухлинна активність ліпополісахариду *P. syringae* pv. *coronafaciens*. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2005; 16:17–22.

52. Ващенко ЛМ, Коломієць ЮВ, Гвоздяк РІ. Антимутагенна дія ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* та *Pseudomonas wieringae*. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2007; 20:226–229.

53. Ващенко ЛМ, Пасічник ЛА, Гвоздяк РІ. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на спонтанні та індуковані біхроматом калію мутації у *Salmonella typhimurium*. Біополімери і клітина. 2004; 20(4):295–299.

54. Ващенко ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва ІО. Використання комерційних пестицидів для боротьби із збудниками бактеріозів зернових культур. В: Тезиси докладов Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей»; 11–14 сентября 2007: Одесса, Украина. Одесса, 2007. с. 62.

55. Ващенко ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва ІО. Вплив фунгіцидів на деяких збудників бактеріозів зернових культур. В: Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції «Сучасні методи захисту рослин від шкідливих організмів»; 2–5 жовтня 2006; Київ, Україна. Київ, 2006. с.32–33.

56. Ващенко ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва ІО. Ефективність фунгіцидів для боротьби з бактеріозом зернових культур. Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннезнавства та сортовивчення. 2009; 13(53): 200–208.

57. Влияние пестицидов, используемых в сельском хозяйстве, на общественное здравоохранение. Женева: ВОЗ; 1993.

58. Волощук С.І. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* Schwabe: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук: 03.00.15 / Інститут агроекології УААН. Київ, 2006. 16 с.
59. Воробьева ЛИ, Чердынцева ТА, Абилов СК. Антимутагенное действие бактерий против мутагенеза индуцируемого 4-нитрохиолин-1-оксидом у *Salmonella typhimurium*. Микробиология. 1995; 64(2):228–233.
60. Газарян ИГ. Особенности структуры и механизм действия пероксидазы растений. Успехи биол. Химии. 2006; 46:303–322.
61. Галкін МБ, Водзінський СВ, Кириченко ГМ, Іваниця ВО. Особливості формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 при темновому та фотоіндукованому впливі вісмут-містких порфіринів. Микробиологія і біотехнологія. 2010; (3):51–60.
62. Галушко ВП, Береговий ВК. Економіка світового сільського господарства. К.: Нічлава, 2011. 1000 с.
63. Гвоздяк РІ, Яковлева ЛМ, Пасичник ЛА, Щербина ТМ, Огородник ЛЕ. Бактерии рода *Pseudomonas* на сорняках. Микробиол журн. 2005; 67(2):63–69.
64. Гвоздяк РІ, Кабашна ЛВ, Пасичник ЛА, Макарчук ЄА. Ендофітна мікрофлора зерна пшениці та її взаємодія з фітопатогенними бактеріями. Доп НАН України. 2001; 1:173–177.
65. Гвоздяк РІ, Пасичник ЛА, Ващенко ЛМ, Покиньюброда ТЯ, Карпенко ОВ. Синтез сурфактантів штамми *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Микробиол. журн. 2009; 71(3):10–14.
66. Гвоздяк РІ, Пасичник ЛА, Ващенко ЛМ. Вплив ліпополісахарид-білкового комплексу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на процес пухлиноутворення, спричинений *Agrobacterium tumefaciens*. Микробиол журн. 2003; 65(3):5–13.
67. Гвоздяк РІ, Пасичник ЛА, Яковлева ЛМ, Мороз СМ, Литвинчук ОО, Житкевич НВ, та ін. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: монографія / за ред. В. П. Патики. К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс»; 2011. 444 с.

68. Гвоздяк РІ, Яковлева ЛМ. *Pantoea agglomerans* – возбудитель болезней пырея ползучего (*Elytrigia repens*) и райграса высокого (*Arrhenatherum elatius*). Микробиол журн. 2007; 69(1):61–67.
69. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. Т.1. М.: Мир; 1983. 334 с.
70. Гершензон СМ, Александров ЮМ, Малюта СС, Бужієвська ТІ, Карпова ІС, Ларченко КА. Мутагенна дія нуклеїнових кислот і вірусів. К.: Знання; 1999. 29 с.
71. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998. 459 с.
72. Горбатова ОН, Жердев АВ, Королева ОВ. Триaziновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации. Успехи биологической химии. 2006; 46:323–348.
73. Грицай РВ, Яковлева ЛМ, Варбанець ЛД. Фітотоксичні властивості ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum*. Микробиол. журн. 2014; 76(2): 29–34.
74. Дмитрієв ОП, Кравчук ЖМ. Активні форми кисню та імунітет рослин. Цитологія і генетика. 2005; 4:64–74.
75. Дуб'янська С, Буценко Л. Індукція хромосомних аберацій у клітинах *Allium cepa* L. за дії ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* 9780. В: Матеріали 85 міжнарод. наук. конф. молод. учених, асп. і студ. «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті»; 11–12 квітня 2019: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2019. Ч.1. с.496.
76. Дуб'янська С, Буценко Л. Методи тестування на мутагенність чинників зовнішнього середовища. В: Матеріали ІІ всеукраїнської науково-практичної інтернет конференції «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи»; 21 березня 2019: Кропивницький, Україна. Кропивницький, 2019. с. 220–221.
77. Дуб'янська С, Буценко Л. Характеристика ліпополісахаридів фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* 9400 і *P. syringae* pv. *atofaciens* 9780. В: Матеріали 84 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню

проблем харчування людства у ХХІ столітті»; 23–24 квітня 2018: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2018. Ч.1. с. 477.

78. Дубровна ОВ, Моргун БВ. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. Физиология и биохимия культурных растений. 2009; 41(6):463–475.

79. Дубровна ОВ, Чугункова ТВ, Бавол АВ, Лялько П. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. К.: Логос, 2012. 428 с.

80. Дуган АМ, Журков ВС, Абилов СК. Критерии учета мутагенных эффекторов в тесте Эймса. Цитология и генетика. 1990; 24(6):41–45.

81. Дурнев АД, Середенин СБ. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). М.: Медицина; 1998. 328 с.

82. Дьяков ЮТ, Озерцовская ОЛ, Джавахия ВГ, Багирова СФ. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов; 2001. 302 с.

83. Егоров НС. Основы учения об антибиотиках. М.: Изд. МГУ; 1994. 512 с.

84. Жеребило ОЕ, Вишталюк НМ. Жирные кислоты общих липидов некоторых представителей рода и других энтеробактерий. Мікробіол журн. 1987; 49(6):83–85.

85. Зайченко АМ, Анриенко ЕВ, Цыганенко ЕС. Макроциклические трихотеценовые микотоксины. К.: Наук. думка; 2008. 248 с.

86. Здоровенко ГМ, Варбанец ЛД, Здоровенко ЭЛ, Винарская НВ, Яковлева ЛМ. Химико-биологическая характеристика липополисахаридов из коллекционной культуры *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ИМВ 381 и ее диссоциантов. Микробиология. 2004; 73(6):790–801.

87. Здоровенко ГМ, Здоровенко ЭЛ, Варбанец ЛД. Особенности состава, строения и биологические свойства липополисахаридов из различных штаммов *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. Микробиология. 2007; 76(6):774–789.

88. Здоровенко ГМ, Соляник ЛП, Захарова ИЯ, Губанова НЯ, Яковлева ЛМ, Гвоздяк РИ. Характеристика липида А липополисахаридов штаммов *Pseudomonas syringae*. Микробиол журн. 1995; 57(5):30–39.
89. Здоровенко ГМ, Шашков АС, Здоровенко ЭЛ, Кочарова НА, Яковлева ЛМ, Книрель ЮА, Рудольф К. Характеристика липополисахарида и структура О-специфического полисахарида бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* ИМВ 948. Биохимия. 2001; 66(4):457–466.
90. Здоровенко ГМ, Яковлева ЛМ, Гвоздяк РИ, Захарова ИЯ, Кошечкина ЛП. Выделение, химический состав и серологическая характеристика полисахарида *Pseudomonas wieringae*. Микробиол журн. 1982; 44(4):65–70.
91. Здоровенко ГМ. Внеклеточный липополисахарид грамотрицательных бактерий. Микробиол. журн. 1988;44(3):65–70.
92. Здоровенко ЕЛ, Позур ВК, Кучеренко МЄ. Біологічна активність ліпополісахаридів грамнегативних бактерій. Біполімери и клетка. 2000; 16(2):5–14.
93. Игнатов АН, Егорова МС, Ходыкина МВ. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней в России. Защита и карантин растений. 2015; 5:6–10.
94. Игнатов АН, Пунина НВ, Матвеева ЕВ, Корнев КП, Пехтерева ЭШ, Политыко ВА. Новые возбудители бактериозов и прогноз их распространения в России. Защита и карантин растений, 2009; 4:38–41.
95. Ильинских НН, Бочаров ЕФ, Ильинских ИН. Инфекционный мутагенез. Новосибирск: Наука; 1984. 168 с.
96. Івченко ТВ, Баштан НО, Черненко КМ. Клітинна селекція томата на стійкість до ранньої сухої плямистості (*Alternaria solani* Ell). Вісник ХНАУ. Серія : Рослинництво, селекція і насінництво, плодоовочівництво. 2016; 1:113–123.

97. Іутинська ГО, Ямборко НА. Мутагенна дія синтетичних пестицидів і препаратів біологічного походження на фунгіциди. Мікробіол журн. 2004; 66(5):57–61.
98. Іутинська ГО, Ямборко-Костирко НА. Спосіб визначення токсичної і мутагенної дії пестицидів на мікробні угруповання ґрунту. Патент України № 62576 А (UA). 2003 Гру. 15.
99. Каленська СМ, Єрмакова ЛМ, Паламарчук ВД, Поліщук ІС, Поліщук МІ. Системи сучасних інтенсивних технологій у рослинництві Підручник. Вінниця: Рогальська І.О.; 2015. 448 с.
100. Карамова НС, Денисова АП, Сташевски З. Мутагенное действие экстрактов растений картофеля *Solanum tuberosum* L., обработанных пестицидами. Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки. 2009; 151. кн.1:155–163.
101. Карамова НС, Денисова АП, Сташевски З. Оценка мутагенной активности пестицидов актара, зенкор, моспилан, пенкоцеб, фастак в тесте Эймса. Экологическая генетика. 2008; VI(4):29–33.
102. Клейн РМ, Клейн ДТ. Методы исследования растений. М.: Мир; 1974. 527 с.
103. Книрель ЮА, Здоровенко ГМ, Яковлева ЛМ, Шашков АС, Соляник ЛП, Захарова ИЯ. Антигенные полисахариды бактерий. 28. Структура О-специфической цепи липополисахарида *Pseudomonas syringae*, патовар *atrofaciens* К-1025, и *Pseudomonas holci* 90а (серогруппа II). Биоорг. химия. 1988; 14 (2):166–171.
104. Книрель ЮА, Здоровенко ГМ, Шашков АС, Губанова НЯ, Яковлева ЛМ, Гвоздяк РИ. Антигенные полисахариды бактерий. 27. Строение О-специфической полисахаридной цепи липополисахаридов *Pseudomonas syringae*, патовары *atrofaciens* 2399, *phaseolicola* 120а, и *Pseudomonas holci* 8299, относящихся к серогруппе VI. Биоорг. химия. 1988; 14 (1):92–99.

105. Коломієць ЮВ, Буценко ЛМ. Вплив бактеріального стресу на ізоферментний спектр пероксидази пшениці і цукрових буряків. Науковий вісник НУБіП України. 2009; 134(3):56–64.

106. Коломієць ЮВ, Буценко ЛМ. Можливості використання пестицидів для контролю збудників бактеріальних хвороб. В: Міжнародна науково-практична конференція "Пермакультура та екологічно безпечне землеробство"; 24 – 25 лютого 2018: Ужгород, Україна. Ужгород: Вид-во УжНУ «Говерла», 2018. с. 75–77.

107. Колупаев ЮЕ. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. 2007; 3(12):6–26.

108. Колупаев ЮЕ, Карпец ЮВ. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений. Ukr Biochem J. 2014; 86(4):18–35.

109. Корнеев ДЮ. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофила. К.: Альтерпрес; 2002. 191 с.

110. Косилович ГО, Коханець ОМ. Інтегрований захист рослин: навч. посіб. Львів : Львівський національний аграрний університет; 2010. 165 с.

111. Котляров ВВ, Дьяченко АА, Федулов ЮП. Бактериальные болезни озимой пшеницы и способы защиты от них. Труды кубанского государственного аграрного университета. 2006; (2):197–207.

112. Кукол К, Буценко Л. Реакція бур'янів у посівах цукрових буряків на штучне зараження збудниками бактеріозів. В: Тези доп. XII Всеукр. наук.-практ. конфер. мол. наук. і студ. «Екологічна безпека держави»; 19 квітня, 2018: Київ, Україна. К.:НАУ, 2018. с. 169–170.

113. Куцоконь НК, Безруков ВФ, Лазаренко ЛМ, Рашидов НМ, Гродзинський ДМ. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 1. Характеристика дозових залежностей, Цитология и генетика. 2003; 37(4):20–25.

114. Куцоконь НК, Лазаренко ЛМ, Безруков ВФ, Рашидов НМ, Гродзинський ДМ. Кількість аберацій на клітину як параметр хромосомної

нестабільності. 2. Порівняльний аналіз впливу факторів різної природи. Цитология и генетика. 2004; 38(1):55–62.

115. Лазарев АМ *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch) Young, Dye & Wilkie - Базальный бактериоз пшеницы. В: Афонин АН; Грин СЛ; Дзюбенко НИ; Фролов АН. (ред.) Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения [DVD-версия]. 2008, http://www.agroatlas.ru/en/content/related/Lonicera_edulis/.

116. Леонов ОЮ, Петренко ВП, Лучна ІС, Суворова КЮ, Чугаєв СВ. Хвороби пшениці, поширені в Україні: шкідливість, генетичний контроль та результативність селекції на стійкість. Селекція і насінництво. 2016; 109: 53-92.

117. Линдер АВ, Кабулова ФД, Чернин ЛС, Исмаилов ЗФ. Биоэкологические аспекты взаимодействия почвенных микроорганизмов с эукариотами. Докл. Международ. эколог. конгресса: Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности, Санкт-Петербург, 14-16 июня, 2000, Т.2. СПб. 2000. с. 395–397.

118. Логвиновский ВД, Негробов ОП, Логвиновская ТВ. Пестициды. Современные проблемы природопользования. Воронеж; 2003. 32с.

119. Лукаш Л. Мутагенез при інтеграційних процесах і еволюція ядерного геному. Біополімери і клітина. 2007; 23(3):172–187.

120. Маслак О, Томашевська А. Ринок пшениці в Україні та світі. Агробізнес сьогодні. 2016; 12(331): Режим доступу: <http://www.agro-business.com.ua/ekonomichnyi-gektar/5671-rynok-pshenytsi-v-ukraini-ta-sviti.html>.

121. Мельничук МД, Кляченко ОЛ, Коломієць ЮВ. Біотехнологія рослин: практикум. К.: Компринт, 2012. 120 с.

122. Мельничук СД, Лоханська ВЙ, Баранов ЮС, Цвіліховський ВІ, Жук ЄВ, Павлінчук ВІ, Скрипник ОІ. Склади непридатних пестицидів – потенційне джерело забруднення продуктів харчування тваринного походження. Науковий вісник НАУ. 2006; (102):217–223.

123. Милько ЕС, Егоров НС. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ; 1991. 144 с.
124. Милько ЕС, Котова ИБ, Нетрусов АИ. Процесс диссоциации у бактерий. М.: МАКС Пресс; 2007. 68 с.
125. Миронов АА, Комиссарчик ЯЮ, Миронов ВА. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Санкт-Петербург: Наука; 1994. с. 146.
126. Мирошниченко ОС. Биосинтез, физиологическая роль и свойства каталазы. Биополимеры и клетка. 1992; 8(6): 3-25.
127. Мурас ВА, Гвоздяк РИ, Житкевич НВ, Азимцев АГ. Естественная изменчивость морфолого-биохимических и патогенных свойств коллекционных культур фитопатогенных бактерий. Микробиол журн. 1983; 45(5):36–42.
128. Коломієць ЮВ, Яковлева ЛМ, Кляченко ОЛ, Ващенко ЛМ. Метаболіти бактерій роду *Pseudomonas* як селективний фактор стійкості цукрових буряків до бактеріозів. Мікробіол. журн. 2005; 67(6):64–72.
129. Новиков ДК, Генералов ИИ, Данющенкова НМ, Железняк НВ, Кардович ГА, Окулич ВК и др. Медицинская микробиология с практическими навыками, ситуационными задачами, контрольными тестовыми заданиями. Витебск: ВГМУ; 2010. 562 с.
130. Пасичник ЛА, Королева ИБ, Гвоздяк РИ. Серологические свойства возбудителя бактериоза ржи *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Микробиол журн. 1991; 53(6):82–87.
131. Пасичник ЛА, Патыка ВП, Ходос СФ, Винничук ТС. Базальный бактериоз пшеницы и влияние агротехнических приемов на его распространение. Мікробіол журн. 2012; 74(4):37–44.
132. Пасичник ЛА, Савенко ЕА, Буценко ЛН, Патыка ВФ, Калиниченко АВ. *Pseudomonas syringae* в агрофитоценозе пшеницы. Наука и мир. Международный научный журнал. 2014; 4(8):52–56.
133. Пасичник ЛА, Савенко ЕА, Буценко ЛН, Щербина ТН, Патыка ВФ. *Pseudomonas syringae* – возбудитель бактериальных болезней сорняков. Мікробіол журнал. 2013; 75(4):41–46.

134. Пасичник ЛА, Ходос СФ, Буценко ЛН, Патыка ВФ. Бактериальные болезни пшеницы. Зерно. 2011; (2):72–81.

135. Пасичник ЛА, Яковлева ЛМ, Гвоздяк РИ, Василев ВИ. Серологическая гетерогенность штаммов *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* и их экологические ниши. Микробиология. 2003; 72(6):828–833.

136. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Гуляєва ГБ, Токовенко ІП, Курченко ІМ, Сирчін СО, Юр'єва ОМ, Снігур ГО, Шевченко ОВ, Будзанівська ІГ, Кириленко ЛВ, Сушанович Д, Калініченко АВ, Демченко ОА, Пати́ка ВП. Хвороби пшениці. За ред. Л.А. Пасічник. Монографія. Вінниця: «Віндрук», 2019. 139 с.

137. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Щербина ТМ. Бактеріози рослин і органічне землеробство. В: Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України; 11-15 вересня 2017: Одеса, Україна. Львів: СПОЛОМ; 2017. с. 81.

138. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ. Серологічні особливості бактерій *Pseudomonas syringae* агроecosystem зернових культур. Мікробіол журн. 2018; 80(4):41–54.

139. Пастошук АЮ, Сківка ЛМ, Буценко ЛМ, Пати́ка ВП. Вплив збудника базального бактеріозу на пшеницю різних сортів. Мікробіологія і біотехнологія. 2018; 2: 39–48.

140. Пастушенко ЛТ, Симонович ІД. Серологические группы фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*. I. Антигенное родство внутри видов. Микробиол журн. 1979. 41(3):222–228.

141. Пастушенко ЛТ, Симонович ІД. Серологические группы фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*. II Антигенное родство разных видов. Микробиол журн. 1979; 41(4):330–339.

142. Пат. UA 136416 U Експрес-діагностика збудника базального бактеріозу пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* / Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Пати́ка ВП. Опубл. 27.08.2019. Бюл. № 16.

143. Пат. UA 139621 U Спосіб відбору стійких до збудника базального бактеріозу клітинних ліній пшениці / Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ, Пасічник ЛА, Калініченко АВ, Пати́ка ВП. Опубл. 10.01.2020. Бюл. № 1.

144. Пати́ка ВП, Гуля́єва ГБ, Буце́нко ЛМ, Щерби́на ТМ, Осипенко БО, Пасі́чник ЛА. Антиоксидантна і фотохімічна активність фотосинтетичного апарату пшениці ярої за дії *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. Вісник аграрної науки. 2016; 1:27–31.

145. Пати́ка ВП, Мака́ренко НА, Мокля́чук ЛІ, Серге́да ЛП, Шкату́ла ЮМ, Грини́к ІВ. Агроєкологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів. К.: Основа; 2005. 300 с.

146. Пати́ка ВП, Пасі́чник ЛА, Буце́нко ЛМ. Бактеріальні хвороби зернових культур та заходи боротьби з ними. Посібник українського хлібороба. К.: 2013; (1):202–208.

147. Пати́ка ВП, Пасі́чник ЛА, Буце́нко ЛМ. Бактеріальні хвороби пшениці та рису. Таврійський вісник аграрної науки. 2013; (1):51–56.

148. Пати́ка ВП, Пасі́чник ЛА, Гвоздя́к РІ, Петри́ченко ВФ, Корні́йчук ОВ, Буце́нко ЛМ, Житке́вич НВ, Данке́вич ЛА, Литвинчу́к ОА, Кири́ленко ЛВ, Моро́з СМ, Гуля́єва ГБ, Гнатю́к ТТ, Калі́ніченко АВ, Хархота́ МА. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. Монографія. Том. 2. За ред. В.П. Пати́ки. Вінниця: «Віндрук», 2017. 432 с.

149. Пати́ка ВП, Пасі́чник ЛА, Данке́вич ЛА, Моро́з СМ, Буце́нко ЛМ, Житке́вич НВ та ін. Діагностика фітопатогенних бактерій. Методичні рекомендації. За ред. В.П. Пати́ки. Київ; 2014. 76 с.

150. Пати́ка ВП, Тарари́ко ОГ. Агроєкологічний моніторинг та паспортизація сільськогосподарських земель. К.: Фітоцентр, 2002. 296 с.

151. Пати́ка ВФ, Пасі́чник ЛА, Буце́нко ЛМ. Бактеріальні хвороби зернових культур. В: Матеріали докладів Міжнародного симпозиума «Защита растений – проблемы и перспективы»; 30-31 октября 2012: Кишинев, Молдова. Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2012; 41:18–21.

152. Пауше́ва ЗП. Практикум по цитологии растений. М.: Колос; 1988. 271 с.

153. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. К.: Юнівест Медіа; 2014. 832 с.

154. Пересыпкин ВФ, Королева ИБ, Минько НД. Устойчивость сортов яровой пшеницы к базальному бактериозу. Докл ВАСХНИЛ. 1978; (6):11.
155. Петриченко ВФ, Корнійчук ОВ, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Житкевич НВ, Гнатюк ТТ, Патица ВП. Бактеріальні хвороби сільськогосподарських рослин і пестициди. Вісник аграрної науки. 2013; 4:21–26.
156. Потопальський АІ, Ткачук ЗЮ. Пухлини і нарости у рослин. К.: Вища школа; 1985. 160 с.
157. Савенко ОА, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Патица ВП. RAPD-аналіз *Pseudomonas syringae*, виділених з бур'янів в агрофітоценозі пшениці. Мікробіологія і біотехнологія. 2014; 27(3): 5–22.
158. Сарнацкая ВВ. Физиологические аспекты опухолевого роста растений. К.: Наук. думка; 1993. 150 с.
159. Сергеева ЛЕ. Изменение культуры клеток под воздействием стресса. К.: Логос; 2001. 98 с.
160. Скрипник НВ, Маслова ОО. Оксидативні пошкодження ДНК. Біополімери і клітина. 2007; 23(3):202–214.
161. Соловьева ТФ, Оводов ЮС. Липополисахарид-белковые комплексы внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Биоорганическая химия. 1983; 9(6):725-733.
162. Спирин АС. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958; 23(5):330–339.
163. Сторчоус ІМ, Михайленко СВ. Бур'яни та хвороби пшениці озимої за органічного вирощування. Захист і карантин рослин. 2015; 61:261–266.
164. Тарчевский ИА. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука; 2002. 294 с.
165. Терещук ОО, Буценко ЛМ. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* ICMP 4394 на пухлиноутворення спричинене *Agrobacterium tumefaciens*. В: Збірник матеріалів конференції daRostim 2012

"Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє"; 19–22 листопада 2012: Київ, Україна. Київ, 2012. с. 313–314.

166. Товкач ФІ, Романюк ЛВ, Горб ТЕ, Остапчук АН, Мучник ФВ. Диссоціація *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, зв'язана з змінами ліпополісахариду кліткової стінки. Мікробіол. журн. 2012;74(1):39–45.

167. Трещалина ЕМ. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. М.: «Практическая медицина»; 2005. 270 с.

168. Федоров ЛА, Яблоков АВ. Пестициды – удар по биосфере и человеку. М.: Наука; 1999. 462 с.

169. Фонштейн ЛМ. Методические рекомендации по применению теста Еймса *Salmonella* / микросомы. М.; 1983. 25 с.

170. Халилуев МР, Шпаковский ГВ. Генно-инженерные стратегии повышения устойчивости томатов к грибным и бактериальным патогенам. Физиология растений. 2013; 60(6): 763-775.

171. Чабанюк ЯВ, Бунас АА, Бровко ІС, Мазур СО. Екологічне оцінювання пестицидів та агрохімікатів за впливом на мезофауну. Агроекологічний журнал. 2015; (3):113–119.

172. Чумаевская МА, Матвеева ЕВ, Королева ИБ. Бактериальные болезни зерновых культур. М: Агропромиздат; 1985. 288 с.

173. Шиліна ЮВ, Гуца МІ, Моложава ОС, Шевченко ЮІ. Імуномодулювальні властивості бактеріальних ліпополісахаридів у рослин *Arabidopsis thaliana* та їх модифікація. Физиология растений и генетика. 2017; 49(2):121–128.

174. Яковлева ЛМ, Захарченко ТМ, Щербина ТМ, Патица ВП. Бактеріальні захворювання *Convolvulus arvensis* L. у посівах *Glycine max* (L.) Merr. та їх збудники. Вісник Харківського національного університету. Серія біологія. 2010; 3(21):92–98.

175. Яковлева ЛМ, Пастушенко ЛТ, Симонович ИВ, Степанюк ВВ. Диссоциация некоторых фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*. Микробиол журн. 1978; 40(5):596–600.
176. Яковлева ЛМ, Патыка ВФ, Гвоздяк РИ, Щербина ТН. Фитопатогенные бактерии пырея ползучего в посевах пшеницы. Микробиол журн. 2009; 71(3):30–37.
177. Ямборко НА, Іутинська ГО, Левчук ІВ, Піндрус АА. Компонентний склад забруднень і стан мікробного ценозу ґрунту полігону захоронення хлорорганічних відходів. Микробиол журн. 2013; 75(3):24–31.
178. Ямборко НА, Пиндрус АА. Токсическое и мутагенное действие гексахлорциклогексана и продуктов его микробной деструкции на микробный ценоз почвы. Микробиол журн. 2011; 73(6):50–57.
179. Abd-Alla MH, Bashandy SR. Progress in phytopathogenic bacteria: isolation and characterization. LAP LAMBERT Academic Publishing; 2011. 216 p.
180. Abd-Allah ARA. Alpha-lipoic acid counteracts the promoted oxidative DNA damage in the liver of septic rats. Saudi Pharmaceutical Journal. 2006; 14(2):89–99.
181. Adris P, Chung K.-T. Metabolic activation of bladder procarcinogens, 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by *Pseudomonas aeruginosa* and other human endogenous bacteria. Toxicol in vitro. 2006; 20:367–374.
182. Adris P, Lopez-Estraño C, Chung KT. The metabolic activation of 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by cytochrome P-450-107S1 of *Pseudomonas aeruginosa*. Toxicol in vitro. 2007;21(8):1663–71.
183. Agrios GN. Chapter twelve - Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. Editor: Agrios G. Plant Pathology (Fifth Edition), Academic Press, 2005: 615–703.
184. Ahmad S, Ullah F, Ayaz M, Zeb A, Ullah F, Sadiq A. Antitumor and anti-angiogenic potentials of isolated crude saponins and various fractions of *Rumex hastatus* D. Don. Biol Res. 2016; 49:18.

185. Ahmed E, Holmstrom SJM. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*. 2014; 7:196–208.
186. Al-Arabi F. Novel antagonistic bacteria as prospective agents for the biocontrol of some plant bacterial diseases. PhD thesis, Szent István Egyetem, Kertészettudományi Doktori Iskola. Khadija, 2002. 154 p.
187. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):167–202.
188. Alexandrova M, Bazzi C, Holst O. Protective effect of bacterial lipopolysaccharides in the grapevine – *Agrobacterium vitis* interaction. *Vitis*. 2000; 39(2):67–70.
189. Alexandrova M, Zaccardelli M, Stefani E, Bazzi C. Testing for *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* and *Xanthomonas campestris* pathovars on cereals in Italy. *EPPO Bulletin*. 1995; 25:437–448.
190. Alfano JB, Collmer A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*. 1996; 8:1683–1698.
191. Alfano JR, Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J Bacteriol*. 1997; 179(18):5655–5662.
192. Alfano JR, Collmer A. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*. 2004; (42):385–414.
193. Al-Sallami F, Karov SP, Vassileva P, Popova R, Vassilev V. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* associated with fungal black point of wheat (*Triticum aestivum*) grain. *Development Plant Pathology*. 1997; 9:505–509.
194. Alvarez AM. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol*. 2004; 42:339–66.
195. Ames BN, Mc Cann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian – microsomes mutagenicity test. *Mutat Res*. 1975; 31:347–364.

196. Anderson AJ. Differences between lipopolysaccharide compositions of plant pathogenic and saprophytic *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984; 48(1):31–35.
197. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers, *Trends in Ecology & Evolution*. 2004; 19(10):535–544.
198. Ansari M, Taghavi SM, Zarei S, et al. Phenotypically and Genotypically Heterogeneous Strains of *Pseudomonas syringae* Associated With Alfalfa Leaf Spot Disease in Iran. *Plant Disease*. 2019;103(12):3199–3208.
199. Arnold DL, Jackson RW, Waterfield NR., Mansfield JW. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *TRENDS in Genetics*. 2007; 23(6):293–300.
200. Aybeke M. *Fusarium* infection causes genotoxic disorders and antioxidant-based damages in *Orobanch* spp. *Microbiological Research*. 2017; 201:46–51.
201. Baggio JS, Peres NA, Amorim L. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, and thiophanate-methyl. *Plant Dis*. 2018; 102(9):1803–1810.
202. Baird RE, Gitaitis RD, Carling DE, Mullinix BG. Determination of whole-cell fatty acid profiles for the characterization and differentiation of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-4 and AG-7. *Plant Disease*. 2000; 84(7):785–8.
203. Baker CM, Chitrakar R, Obulareddy N, Panchal S, Williams P, Melotto M. Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. *Braz J Med Biol Res*. 2010; 43(8):698–704.
204. Baltrus DA, Nishimura MT, Romanchuk A, Chang JH, Mukhtar MS, Cherkis K, et al. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* 2011;7(7):e1002132.

205. Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 284(6):899–914.
206. Barta TM, Willis DK. Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striafaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. *Journal of Phytopathology*. 2005; 153(7-8):492–499.
207. Bartoli CG, Casalongueb CA, Simontacchia M, Marquer-Garcia CB, Foyer CH. Interaction between hormone and redox signaling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ Exp Bot*. 2013; 94:73–78.
208. Bazzi C, Stead DE, Alexandrova M, Stefani E. Identification and classification of fluorescent *Pseudomonas* species from cereals in Italy. In: Rudolph K, Burr TJ, Mansfield JW, Stead D, Vivian A, von Kietzell J. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. *Developments in Plant Pathology*. 1997; 9: 509–514.
209. Behlau F, Belasque JJ, Bergamin-Filho A, Graham JH, Leite RPJ, Gottwaldov TR. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. *Crop Protect*. 2008; 27(3/5):807–813.
210. Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999; 63(2):266–292.
211. Benjama A. Bacterial diseases of cereals in Marocco. *Cahiers Agricultures*. 1997; 6(8):605–610.
212. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition). Vol. 2. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria (editor G. M. Garrity). New York: Springer; 2005. 1106 p.
213. Berić T, Kojić M, Stanković S, Topisirović L, Degrassi G, Myers M, et al. Antimicrobial Activity of Bacillus sp. Natural Isolates and Their Potential Use in the Biocontrol of Phytopathogenic Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 2012;50(1):25–31.
214. Beveridge TJ. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*. 1999; 181:4725–33.

215. Bittel P, Robatzek S. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 2007; 10:335–341.
216. Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003; 531(1–2):37–80.
217. Boer SH. Use of monoclonal antibodies to identify and detect plant pathogenic bacteria. *Can J Plant Pathol*. 1987; 9(2):182–187.
218. Boldt TS, Jacobsen CS. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. *FEMS Microbiology Letters*. 1998; 161(1):29–35.
219. Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*. 2009; 60: 379–406.
220. Bolwell GP, Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense-broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol*. 1997; 51:347–366.
221. Boucher C, Genin S, Arlat M. Current concepts on the pathogenicity of phytopathogenic bacteria. *C R Acad Sci III*. 2001; 324(10):915–22.
222. Budchenko AA, Iliukhin VI, Viktorov DV. Comparative analysis of total cell protein electrophoregram of pathogenic *Burkholderia*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 2005; 2:24–8.
223. Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML et.al The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PNAS*. 2003; 100(18):10181–10186.
224. Buletsa NM, Butsenko LM, Pasichnyk LA, Patyka VP. Dissociation of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* under the effects of pesticides. In: Abstract book II International scientific conference «Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century»; 14-15 april 2016: Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2016. p. 28–29.

225. Bultreys A, Gheysen I. Biological and Molecular Detection of Toxic Lipodepsipeptide-Producing *Pseudomonas syringae* Strains and PCR Identification in Plants. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(5):1904–1909.
226. Butsenko L, Pasichnyk L, Patyka V. SDS-PAAG protein profiles of *Pseudomonas syringae* strains, isolated from segetal plants in wheat agrophytocenosis. В: Тези доповідей III-ї Міжнародної наукової конференції "Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті"; 19-20 квітня 2018; Київ, Україна. Київ, 2018. с. 30.
227. Butsenko L, Pasichyk L. Opportunistic bacteria in agroecosystems of Ukraine. *Internat. J. of Med. and Med. Res.* 2018; 4(1):78–82.
228. Butsenko L. Genotoxicity of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. In: Congress NEEFood – 2013; 26 – 29 may 2013: Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2013. p. 209.
229. Butsenko LM, Olishevsky SV. Biological activities of the *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011 lipopolysaccharide. В: Тези доповідей XIII з'їзду Товариства мікробіологів України; 1-6 жовтня 2013: Ялта, Україна. Ялта, 2013. с. 60.
230. Büttner D, He SY. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 2009; 150:1656–1664.
231. Büttner D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76(2):262–310.
232. Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:6708–6712.
233. Cevallos-Cevallos JM, Gu G, Danyluk MD, van Bruggen AH. Adhesion and splash dispersal of *Salmonella enterica typhimurium* on tomato leaflets: effects of rdar morphotype and trichome density. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;160(1):58 – 64.
234. Chakraborty SP, Kar Mahapatra S, Sahu SK, Das S, Tripathy S, Dash S, Pramanik P, Roy S. Internalization of *Staphylococcus aureus* in lymphocytes induces

oxidative stress and DNA fragmentation: possible ameliorative role of nanoconjugated vancomycin. *Oxid Med Cell Longev*. 2011; 942123.

235. Chaliha C, Rugen MD, Field RA, Kalita E. Glycans as modulators of plant defense against filamentous pathogens. *Front Plant Sci*. 2018; 9:928.

236. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017; 58(5):235–263.

237. Chen S, Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*. 1999; 260:726–735.

238. Cheng F, Ma A, Luo J, Zhuang X, Zhuang G. N-acylhomoserine lactone-regulation of genes mediating motility and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pathovar *tabaci* 11528. *Microbiologyopen*. 2017; 6(3):e00440.

239. Chrustek A, Hołyńska-Iwan I, Dziembowska I, Bogusiewicz J, Wróblewski M, Cwynar A, et al. Current research on the safety of pyrethroids used as insecticides. *Medicina (Kaunas)*. 2018; 54(4):61.

240. Chung KT, Chen SC, Claxton LD. Review of the *Salmonella typhimurium* mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes. *Mutat Res*. 2006;612(1):58–76.

241. Claflin LE, Ramundo BA. Evaluation of the dot-immunobinding assay for detecting phytopathogenic bacteria in wheat seeds. *Journal of Seed Technology*. 1987; 11(1):52–61.

242. Clark AE. The Occupational Opportunist: an Update on Erysipelothrix rhusiopathiae Infection, Disease Pathogenesis, and Microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2015; 37(18):143–151.

243. Claxton LD, Allen J, Auletta A, Mortelmans K, Nestmann E, Zeiger E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1987; 189(2):83–91.

244. Clerc A, Manceau C, Nesme X. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic

diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:1180–1187.

245. Collmer A, Badel JL, Charkowski AO, Deng W-L, Fouts DE, Ramos AR et al. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS.* 2000; 97(16):8770–8777.

246. Crebelli A, Zijno A, Conti L, Crochi B, Leopardi P, Marcon F et al. Further in vitro and in vivo mutagenicity assays with thiram and ziram fungicides: bacterial reversion assays and mouse micronucleus test. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1992; 12(3):97–112.

247. Curutiu C, Lazar V, Chifiriuc M. Pesticides and antimicrobial resistance: from environmental compartments to animal and human infections, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu. *New Pesticides and Soil Sensors: Academic Press;* 2017, 373–392.

248. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry.* 2006; 52:601–623.

249. Daniela B, He SY. Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology.* 2009; 150 (4):1656–1664.

250. De Araujo GG, Rodrigues F, Gonçalves FLT, Galante D. Survival and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* strains exposed to simulated high-altitude atmospheric conditions. *Sci Rep.* 2019;9(1):7768.

251. De Castro C, De Castro O, Molinaro A, Parrilli M. Structural determination of the O– chain polysaccharide from *Agrobacterium tumefaciens*, strain DSM 30205. *Eur J Biochem.* 2002; 269:2885–2888.

252. De Flora S, Ramel C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 1988; 202(2):285–306.

253. De Gara L, de Pinto MC, Tommasi F. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2003; 41:863–870.

254. Delledonne M. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005; 8:390–396.
255. Denny TP. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol*. 1995; 33:173–197.
256. Di Lorenzo F, De Castro C, Silipo A, Molinaro A. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiology Reviews*. 2019; 43(3): 257–272.
257. Dianovsky J, Sivikova K. In vivo and in vitro cytogenetic effect of supermethrin. *Biomedical and Environmental Sciences*. 1996; 8(4):359–66.
258. Dillon MM, Thakur S, Almeida RND, Wang PW, Weir BS, Guttman DS. Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol*. 2019;20(1):3.
259. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biol. And Med*. 1991; 10:225-242.
260. Dow M, Newman MA, von Roepenack E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathol*. 2000; 38:241–261.
261. Duke SO. Interaction of Chemical Pesticides and Their Formulation Ingredients with Microbes Associated with Plants and Plant Pests. *J. Agric. Food Chem*. 2018; 66 (29): 7553-7561.
262. Duveiller E, Fucikovsky L, Rudolph K. eds.. *The Bacterial Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico, D.F.: CIMMYT; 1997.
263. Duveiller E, Singh, RP, Nicol JM. The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica*. 2007; 157:417.
264. Dwivedi D, Khare M, Chaturvedi H, Singh V. *Plant Pathogenic Bacteria: Role of Quorum Sensing and Biofilm in Disease Development*. //In: *Biofilms in Plant and Soil Health, First Edition*. Edited by Iqbal Ahmad and Fohad Mabood Husain. John Wiley & Sons Ltd., 2017:387-407.

265. Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C, Vaneechoutte M. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by Arbitrary Primer PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:666-671.
266. Eribe ERK, Olsen I. SDS-PAGE of whole-cell proteins and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of *Leptotrichia* isolates. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2002; 14(4):193–203.
267. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection.* 2002; 4(8):837-851.
268. Ertugrul D, Güven K. Serological properties of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolates collected from Eskisehir. *Turk J Biology.* 1998; 22:189–195.
269. Escobar PA, Kemper RA, Tarca J., Nicolette J., Kenyon M, Glowienke S, et al. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2013; 752(2):99–118.
270. Esson D, Mather AE., Scanlan E, Gupta S, de Vries SP, Bailey D, Harris SR, McKinley TJ, Méric G., Berry SK, Mastroeni P, Sheppard SK, Christie G., Thomson NR, Parkhill J, Maskell DJ, Grant AJ. Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Sci Rep.* 2016; 6:38303.
271. Fatmi MB, Collmer A, Iacobellis NS, Mansfield JW, Murillo J, Schaad NW, et al. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens—identification, epidemiology, and genomics. Dordrecht: Springer 978-1-4020-6900-0; 2008.
272. Ferrigni NR, Putnam JE, Anderson B, Jacobsen LB, Nichols DE, Moore DS, et al. Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of euphorbiaceae seeds. *J Nat Prod.* 1982; 45(6):679–86.
273. Ficsor G, Bordas S, Stewart SJ. Mutagenicity testing of benomyl, methyl-2-benzimidazole carbamate, streptozotocin and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Salmonella typhimurium* in vitro and in rodent host-mediated assays, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 1978; 51(2):151–164.
274. Földes T, Bánhegyi I, Herpai Z, Varga L, Szigeti J. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against

phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2000;89(5):840-846.

275. Fort T, Robin C, Capdevielle X, Delière L, Vacher C. Foliar fungal communities strongly differ between habitat patches in a landscape mosaic. *Goss E, ed. Peer J.* 2016; 4:e2656.

276. Foysal MJ, Lisa AK. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 2018; 16(2): 387-392.

277. Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 1997; 387:394–401.

278. Fromme P, Kern J, Loll B, Biesiadka J, Saenger W, Witt HT, et al. Functional implications on the mechanism of the function of photosystem II including water oxidation based on the structure of photosystem II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002; 357(1426):1337–44.

279. Fry SC. Formation of isodityrosine by peroxidase isozymes. *J Exp Bot.* 1987; 38(3):853.

280. Gahrton G, Robert KH, Friberg K, Zech L, Bird AG. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood.* 1980; 56(4):640–647.

281. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 1999; 284(5418):1322–1328.

282. Galán JE, Maria Lara-Tejero, Thomas C. Marlovits, Samuel Wagner. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol.* 2014; 68: 415–438.

283. Galsky AG, Kozimor R, Piotrowski D, Powell RG. The crown-gall potato disk bioassay as a primary screen for compounds with antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* 1981; 67(3):689–692.

284. Gardan L, Shafic H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PA. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *Int J Syst Bacteriol.* 1999; (49(2):469–478.
285. Ghanem I, Orfi M, Shamma M. Biodegradation of chlorpyrifos by *Klebsiella* sp. isolated from an activated sludge sample of waste water treatment plant in damascus. *Folia Microbiologica.* 2007; 52(4):423–427.
286. Ghazi F, Eddine Henni D, Benmechernene Z, Kihal M. Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences.* 2009; 4 (1):78–87.
287. Ghorbal SKB, Chourabi K, Maalej L, Ammar AB, Ouzari H-I, Hassen A, Jaafoura H, Chatti A. *Pseudomonas aeruginosa* swarmer cells adaptation toward UVc radiations. *Front. Microbiol.* 2019; 10:556.
288. Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(4):771–795.
289. Gimenez-Ibanez S, Rathjen JP. The case for the defense: plants versus *Pseudomonas syringae*, In *Microbes and Infection.* 2010; 12(6):428–437.
290. Gough CL, Genin S, Zischek C, Boucher CA. *hrp* genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *Mol Plant-Microbe Inter.* 2002; 7:289–292.
291. Grant WF. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1982; 99(3):273–291.
292. Greendyke R, Byrd TF. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6):2019–2026.
293. Gregory RPF. A rapid assay for peroxidase activity. *Biochemical Journal.* 1966; 101:582–583.

294. Gu L, Bai Z, Jin B, Hu Q, Wang H, Zhuang G, et al. Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *J Environ Sci*. 2010; 22(1):134–141.
295. 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.
296. Gutiérrez-Barranquero JA, Carrión VJ, Murillo J, Arrebola E, Arnold DL, Cazorla FM, et al. A *Pseudomonas syringae* diversity survey reveals a differentiated phylotype of the pathovar *syringae* associated with the mango host and mangotoxin production. *Phytopathology*. 2013; 103(11):1115–29.
297. Gvozdyak RI, Yakovleva LM, Gubanov NYa. Lipopolysaccharides from pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Plant Pathogenic Bacteria: the 7th International Conference*. Budapest: Akademia Kiado; 1990. 131–6.
298. Haase A, Melder A, Smith-Vaughan H, Kemp D, Currie B. RAPD analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with recurrent melioidosis. *Epidemiol Infect*. 1995; 115:115–121.
299. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press; 1986. 346 p.
300. Halliwell B, Okezie IA. DNA Damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*. 1991; 281(1-2): 9–19.
301. Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JBH. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*. 2012; 10(7):497–506.
302. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpaa PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(7):3086–3091.
303. Hauck P, Thilmony R, He SY. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *PNAS*. 2003; 100(14):8577–8582.

304. Hausbeck MK, Bell J, Medina-Mora C, Podolsky R, Fulbright DW. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*. 2000; 90:38–44.
305. Heignett RC, Quirk AV. Properties of plant pathogenic *Pseudomonas* // *J.Gen. Microbiol*. 1979;110(1):77–81.
306. Hemavathi E, Rahiman MA. Effect of Ziram, Thiram, and Dithane M-45 on bone marrow cells of mice-assessed by micronucleus test. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1996; 56(2):190-6.
307. Hendrick CA, Sequeira L. Lipopolysaccharidedefective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 48:94–101.
308. Henis Y, Bashan Y. Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens. In: NJ Fokkema, J Van Den Heuvel eds., *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, 1986. 252–68.
309. Henriques FS. Leaf chlorophyll fluorescence: background and fundamentals for plant biologists. *Bot Rev*. 2009; 75:249–270.
310. Hensel A, Meier K. Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. *Planta Med*. 1999; 65(5):395–399.
311. Hernandez J, Ferru's M, Herná'ndez M, Owen RJ. Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997; 17:37–47.
312. Herrera A, Laborda E; Mutagenic activity in synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*. 1988; 3(6):509–514.
313. Hirano SS, Upper CD. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64:624–53.
314. Hisox JD, Israelstam RJ. The method for the extraction of chlorofill from leaf tissue whithout maceration. *Can J Bot*. 1979; 57(12):1332–1334.

315. Hofiusa D, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, Mundy J. Inducible cell death in plant immunity: Review. *Seminars in Cancer Biology*. 2007; 17:166–187.
316. Hollomon DW. Fungicide resistance: facing the challenge – a review. *Plant Protect Sci*. 2015; 51:170–176.
317. Horton P, Ruban A, Walters RG. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol*. 1994; 106(2):415–420.
318. Hosono A, Kashina T, Kada T. Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J Dairy Sci*. 1986; 69(9):2237–42.
319. Hrelia P, Maffei F, Fimognari C, Vigogni F, Cantelli-Forti G. Cytogenetic effects of metalaxyl on human and animal chromosomes. *Mutat. Res*. 1996; 369:81–86.
320. Hsieh ML, Chou CC. Mutagenicity and antimutagenic effect of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; 111(1):43–47.
321. Hsieh ML, Fang SW, Yu RC, Chou CC Possible mechanisms of antimutagenicity in fermented soymilk prepared with a coculture of *Streptococcus infantis* and *Bifidobacterium infantis*. *J Food Prot*. 2007; 70(4):1025–8.
322. Hueck CJ. Type III protein secretion system in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(2):379–433.
323. Iacobellis NS, Figliuolo G, Janse J, Scortichini M, Ciuffreda G. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. In: Rudolph K, Burr TJ, Mansfield JW, Stead D, Vivian A, von Kietzell J. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. *Developments in Plant Pathology*. 1997; 9:500-510.
324. Ikemoto S, Kuraishi H, Komagata K, Azuma R, Suto T, Murooka H. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *Journal Gen Appl Microbiol*. 1978; 24:199–213.
325. Iličić R, Balaž J, Stojšin V, Jošić D. Characterization of *Pseudomonas syringae* pathovars from different sweet cherry cultivars by RAPD analysis. *Genetika*. 2016; 48(1):285-295.

326. Ilyinskikh NN, Ilyinskikh EN, Ilyinskikh IN. Effect of petroleum-destroying microorganisms (of the genus *Acinetobacter*) on the cytogenetic structures of human lymphocytes in cell cultures. *Cytol. Genet.* 2012; 46:384–389.
327. Imfeld G, Vuilleumier S. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review. *European Journal of Soil Biology.* 2012; 49:22–30.
328. Itako AT, Tolentino-Júnior JB, Rauer Demant LA, Maringoni AC. Control of bacterial spot of tomato and activation of enzymes related to resistance by chemicals under field conditions. *Journal of Agricultural Science.* 2014;6(5):100–109.
329. Itoh S, Shimada H. Micronucleus induction by chromium and selenium, and suppression by metallothionein inducer. *Mutat Res.* 1996; 367:233–236.
330. Jacobsen-Pereira CH, dos Santos CR, Maraslis FT, Pimentel L, Lobo FeijóA J, Silva CI, et al. Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2018; 148:177–183.
331. Janse JD. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acids analysis. *Syst Appl Microbiol.* 1991; 14(4):335–345.
332. Jena GB, Bhunya SP. Mutagenicity of an organophosphate insecticide acephate – an in vivo study in chicks. *Mutagenesis.* 1994; 9:319–324.
333. 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.
334. Journet L, Hughes KT, Cornelis GR. Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. *Mol Membr Biol.* 2005; 22(1–2):41–50.
335. Kale R, Petty BT, Walker S, Ford JB, Dehkordi N, Tarasia S, et al. Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environ Mol Mutagen.* 1995; 25(2):148–53.
336. Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological reviews.* 1991; 55(2):288–302.

337. Kappas A, Georgopoulos SG, Hastie AC. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid aspergillus nidulans. *Mut. Res.* 1974; 26(1):17–27.
338. Katagiri F, Thilmony R, He SY. The Arabidopsis thaliana-pseudomonas syringae interaction. *Arabidopsis Book*. 2002;1:e0039.
339. Kazempour MN, Kheyrghoo M, Pedramfar H, Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum L.*) in Iran. *African Journal of Biotechnology*.2010; 9(20):2866–2871.
340. Kersters K, Pot B, Dewettinck D, Torck U, Vancanneyt M, Vauterin L, Vandamme P. Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. In: Priest F.G., Ramos-Cormenzana A., Tindall B.J. (eds) *Bacterial Diversity and Systematics*. Federation of European Microbiological Societies Symposium Series. Springer, Boston, MA, 1994; 75.
341. Khan PK, Sinha SP. Ameliorating effect of vitamin C on murine speum toxicity induced by three pesticides (endosulfan, phosphamidon and mancozeb). *Mutagenesis*. 1996; 11:33–36.
342. 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.
343. Khoodoo MHR, Jaufeerally-Fakim Y. RAPD-PCR fingerprinting and southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains isolated from different aroid hosts and locations. *Plant Diseases*. 2004; 88:980–988.
344. Kirzinger MWB, Nadarasah G, Stavrinides J. Insights into Cross-Kingdom Plant Pathogenic Bacteria. *Genes (Basel)*. 2011; 2(4):980–997.
345. Kittle RP, McDermid KJ, Muehlstein L, Balazs GH. Effects of glyphosate herbicide on the gastrointestinal microflora of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) Linnaeus. *Mar Pollut Bull*. 2018; 127:170–174.
346. Klement Z, Rudolph K, Sands D, editors. *Methods in phytobacteriology*. Budapest: Academia Kiado; 1990. 568 p.

347. Kolattukudy PE, Rogers LM, Li D, Hwang CS, Flaishman MA. Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1995; 92:4080–4087.
348. Kolattukudy PE. Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annu Rev Plant Physiol.* 1981; 32:539–567.
349. Kolomiets YV, Grygoryuk IP, Butsenko LM, Kalinichenko AV. Biotechnological control methods against phytopathogenic bacteria in tomatoes. *Applied ecology and environmental research.* 2019; 17(2):3215–3230.
350. Koturbash I, Thomas JE, Kovalchuk O, Kovalchuk I. Heat-killed bacteria induce genome instability in mouse small intestine, liver and spleen tissues. *Cell Cycle.* 2009;8(12):1935–9.
351. Kovalchuk I, Walz P, Thomas J, Kovalchuk O. The increased expression of proteins involved in proliferation, DNA repair and DNA methylation in spleen of mice exposed to *E. coli* O157:H7 lipopolysaccharide. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2013; 54:421–428.
352. Kovalchuk O, Walz P, Kovalchuk I. Does bacterial infection cause genome instability and cancer in the host cell? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2014; 761:1–14.
353. Krause A, Doerfel A, Gottfert M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant-Microbe Inter.* 2002; 15(12):1228–1235.
354. Krizkova L, Durackova Z, Sandula J, Sasinkova V, Krajcovic J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutat. Res.* 2001; 497(1-2):213–222.
355. Krizkova L, Durackova Z, Sandula J, Slamenova D, Sasinkova V, Sivonova M, et al. Fungal beta-(1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. *Anticancer Res.* 2003; 23(3B):2751–2756.
356. Kumar D, Khan PK, Sinha SP. Cytogenetic toxicity and no-effect limit dose of pesticides. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33:309–314.

357. Kwon S-I, Anderson AJ. Differential production of superoxide dismutase and catalase isozymes during infection of wheat by a *Fusarium proliferatum*-like fungal isolate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2001; 58:73-81.
358. Lal S, Ratna S, Said OB, Rajesh Kumar. Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. *Environmental Technology & Innovation*. 2018; 10:243–263.
359. Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen L, Neu TR, Molin S, Ullrich MS. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*. 2006; 152:2909–2918.
360. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009; 682(1):71–81.
361. Li C, Guan Z, Liu D, Raetz CR. Pathway for lipid A biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* resembling that of *Escherichia coli*. *PNAS*. 2011; 108(28):11387–11392.
362. Li L., Steffens J.C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*. 2002;2:239–247.
363. Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJH. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity on bean plants and hypersensitive response on nonhost plants. *J Bacteriol*. 1986; 168:512–522.
364. Lindgren PB. The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 1997; 35:129–152.
365. Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:1875–1883.
366. Lindström K, Martínez-Romero ME. International Committee on Systematics of Prokaryotes – Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Intern J System Evolutionary Microbiology*. 2005; 55:1383.

367. Little EL, Bostock RM, Kirkpatrick BC. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64(10): 3818–3823.
368. Lopez-Solanilla E, Bronstein PA, Schneider AR, Collmer A. HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol Microbiol*. 2004; 54:353–365.
369. Losada LC, Hutcheson SW. Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol Microbiol*. 2005; 55: 941–953.
370. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60(7):2286–2295.
371. Louws FJ, Rademaker ILW, de Bruijn FJ. The three DS of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and diseases diagnosis. *Ann Rev Phytopathol*. 1999; 37:81–125.
372. Lovrekovich L, Klement Z, Dowson WI. Serological investigation of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas morsprunorum*. *Phytopathol Zeitschrift*. 1963; 47:19–24.
373. Luck H. Catalase. *Methods in enzymatic analysis*. H-U Bergmeyer ed. London: Academic Press; 1963. p. 855–894.
374. Luderitz O, Freudenberg MA, Galanos C, Lehmann V. Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. *Current Topics in Membrane Transport*. 1982; 17:79–134.
375. Lukash LL. Regulation of mutagenesis by exogenous biological factors in the eukaryotic cell systems. *Biopolym Cell*. 2013; 29(4):283–294.
376. Mager DL. Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure: A review. *Journal of Translational Medicine*. 2006; 4:14.

377. Mahovic M, Gu G, Rideout S. Effects of pesticides on the reduction of plant and human pathogenic bacteria in application water. *J Food Prot.* 2013; 76(4):719-22.
378. Majer BJ, Grummt T, Uhl M, Knasmüller S. Use of Plant Bioassays for the Detection of Genotoxins in the Aquatic Environment: Review. *Acta hydrochimica et hydrobiologica.* 2005; 33(1):45–55.
379. Malandrin L, Huard A, Samson R. Discriminant envelope protein profiles between *Pseudomonas syringae* pv. *ptisi* and *P. syringae* pv. *syringae*. *FEMS Microbiology Letters.* 1996; 141(1):11–17.
380. Maluszynska J, Juchimiuk J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2005; 56:177–184.
381. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(4): 893–916.
382. Manova V, Gruszka D. DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Frontiers in Plant Science.* 2015; 6:885.
383. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology.* 2012; 13:614–629.
384. Maraite H, Bragard C, Duveiller E. The status of resistance to bacterial diseases of wheat. In: Buck HT, Nisi JE, Salomon N. *Wheat Production in Stressed Environments.* Springer; 2007: 37–50.
385. Maraite H, Weyns J. *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* and pv. *atrofaciens*, Specific Pathovars or Members of pv. *syringae*?. In: Rudolph K, Burr TJ, Mansfield JW, Stead D, Vivian A, von Kietzell J. (eds) *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens. *Developments in Plant Pathology.* 1997; vol 9.
386. Mariano RLR, McCarter SM. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microbial Ecology.* 1993; 26, (7):47–58.

387. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1983; 113(3–4):173–215.
388. Martin GB, Williams JG, Tanksley SD. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(6):2336–2340.
389. Martin OCB, Frisan T, Mihaljevic B. Bacterial Genotoxins as the Interphase Between DNA Damage and Immune Response. In: Gopalakrishnakone P, Stiles B, Alape-Girón A, Dubreuil J, Mandal M. (eds) *Microbial Toxins. Toxinology*. Springer; 2018. 459 p.
390. Martins PMM, Merfa MV, Takita MA, De Souza AA. Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Front Microbiol*. 2018; 25(9):1099.
391. Masrour-Roudsari J, Ebrahimpour S. Casual role of infectious agents in cancer: An overview. *Caspian J Intern Med*. 2017; 8(3):153–158.
392. Matilla MA. Chapter 10 - Metabolic Responses of Plants Upon Different Plant–Pathogen Interactions, Editor(s): Parvaiz Ahmad, Mohammad Abass Ahanger, Vijay Pratap Singh, Durgesh Kumar Tripathi, Pravej Alam, Mohammed Nasser Alyemeni. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*. Academic Press; 2018. p.195–214.
393. Matsushita T, Matsui Y, Sakuma S, Inoue T. Changes in mutagenicity of herbicide chlornitrofen during biodegradation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002; 516(1–2):71–79.
394. Matveeva YeV, Pekhtereva ESH, Polityko VA, Ignatov AN, Nikolaeva EV, Schaad NW. Distribution and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, causal agent of basal glume rot, in Russia. In: Iacobellis NS, Collmer A, Hutcheson SW, Mansfield JW, Morris CE, Schaad NW, Stead DE, Surico G, Ullrich MS (eds). *Presentations from the 6th International Conference on Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens, (Maratea, Italy, September 15–19). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands; 2003. p.97–105.

395. Mavridis A, Meyer D, Mielke H, Steinkampf G. Zum Auftreten und zur Schadwirkung der basalen Spelzenfäule beim Sommerweizen. *Kali-Briefe (Büntehof)*. 1991; 20:469–473.
396. Mc Cann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1975; 72(3):979–983.
397. Melotto M, Kunkel BN. Virulence Strategies of Plant Pathogenic Bacteria. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2013.
398. Metcalfe CD, Helm P, Paterson G, Kaltenecker G, Murray C, Nowierski M, et al. Pesticides related to land use in watersheds of the Great Lakes basin. *Sci Total Environ*. 2019; 648:681–692.
399. *Methods in phytobacteriology*. Eds Z Klement, K Rudolf, D Sands. Budapest: Akademiai Kiado; 1990. 568 p.
400. Mohsin SM, Nayem SA, Hore PK. In vitro and in vivo efficiency of some chemicals to manage the bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Int J Sustain Agril Tech*. 2016; 12(9):10–15.
401. Momol MT, Momol EA, Lamboy WF, Norelli JL, Beer SV, Aldwinekle HS. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *J Appl Microbiol*. 1997; 82(3):389–398.
402. Montero-Astúa M, Hartung JS, Aguilar E. Genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from Costa Rica, São Paulo, Brazil, and United States. *Phytopathology*. 2007; 97 (10):1338–1347.
403. Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127738.
404. Morris CE, Barny MA, Berge O, Kinkel LL, Lacroix C. Frontiers for research on the ecology of plant-pathogenic bacteria: fundamentals for sustainability: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2017;18(2):308–319.

405. Morris CE, Monier JM. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 2003. 41: 429–453.
406. Mota LJ, Sorg I, Cornelis GR. Type III secretion: the bacteria – eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 252(1):1–10.
407. Moulas C, Petsoulas C, Rousidou K, Perruchon C, Karas P, Karpouzas DG. Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *Biomed Res Intern.* 2013:Article ID 969750, 8 pages.
408. Mujumdar AM, Shinde SL, Karekar VR, Joshi SS, Dhuley J, Shanbhag V, Ghaskadbi S. Genotoxicity assessment of the antifungal antibiotic aureofungin in *Salmonella typhimurium* and Swiss albino mice. *Mutat Res.* 1994; 321(1-2):13–17.
409. Nadolny L, Sequeira L. Increases in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. *Physiological Plant Pathology.* 1980; 16(1):1–8.
410. Nehez M, Toth C, Desi I. The effect of dimethoate, dichlorvos, and parathion-methyl on bone marrow cell chromosomes of rats in subchronic experiments in vivo. *Ecotoxicology & Environmental Safety.* 1994; 29(3):365–371.
411. Newberry EA, Babu B, Roberts PD, et al. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon and Squash in Florida. *Plant Disease.* 2018;102(3):511–518.
412. Newberry EA, Ritchie L, Babu B, et al. Epidemiology and management of bacterial leaf spot on watermelon caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease.* 2017;101(7):1222–1229.
413. Newman M-A, Dow JM, Daniels MJ. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions. *European Journal of Plant Pathology.* 2001; 107:95–102.
414. Newman M-A, Dow JM, Molinaro A, Parrilli M. Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res.* 2007; 13:68–79.
415. Newman MA, von Roepenack E, Daniels MJ, Dow JM. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol.* 2000; 1:25–31.

416. Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in Microbiology*. 2010; 18(8):365–373.

417. Newton AC, Gravouil C, Fountaine JM. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*. 2010; 157(3):343–359.

418. Ngazee E., Icishahayo D., Coutinho T.A., Van der Waals J.E. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Dis*. 2012; 96:186–192.

419. Ni Z, Li S, Liu Y, Tang Y, Pang D. Induction of micronucleus by organophosphorus pesticides both in vivo and in vitro. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1993; 24:82–86.

420. Nielsen LN, Roager HM, Casas ME, Frandsen HL, Gosewinkel U, Bester K, et al. Glyphosate has limited short-term effects on commensal bacterial community composition in the gut environment due to sufficient aromatic amino acid levels. *Environ Pollut*. 2018; 233:364–376.

421. Nischwitz C, Gitaitis R, Sanders H, Langston D, Mullinix B, Torrance R, Boyhan G, Zolobowska L. Use of fatty acid methyl ester profiles to compare copper-tolerant and copper-sensitive strains of *Pantoea ananatis*. *Phytopathology*. 2007; 97(10):1298–1304.

422. Nomura K, Melotto M, He S-Y. Suppression of host defense in compatible plant–*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005; 8:361–368.

423. Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006; 313:848–851.

424. O'Brien HE, Thakur S, Guttman DS. Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annu Rev Phytopathol*. 2011; 49:269–89.

425. Oguri A, Karakama K, Arakawa N, Sugimura T, Wakabayashi K, Detection of mutagenicity of diphenyl ether herbicides in *Salmonella typhimurium* YG1026 and YG1021. *Mutation Research Letters*. 1995; 346(1):57–60.
426. Okonko LE, Ikpeme EV, Udensi OU. Genotoxic Effect of Chlorpyrifos and Cypermethrin in Albino Rats. *Research Journal of Mutagenesis*, 2016; 6:31–35.
427. Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(11):197.
428. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:1661–1669.
429. Ono T, Norimatsu M, Yoshimura H. Induction of chromosome aberrations by pyrimethamine in cultured Chinese hamster (CHL) cells. *Mutat Res*. 1994; 323(4):197–201.
430. Otta JD, English H. Serology and pathology *Pseudomonas syringae* Phytopatology. 1971; 61(5):443–452.
431. Otta JD. Occurrence and characteristics of isolates of *Pseudomonas syringae* on winter wheat. *Phytopathology*. 1977; 67(1):22–26.
432. Otta JD. *Pseudomonas syringae* incites a leaf necrosis on spring and winter wheats in South Dakota. *Plant Dis. Rep*. 1974; 58:1061–1064.
433. Ovod V, Ashorn P, Yakovleva L, Krohn K. Classification of *Pseudomonas syringae* with monoclonal antibodies against the core and O-side chains of the lipopolysaccharide. *Phytopathol*. 1995; 85:226–232.
434. 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.
435. Owen RJ, Jackman PJ. The similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxyribonucleic acids and electrophoretic protein patterns. *J Gen Microbiol*. 1982; 128(12):2945–2954.
436. Rachedi K, Zermane F, Tir R, Ayache F, Duran R, et al. Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil *Actinobacteria* growth and

characterization of resistant strains. *Brazilian Journal of Microbiology, Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 2018; 49 (1):79–86.

437. Özkan O, Üstüner O. Investigations about genotoxicity of deltamethrin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012; 18(1):69–74.

438. Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol*. 1973; 23(4):333–9.

439. Parsonnet J, Gary MD, Friedman D, Vandersteen DP, Yuan Chang MD, Joseph H, et al. *Helicobacter pylori* Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. *N Engl J Med*. 1991; 325:1127–1131.

440. Parsonnet J. Bacterial infection as a cause of cancer. *Environmental Health Perspectives*. 1995; 103(Suppl 8):263–268.

441. 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.

442. Patyka V, Buletsa N, Pasichnyk L, Zhitkevich N, Kalinichenko A, Gnatiuk T, Butsenko L. Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. *Ecol. Chem. Eng. S*. 2016; 23(2):311–31.

443. Patyka VP. Phytopathogenic bacteria in contemporary agriculture. *Мікробіол журн*. 2016; 78(6):71–83.

444. Patyka VP, Butsenko LM, Pasichnyk LA. Application of commercial test-systems to identify gram-negative facultatively anaerobic bacteria. *Agricultural science and practice*. 2016; 1:43–48.

445. Patyka VP, Pasichnyk LA, Butsenko LM, Petrychenko VF, Zubachov SR, Dankevych LA, Gnatiuk TT, Huliaieva HB, Tokovenko IP, Kalinichenko AV, Suszanowich D, Kurash P, Patyka TI, Karpenko VP, Kirilenko LV, Demchenko AA. Express diagnostics of phytopathogenic bacteria and phytoplasmas in agrophytocenosis. Monograph. Opole (Poland): Publisher Wydawnictwo I Drukarnia Świętego Krzyża; 2019. 78 p.

446. Pawlik M, Piotrowska-Seget Z. Endophytic bacteria associated with *hieracium piloselloides*: potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion. *J Toxicol Environ Health A*. 2015; 78(13-14):860-70.
447. Peix A, Ramírez-Bahena M-H, Velázquez E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018; 57:106–116.
448. Perazzolli M, Antonielli L, Storari M, Puopolo G, Pancher M, Giovannini O, et al. Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 80(12):3585–3596.
449. Petnicki-Ocwieja T, van Dijk K, Alfano JR. The *hrpK* operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HopK, a putative type III translocator. *J Bacteriol*. 2005; 187(2):649–663.
450. Pfeilmeier S, Caly DL, Malone JG. Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol Plant Pathol*. 2016;17(8):1298–313.
451. Quest JA, Fenner-Crisp PA, Burnam W, Copley M, Dearfield KL, Hamernik KL, et al. Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. 4. Chloroalkylthiodicarboximide compounds with fungicidal activity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1993; 17(1):19–34.
452. R Core Team (2018). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
453. Rademaker JL, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 50(2):665–677.
454. Rakkestad KE, Skaar I, Ansteinsson VE, Solhaug A, Holme JA, et al. DNA damage and DNA damage responses in THP-1 monocytes after exposure to

spores of either *Stachybotrys chartarum* or *Aspergillus versicolor* or to T-2 toxin. *Toxicol Sci.* 2010; 115:140–155.

455. Ranf S, Gisch N, Schäffer M, Illig T, Westphal L, Knirel YA, et al. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Immunol.* 2015; 16:426–433.

456. Rangasamy K, Athiappan M, Devarajan N, Parray JA. Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides. *Microbial Pathogenesis.* 2017; 105:153-165.

457. Rank J, Nielsen MH. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas.* 1993; 118:49–53.

458. Renders N, Romling U, Verbrugh H, Van Belkum A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:3190–3195.

459. Rhee C, Park H. Three glycoproteins with antimutagenic activity identified in *Lactobacillus plantarum* KLAB21. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(8):3445–3449.

460. Rico A, McCraw SL, Preston GM. The metabolic interface between *Pseudomonas syringae* and plant cells. *Current Opinion in Microbiology.* 2011; 14(1):31–38.

461. 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.

462. Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *PNAS.* 1999; 96(16):9368–9373.

463. Saleem U, Ejaz S, Ashraf M, Omer MO, Altaf I, Batool Z, et al. Mutagenic and cytotoxic potential of Endosulfan and Lambda-cyhalothrin. In vitro study describing individual and combined effects of pesticides. *J Environmental Sciences.* 2014; 26(7):1471–1479.

464. Salem MSZ. Pathogenetics. An introductory review. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2016; 17:1–23.
465. Salmeron JM, Staskawicz BJ. Molecular characterization and *hrp* dependence of the avirulence gene *avrPro* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Mol Gen Genet. 1993; 239:6–16.
466. Sarri AM, Bently KS, Fu LJ. Evaluation of benomyl and carbendazim in the in vivo. Mutat Res. 1994; 310:143–149.
467. Saunier M, Maladrin L, Samson R. Distribution of *Pseudomonas syringae* pathovars into twenty-three O serogroups. Applied Environmental Microbiology. 1996; 62 (7):2360–2374.
468. Sawada H, Takeuchi T, Matsuda I. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. Appl Environ Microbiol. 1997; 63:282–288.
469. Sazakli E, Leotsinidis M, Vantarakis A, Papapetropoulou M. Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis. J Appl Microbiol. 2005; 99:1191–1203.
470. Scandalios J. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiol. 1993; 101:7–13.
471. Schechter LM, Roberts KA, Jamir Y, Alfano JR, Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. J Bacteriol. 2004; 186(2):543–555.
472. Seaton SC, Silby MW, Levy SB. Pleiotropic effects of GacA on *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 in vitro and in soil. Appl Environ Microbiol. 2013; 79(17): 5405–5410.
473. Sewerynek E, Ortiz GG, Reiter RJ, Pablos MI, Melchiorri D, Daniels WM. Lipopolysaccharide-induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin. Mol Cell Endocrinol. 1996; 117(2):183–8.

474. Shaban NS, Abdou KA, Hassan NY. Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal products. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2016; 5(1):102–106.
475. Shah JM, Ramakrishnan AM, Singh AK, Ramachandran S, Unniyampurath U, Jayshankar A, et al. Suppression of different classes of somatic mutations in *Arabidopsis* by vir gene-expressing *Agrobacterium* strains. *BMC Plant Biol*. 2015; 15:210.
476. Shane WW, Baumer JS. Population dynamic of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on spring wheat. *Phytopathology*. 1987; 77:1399–1405.
477. Shapiro NI, Marshak MI, Varshaver NB. Mutagenic effects of DNA-containing oncogenic viruses and malignant transformation of mammalian cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1984; 13(2):167–179.
478. Sharma S, Sharma S, Vig AP. Antigenotoxic potential of plant leaf extracts of *Parkinsonia aculeata* L. using *Allium cepa* assay. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018; 130:314–323.
479. Simon-Sylvestre G, Fournier J-C. Effects of Pesticides on The Soil Microflora. *Advances in Agronomy*. 1980; 31:1–92.
480. Singh BK, Walker A, Morgan JAW, Wright DJ. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70(8):4855–4863.
481. Singh JA, Singh K, Vig AP. Genotoxicity monitoring of industrial wastes using plant bioassays and management through vermitechnology: A review, *Agriculture and Natural Resources*. 2017; 51(5):325–337.
482. Smith AG. Chapter 93 - Toxicology of DDT and Some Analogues. Editor(s): Robert Krieger, *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*. Academic Press; 2010. p. 1975–2032.
483. Song J, Bent AF. Microbial pathogens trigger host DNA double-strand breaks whose abundance is reduced by plant defense responses. *PLoS Pathog*. 2014; 10(4):e1004030.

484. Southwell RJ, Brown JF, Welsby SM. Microbial Interactions on the Phylloplane of Wheat and Barley after Applications of Mancozeb and Triadimefon. *Australasian Plant Pathology*. 1999; 28(2):139.
485. Sprague GF, McKinney HH, Greeley L. Virus as a mutagenic agent in maize. *Science*. 1963;141(3585):1052–3.
486. Sreekumar O, Hosono A. The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. *Can J Microbiol*. 1998; 44(11):1029–1036.
487. Stead DE, Hennessy J, Elphinstone JG, Wilson JK. Modern methods for classification of plant pathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae*. *Developments Plant Pathology*. 1998; 9:427–434.
488. Stead DE, Sellwood JE, Wilson J. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol*. 1992; 72:315–321.
489. Stead DE. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int J Syst Bacteriol*. 1992; 42(2):281–295.
490. Stenersen J. Chemical pesticides: mode of action and toxicology. CRC Press LLC; 2004. 296 p.
491. Strange RN, Scott PR. Plant disease: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol*. 2005; 43: 83–116.
492. Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide Oxidative Damage of Mitochondrial DNA. *American J Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003; 167:570–579.
493. Sułowicz S, Cycoń M, Piotrowska-Seget Z. Non-target impact of fungicide tetraconazole on microbial communities in soils with different agricultural management. *Ecotoxicology*. 2016; 25(6):1047–60.
494. Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan X, Zeng Q, Yang CH. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol Plant Pathol*. 2016; 17(9):1506–1518.

495. Taghavi SM, Keshavarz K. Identification of the causal agent of bacterial wheat blight in Fars and Kohgiluyeh & Boyer-Ahmad provinces and the reaction of certain wheat cultivars to them. *J Sci Tech Agr Nat Res*. 2003; 6:171–180.
496. Taranto F, Pasqualone A, Mangini G, Tripodi P, Miazzi MM, Pavan S, Montemurro C. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):377.
497. Tareb R, Bernardeau M, Horvath P, Vernoux JP. Rough and smooth morphotypes isolated from *Lactobacillus farciminis* CNCM I-3699 are two closely-related variants. *Int. J. Food Microbiol*. 2015; 193(16):82–90.
498. Tarkowski P, Vereecke D. Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*. 2014; 32:215–229.
499. Toben H, Mavridis A, Rudolph KWE. Basal glume rot (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*) on wheat and barley in FRG and resistance screening of wheat. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 1989; 19:119–125.
500. Todorova S, Kozhuharova L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010; 26:1207–1216.
501. Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, Hartung ML, Hottiger MO, Stucki M, Kalali B, Gerhard M, Sartori AA, Lopes M, Müller A. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:14944–14949.
502. Touati E. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from *H. pylori*. *Mutat Res*. 2010; 703(1):66–70.
503. Tripathi D. Bacterial pathogens in plants. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2017; 4(2):38–39.
504. Trouvelot S, Héloir MC, Poinssot B, Gauthier A, Paris F, Guillier C, et al. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front Plant Sci*. 2014; 5:592.

505. Tsuda H, Hara K, Miyamoto T. Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *J Dairy Sci.* 2008; 91(8):2960–2966.
506. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochemistry.* 1978; 86(1):271–278.
507. Ueda A, Saneoka H. Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated *Pseudomonas* species. *Curr. Microbiol.* 2015; 70(4):506–513.
508. Upper CD, Hirano SS, Dodd KK, Clayton MK. Factors that affect spread of *Pseudomonas syringae* in the phyllosphere. *Phytopathology.* 2003; 93:1082–1092.
509. Urooj F, Senthil-Kumar M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science.* 2015; 6:750.
510. Vaara M. Antibiotic-supresusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(11):2255–2260.
511. Vacher C, Hampe A, Porté AJ, Sauer U, Compant S, Morris CE. The phyllosphere: microbial jungle at the plant-climate interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* 2016; 47(1):32238.
512. Valencia-Botín AJ, Cisneros-López ME. A Review of the Studies and Interactions of *Pseudomonas syringae* Pathovars on Wheat. *International Journal of Agronomy.* 2012; Article ID 692350, 5 p.
513. Van Breusegem F, Vranova E, Dat JF, Inze D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science.* 2001; 161:405–414.
514. Van den Broek D, Bloemberg GV, Lugtenberg B. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ Microbiol.* 2005; 7(11): 1686–97.
515. Vancanneyt M, Torck U, Dewettinck D, Vaerewijck M, Kersters K. Grouping of *Pseudomonads* by SDS-PAGE of Whole-cell Proteins. *Systematic and Applied Microbiology.* 1996; 19(4):556–568.
516. Varanova E, Inze D, Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot.* 2002; 53:1227–1236.

517. Vasebi Y, Khakvar R, Faghihi MM, Vinatzer BA. Genomic and pathogenic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from apricot in East Azerbaijan province Iran. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019; 19:101167.
518. Vasilev VI, Schnaider YJ, Ilyuhina MK. Virulent properties of the phytopathogenic bacteria from the genus *Pseudomonas* Migula causing cereal crop bacteriosis. *Genetika i selektsiya*. 1988; 21:308–313.
519. Vassilev V, Kolev K, Zaharieva M, Sevov V. Resistance of Aegilops, maize and wheat genotypes to *Pseudomonas syringae* pathovars *atrofaciens* and *syringae*. *Agronomie, EDP Sciences*. 1995; 15(1):25–29.
520. Vassilev V, Lavermicocca P, Di Giorgio D, Iacobellis NS. Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Plant Pathology*. 1996; 45:316–322.
521. Vassilev VI, Karov S. Effect of cereal basal bacteriosis on the economic physico-technological and biochemical properties of wheat grain and flour. *Plant Science*. 1985; 22(5):13–20 (in Bulgarian).
522. Vauterin L, Yang P, Swings J. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of the *Xanthomonas* species. *Int J Syst Bacteriol*. 1995; 46(1):298–304.
523. Vera Cruz CM, Gossele F, Kersters K, Segers P, Van den Mooter M, Swings J, et al. Differentiation between *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* and the bacterial “brown blotch” pathogen on rice by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams. *J Gen Microbiol*. 1984; 130(11):2983–2999.
524. Vettorazzi A, de Cerain AL. Chapter 17 - Mycotoxins as Food Carcinogens. Editor(s): Carla Viegas, Ana Catarina Pinheiro, Raquel Sabino, Susana Viegas, João Brandão, Cristina Veríssimo. *Environmental Mycology in Public Health: Academic Press*; 2016. p. 261–298,

525. Viljoen A, Herrmann J-L, Onajole OK, Stec J, Kozikowski AP, Kremer L. Controlling Extra- and Intramacrophagic *Mycobacterium abscessus* by Targeting Mycolic Acid Transport. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:388.
526. von der Weid I, Alviano DS, Santos AL, Soares RM, Alviano CS, Seldin L. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J Appl Microbiol.* 2003;95(5):1143–1151.
527. Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology.* 2012; 10(12):828–840.
528. Vorobjeva L. Antimutagenic properties of bacteria. Review. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2002; 38:97–107.
529. Wallace ME, Knights P, Dye AO. Pilot study of the mutagenicity of DDT in mice. *Environmental Pollution.* 1976; 11(3):217–222.
530. Wang H, Jiang X, Mu H, Liang X, Guan H. Structure and protective effect of exopolysaccharide from *P. agglomerans* strain KFS-9 against UV radiation. *Microbiol Res.* 2007; 162:124–129.
531. Wang Y, Garrido-Oter R, Wu J, et al. Site-specific cleavage of bacterial MucD by secreted proteases mediates antibacterial resistance in *Arabidopsis*. *Nat Commun.* 2019;10(1):2853.
532. Welch DF. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4(4):422–438.
533. Weller SA, Aspin A, Stead DE. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. *Bulletin EPPO.* 2000; 30(3-4):375–380.
534. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res.* 1990; 18(24):7213–7218.
535. Whatley MH, Bodwin JS, Lippincott BB, Lippincott JA. Role of *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. *Infect Immun.* 1976; 13(5):1080–1083.
536. Whipps JM, Hand P, Pink DAC, Bending GD. Human pathogens and the phyllosphere. *Advances in Applied Microbiology.* 2008; 64:183–221.

537. Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 2014; 83:99–128.
538. Wilkie JP. Basal glume rot of wheat in New Zealand. *N Z J Agric Res.* 1973; 16:155–160.
539. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(22):6531–6535.
540. Woolley DW, Pringle RB, Braun AC. Isolation of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*, an antagonist of methionine. *The Journal of Biological Chemistry.* 1952; 197:409–417.
541. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG, *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet.* 1991; 338(8776):1175–1176.
542. Xin XF, Kvitko B, He SY. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology.* 2018; 16:316–328.
543. Yamada H, Arai T, Endo N, Yamashita K, Fukuda K, Sasada M, et al. LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sciences.* 2006; 78:926–933.
544. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, et al. Septic Shock Is Associated with Receptor for Advanced Glycation End Products Ligation of LPS. *The Journal of Immunology.* 2011; 186(5):3248-3257.
545. Yang C-H, Crowley DE, Borneman J, Keen NT. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(7):3889–3894.
546. Young J.M. Taxonomy of *Pseudomonas syringae* *Journal of Plant Pathology.* 2010; 92 (1, Supplement): S1.5-S1.14.

547. Young JM, Jones DS, Gillings M. Relationships between populations of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* determined by restriction fragment analysis. *Plant pathology*. 1996; 45:350–57.
548. Young JM, Saddler GS, Takikawa Y, De Boer SH, Vauterin L, Gardan L, et al. Names of plant pathogenic bacteria 1864 – 1995. *Review of Plant Pathology*. 1996; 75(9):122–231.
549. Yu J, Peñaloza-Vázquez A, Chakrabarty AM, Bender CL. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol*. 1999; 33(4):712–20.
550. Yuan J, He SY. The *Pseudomonas syringae* Hrp regulation and secretion system controls the production and secretion of multiple extracellular proteins. *J Bacteriol*. 1996; 178(21):6399–6402.
551. Yue QA. Study on mutagenicity of toxoflavin from *Pseudomonas farinofementans*. *Zhonghua Yu. Fang. Yi. Xue. Za. Zhi*. 1989; 23(2):77–79.
552. Zarnowski R, Eichel J, Lewicka T, Rózycki H, Pietr SJ. Protein fingerprinting as a complementary tool for the classification of *Pseudomonas* bacteria. *Cell Mol Biol Lett*. 2001; 6(4):913–23.
553. Zdrovenko EL, Vinogradov E, Zdrovenko GM, Lindner B, Bystrova OV, Shashkov AS, Rudolph K, Zähringer U, Knirel YA. Structure of the core oligosaccharides of a rough-type lipopolysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271(23-24):4968–4977.
554. Zdrovenko EL, Zatonsky GV, Zdrovenko GM, Pasichnyk LA, Shashkov AS, Knirel YA. Structural heterogeneity in the lipopolysaccharides of *Pseudomonas syringae* with O-polysaccharide chains having different repeating units. *Carbohydrate Research*. 2001; 336:329–336.
555. Zdrovenko GM, Knirel Yu, Gvozdyak RI, Yakovleva LM. Structural features and biological activities of the *Pseudomonas syringae* lipopolysaccharides. In: *Proceedings Intern. regional seminar Environment protection: modern studies in ecology and microbiology: May 13–16, 1997: Ukraine, Uzhgorod: Uzhgorod, 1997. 2. p.187–191.*

556. Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2004; 101(44):15811–15816.
557. Zhang B, Bai Z, Hoefel D, Tang L, Wang X, Li B, et al. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Sci Total Environ*. 2009; 407:1915–1922.
558. Zhang H, Hong Y, Huang L, Li D, Song F. *Arabidopsis* AtERF014 acts as a dual regulator that differentially modulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Botrytis cinerea*. *Sci Rep*. 2016;6:30251.
559. Zhang J, Markus J, Bies J, Paul T, Wolff L. Three murine leukemia virus integration regions within 100 kilobases upstream of *c-myb* are proximal to the 5 regulatory region of the gene through DNA looping. *Journal of Virology*. 2012; 86:10524–10532.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ
ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ

(* – особистий внесок здобувача, ** - прізвище Ващенко змінено на Буценко)

Монографії

1. Патица ВП, Пасічник ЛА, Гвоздяк РІ, Петриченко ВФ, Корнійчук ОВ, Буценко ЛМ, Житкевич НВ, Данкевич ЛА, Литвинчук ОА, Кириленко ЛВ, Мороз СМ, Гуляєва ГБ, Гнатюк ТТ, Калініченко АВ, Хархота МА. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. Монографія. Том. 2. За ред. В.П. Патики. Вінниця: «Віндрук», 2017. 432 с. (* – *опрацьовано та проаналізовано наукову літературу та результати власних експериментальних досліджень, описано методики дослідження мутагенних властивостей метаболітів фітопатогенних бактерій, ПЛР із довільними праймерами та електрофорезу білків фітопатогенних бактерій, підготовлено до друку відповідні розділи*).
2. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Гуляєва ГБ, Токовенко ІП, Курченко ІМ, Сирчін СО, Юр'єва ОМ, Снігур ГО, Шевченко ОВ, Будзанівська ІГ, Кириленко ЛВ, Сушанович Д, Калініченко АВ, Демченко ОА, Патица ВП. Хвороби пшениці. За ред. Л.А. Пасічник. Монографія. Вінниця: «Віндрук», 2019. 139 с. (* – *опрацьовано та проаналізовано наукову літературу та результати власних експериментальних досліджень, підготовлено до друку розділ «Бактеріальні хвороби пшениці»*).
3. Patyka VP, Pasichnyk LA, Butsenko LM, Petrychenko VF, Zubachov SR, Dankevych LA, Gnatiuk TT, Hulciaieva NB, Tokovenko IP, Kalinichenko AV, Suszanowich D, Kurash P, Patyka TI, Karpenko VP, Kirilenko LV, Demchenko AA. Express diagnostics of phytopathogenic bacteria and phytoplasmas in agrophytocenosis. Monograph. Opole (Poland): Publisher Wydawnictwo I Drukarnia Świętego Krzyża; 2019. 78 p. (* – *опрацьовано та проаналізовано наукову літературу та результати власних експериментальних досліджень, описано методику штучної інокуляції пшениці*).

фітопатогенними бактеріями та розроблено шкалу обліку штучного зараження, описані методики ідентифікації збудника базального бактеріозу за фізіолого-біохімічними ознаками, обґрунтовано використання тест-систем *api*, *micro-la-test* для прискорення ідентифікації збудника, підготовлено до друку відповідні розділи).

Статті у фахових виданнях

4. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гуляєва ГБ, Патица ВП. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фотосинтетичний апарат пшениці. Вісник аграрної науки. 2019; 11: 48–54. (* – запропоновано ідею дослідження, отримано і охарактеризовано ЛПС та клітини *P. syringae* pv. *atrofaciens* для здійснення досліджень, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
5. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ. Сучасні методи контролю збудників бактеріальних хвороб зернових і овочевих культур виду *Pseudomonas syringae*. Захист і карантин рослин. 2019; 9-10: 1–5. DOI: <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2019.9-10.1-5> (* – запропоновано ідею дослідження, вивчено вплив мікробіологічних препаратів на збудників бактеріальних хвороб зернових культур, визначено стійкість сортів пшениці до збудника базального бактеріозу за штучної інокуляції, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
6. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ. Генотоксична дія ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* у *Allium cepa*-тесті. Біологічні системи: теорія та інновації. 2019; 10(3): 44–54. (* – запропоновано ідею дослідження, отримано ЛПС та визначено їхні характеристики, здійснено дослідження ЛПС штамів 9780 та УКМ В-1011 у *Allium cepa*-тесті, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
7. Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ. Клітинна селекція калюсних культур *Triticum aestivum* L. на стійкість до збудника

- базального бактеріозу. Наукові доповіді НУБіП України. 2019; 4(80): DOI: <https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.04.002>. Режим доступу: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/issue/view/511>. (* – запропоновано ідею дослідження, отримано біомасу *P. syringae* рв. *atrofaciens* для здійснення дослідження, вивчено вплив бактерій на калюсні клітини сортів пшениці, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
8. Буценко ЛМ. Геномодулювальна активність *Pseudomonas syringae* рв. *syringae* і *P. syringae* рв. *atrofaciens*. Біоресурси і природокористування. 2019; 11(3-4): 31–40. DOI: <http://dx.doi.org/10.31548/bio2019.03.003>
9. Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ. Вплив фітопатогенних бактерій та їхніх ліпополісахаридів на калюсні клітини пшениці. Біологічні системи: теорія та інновації. 2019; 10(2): 17–24. DOI: <http://dx.doi.org/10.31548/biologiya2019.02.017> (* – отримано ЛПС та бактеріальні клітини для здійснення дослідження, визначено морфологічні показники калюсів, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
10. Kolomiets YV, Grygoryuk IP, Butsenko LM, Kalinichenko AV. Biotechnological control methods against phytopathogenic bacteria in tomatoes. Applied ecology and environmental research. 2019; 17(2):3215–3230. DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1702_32153230 (Indexed in Scopus) (* – отримано дані щодо впливу пестицидів на колекційні штами *Pseudomonas syringae*, підготовлено статтю до друку)
11. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА. Генетична гетерогенність штамів *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens* на основі RAPD-ПЛР аналізу. Мікробіол журн. 2018; 80(5): 48–62. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.05.048> (* – запропоновано ідею дослідження, проведено експерименти, здійснено аналіз RAPD профілів *P. syringae*, підготовлено статтю до друку)
12. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ. Серологічні особливості бактерій *Pseudomonas syringae* агроєкосистем зернових культур. Мікробіол журн. 2018; 80(4): 41–

54. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.041> (* – отримано експериментальні дані, здійснено аналіз серологічної приналежності штамів збудника базального бактеріозу та підготовлено статтю до друку)
13. Пастошук АЮ, Сківка ЛМ, Буценко ЛМ, Патица ВП. Вплив збудника базального бактеріозу на пшеницю різних сортів. Мікробіологія і біотехнологія. 2018; 2: 39–48. DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134449](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134449) (* – запропоновано ідею дослідження, відібрано і охарактеризовано для дослідження штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, отримано біомасу бактерій)
14. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Савенко ОА, Патица ВП. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів *Pseudomonas syringae*, ізольованих з агрофітоценозу зернових культур. Мікробіол журн. 2017; 79(3): 56–64. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.03.056> (* – визначено склад жирних кислот штамів патоварів *P. syringae*, проаналізовано отримані дані та підготовлено статтю до друку)
15. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Булеца НМ, Патица ВП. Вплив інсектициду Альфа супер на фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* агрофітоценозу пшениці. Вісник аграрної науки. 2017; 3: 18–22. DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201703-03> (* – вивчено властивості індукованих інсектицидом R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані і підготовлено статтю до друку)
16. Palyka V, Buletsa N, Pasichnyk L, Zhitkevich N, Kalinichenko A, Gnatiuk T, Butsenko L. Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. Ecol Chem Eng S. 2016; 23(2): 311–31. DOI: <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0022>. (Indexed in Scopus) (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено планування експериментів, вивчено вплив пестицидів на *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані)

17. Буценко ЛМ. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фізіолого-біохімічні процеси у клітинах *Allium cepa*. Мікробіол журн. 2016; 78(5): 65–74. (Indexed in Scopus)
18. Булеца НМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Патика ВП. Фізіологія росту *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* за впливу пестицидів. Мікробіол журн. 2016; 78(3): 52–60. (Indexed in Scopus) (* – запропоновано ідею дослідження, вивчено вплив пестицидів на морфологічну дисоціацію колоній *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані та підготовлено статтю до друку)
19. Патика ВП, Гуляєва ГБ, Буценко ЛМ, Щербина ТМ, Осипенко БО, Пасічник ЛА. Антиоксидантна і фотохімічна активність фотосинтетичного апарату пшениці ярої за дії *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Вісник аграрної науки. 2016; 1: 27–31. DOI:<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201601-05> (* – запропоновано ідею дослідження, підготовлено штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, здійснено штучне зараження рослин пшениці та визначено каталазну і пероксидазну активність, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
20. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів. Вісник аграрної науки. 2015; 9: 31–35. (* – розроблено методуку проведення експериментів, вивчено вплив пестицидів на штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані, підготовлено статтю до друку)
21. Булеца НМ, Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Патика ВП. Чутливість фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів. Мікробіол журн. 2015; 77(6): 62–69. (Indexed in Scopus) (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено планування експериментів, вивчено вплив пестицидів на *P. syringae* pv. *atrofaciens*, проаналізовано отримані дані, підготовлено статтю до друку)

- 22.Петриченко ВФ, Корнійчук ОВ, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Житкевич НВ, Гнатюк ТТ, Патица ВП. Бактеріальні хвороби сільськогосподарських рослин і пестициди. Вісник аграрної науки. 2013; 4: 21–26. (* – вивчено антибактеріальну дію пестицидів на *P. syringae* pv. *atrofaciens*, здійснено аналіз експериментальних даних і підготовлено статтю до друку)
- 23.Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва Ю. Антибактеріальна та мутагенна дія деяких фунгіцидів на *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Агроєкологічний журнал. 2010; 4: 71–79. (* – отримано експериментальні дані щодо мутагенної дії пестицидів, здійснено аналіз експериментальних даних та підготовлено статтю до друку)
- 24.Гвоздяк РІ, Пасічник ЛА, Ващенко** ЛМ, Покиньброда ТЯ, Карпенко ОВ. Синтез сурфактантів штамами *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Мікробіол. журн. 2009; 71(3): 10–14. (Indexed in Scopus) (* – підібрано та охарактеризовано штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* для здійснення дослідження, проаналізовано експериментальні дані)
- 25.Буценко ЛМ. Генотулювальна активність культуральної рідини та ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2008; 22: 80–83.
- 26.Ващенко** ЛМ, Коломієць ЮВ, Гвоздяк РІ. Антимутагенна дія ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* та *Pseudomonas wieringae*. Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. 2007; 20: 226–229. (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено вивчення антимутагенної активності ЛПС у тесті Еймса, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)

Статті в інших виданнях

- 27.Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ, Дуб'янська СА. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в агрофітоценозі пшениці. Миронівський вісник. 2019; 8: 91–107. (* – запропоновано ідею дослідження, проведено

- експерименти, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
28. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА. Фітопатогенні бактерії в агрофітоценозах України. Пропозиція. 2018; 11: 116–119. (* – здійснено аналіз поширення фітопатогенних бактерій в агрофітоценозах України, підготовлено статтю до друку)
29. Butsenko L, Pasichuk L. Opportunistic bacteria in agroecosystems of Ukraine. Internat. J. of Med. and Med. Res. 2018; 4(1): 78–82. (* – запропоновано ідею дослідження, проведено серологічні дослідження, проаналізовано експериментальні дані та підготовлено статтю до друку)
30. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Булеца НМ, Пати́ка ВП. Протипухлинна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* PDDCC 4394 в рослинній і тваринній тест-системах. В: Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку; гол. ред. В.В. Моргун. К.: Логос; 2017: с. 61–68. (* – здійснено планування експериментів, вивчено протипухлинну дію ЛПС у рослинній тест-системі, проаналізовано дані, підготовлено статтю до друку)
31. Пати́ка ВР, Butsenko LM, Pasichnyk LA. Application of commercial test-systems to identify gram-negative facultatively anaerobic bacteria. Agricultural science and practice. 2016; 1: 43 – 48. (Indexed in WoS) (* – запропоновано ідею дослідження, здійснено експерименти, проаналізовано дані, підготовлено статтю до друку)
32. Пасічник ЛА, Савенко ЕА, Буценко ЛН, Пати́ка ВФ, Калиниченко АВ. *Pseudomonas syringae* в агрофітоценозе пшениці. Наука и мир. 2014; 4(8): 52–56. (* – здійснено планування експериментів та визначено властивості і здійснено ідентифікацію виділених із пшениці бактерій *P. syringae* pv. *atropaciens*)
33. Пати́ка ВП, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ. Бактеріальні хвороби пшениці та рису. Таврійський вісник аграрної науки. 2013; (1): 51–56. (* –

проаналізовано поширення фітопатогенних бактерій в агрофітоценозах пшениці, підготовлено статтю до друку)

- 34.Патика ВП, Пасічник ЛА, Буценко ЛМ. Бактеріальні хвороби зернових культур та заходи боротьби з ними. Посібник українського хлібороба. К.: 2013; (1): 202–208. (* – запропоновано на основі експериментальних даних використання манкоцебу для контролю фітопатогенних бактерій в агрофітоценозах пшениці, підготовлено статтю до друку)
- 35.Буценко ЛН, Пасічник ЛА, Патика ВФ, Терещук ЕА. Фунгициди и бактериоз: идет борьба в лаборатории. Зерно. 2013; (1): 148–151. (* – проаналізовано можливості застосування пестицидів у контролі фітопатогенних бактерій, підготовлено статтю до друку)
- 36.Пасічник ЛА, Ходос СФ, Буценко ЛН, Патыка ВФ. Бактериальные болезни пшеницы. Зерно. 2011; (2): 72–81. (* – визначено роль фітопатогенних бактерій у формуванні урожаїв пшениці, підготовлено статтю до друку)
- 37.Коломієць ЮВ, Буценко ЛМ. Вплив бактеріального стресу на ізоферментний спектр пероксидази пшениці і цукрових буряків. Науковий вісник НУБіП України. 2009; 134(3): 56–64. (* – здійснено планування експериментів, визначено ізоферментний спектр пероксидази пшениці, проаналізовано отримані дані, підготовлено статтю до друку)
- 38.Ващенко** ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва Ю. Ефективність фунгіцидів для боротьби з бактеріозом зернових культур. Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення. 2009;13(53): 200–208. (* – здійснено планування експериментів, отримані і проаналізовані експериментальні дані, підготовлено статтю до друку)

Патенти

39. Пат. на корисну модель UA 1364416 U Експрес-діагностика збудника базального бактеріозу пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* / Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Патица ВП. Опубл. 27.08.2019. Бюл. № 16.
40. Пат. на корисну модель UA 139621 U Спосіб відбору стійких до збудника базального бактеріозу клітинних ліній пшениці / Буценко ЛМ, Коломієць ЮВ, Пасічник ЛА, Калініченко АВ, Патица ВП. Опубл. 10.01.2020. Бюл. № 1.

Підручник

41. Буценко ЛМ, Пирог ТП. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник. Київ: Ліра-К, 2018. 346 с.

Методичні рекомендації

42. Патица ВП, Пасічник ЛА, Данкевич ЛА, Мороз СМ, Буценко ЛМ, Житкевич НВ та ін. Діагностика фітопатогенних бактерій. Методичні рекомендації. За ред. В.П. Патики. Київ, 2014. 76 с.
43. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Калініченко АВ, Патица ВП. Діагностика і контроль збудників бактеріальних хвороб пшениці. Методичні рекомендації. К.: ФОП ЯМЧИНСЬКИЙ, 2019. 37 с.

Тези доповідей

44. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Богдан ЮМ, Хархота МА. Жирнокислотні профілі ізольованих із сегетальної рослинності агрофітоценозу пшениці штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. В: Збірник тез VII Міжнарод. наук.-практичн. онлайн конференції «Біотехнологія: звершення та надії»; 15 листопада 2019: Київ, Україна. Київ, 2019. с. 42–43. (форма участі – очна)
45. Буценко ЛМ, Дуб'янська СА. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9780 на мітотичний індекс у *Pisum sativum*. В: Матеріали наукової конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології»; 5 листопада 2019: Київ, Україна. Вінниця: Нова Книга, 2019. с. 34–35. (форма участі – очна)

46. Буценко ЛМ. Біотехнологічні препарати у контролі збудника базального бактеріозу пшениці. В: Програма та тези матеріалів VIII міжнарод. науково-технічна конф. «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції»; 5-6 листопада 2019: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2019. с. 62–64. (форма участі – очна)
47. Буценко ЛМ. Екологічні наслідки дії пестицидів на фітопатогенні бактерії. В: Збірник наукових праць VII-го Всеукраїнського з'їзду екологів з міжнародною участю; 25 – 27 вересня 2019: Вінниця, Україна. Вінниця, 2019. с. 120. (форма участі – заочна)
48. Буценко ЛМ. Активність пероксидази у проростках пшениці за дії *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. В: Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції «Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі»; 26 червня 2019: Умань, Україна. Умань, 2019. с. 8–9. (форма участі – заочна)
49. Дуб'янська С, Буценко Л. Індукція хромосомних аберацій у клітинах *Allium cepa* L. за дії ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9780. В: Матеріали 85 міжнарод. наук. конф. молод. учених, асп. і студ. «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»; 11–12 квітня 2019: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2019. Ч.1. с.496. (форма участі – очна)
50. Дуб'янська С, Буценко Л. Методи тестування на мутагенність чинників зовнішнього середовища. В: Матеріали II всеукраїнської науково-практичної інтернет конференції «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи»; 21 березня 2019: Кропивницький, Україна. Кропивницький, 2019. с. 220–221. (форма участі – очна)
51. Буценко Л, Дуб'янська С, Коломієць Ю. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на калюсні клітини пшениці. В: Матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет конференції

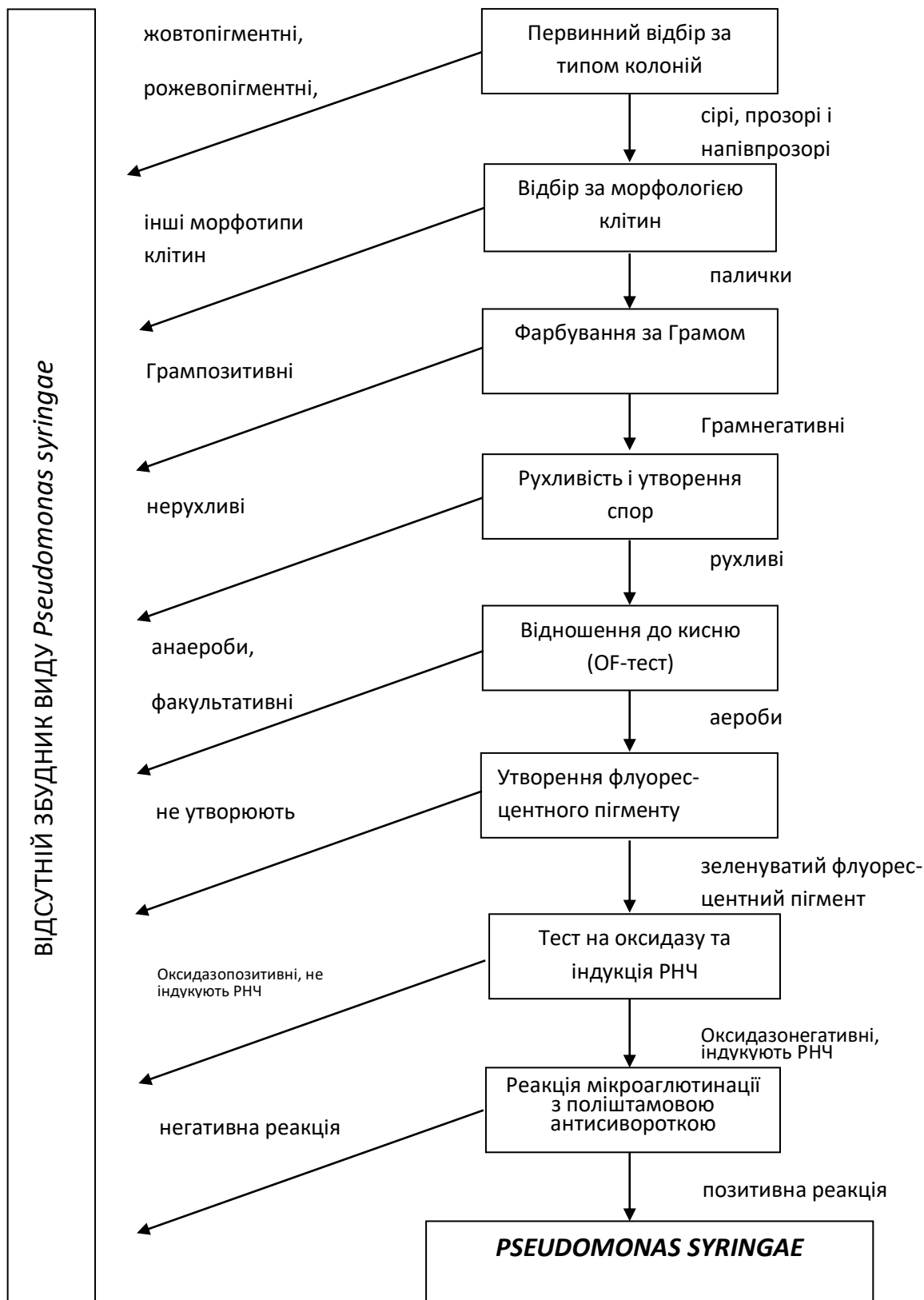
- «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»; 15 листопада 2018 р: Київ, Україна. Київ: НУХТ, 2018. с. 45. (форма участі – очна)
52. Дуб'янська С, Буценко Л. Характеристика ліпополісахаридів фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780. В: Матеріали 84 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті»; 23–24 квітня 2018: Київ, Україна. К.: НУХТ, 2018. Ч.1. с. 477. (форма участі – очна)
53. Кукол К, Буценко Л. Реакція бур'янів у посівах цукрових буряків на штучне зараження збудниками бактеріозів. В: Тези доп. XII Всеукр. наук.-практ. конфер. мол. наук. і студ. «Екологічна безпека держави»; 19 квітня, 2018: Київ, Україна. К.: НАУ, 2018. с. 169–170. (форма участі – очна)
54. Буценко ЛМ. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* – збудник базального бактеріозу пшениці. В: Матеріали Всеукраїнської наукової конференції «Інноваційні агротехнології»; 28 березня 2018; Умань, Україна. Уманський НУС: Редакційно-видавничий відділ, 2018. с. 40–42. (форма участі – заочна)
55. Butsenko L, Pasichnyk L, Patyka V. SDS-PAAG protein profiles of *Pseudomonas syringae* strains, isolated from segetal plants in wheat agrophytocenosis. В: Тези доповідей III-ї Міжнародної наукової конференції "Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в ХХІ столітті"; 19-20 квітня 2018; Київ, Україна. Київ, 2018. с. 30. (форма участі – очна)
56. Коломієць ЮВ, Буценко ЛМ. Можливості використання пестицидів для контролю збудників бактеріальних хвороб. В: Міжнародна науково-практична конференція "Пермакультура та екологічно безпечне землеробство"; 24 – 25 лютого 2018: Ужгород, Україна. Ужгород: Вид-во УжНУ «Говерла», 2018. с. 75–77. (форма участі – заочна)
57. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Гуляєва ГБ. Ліпополісахариди *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* та їх вплив на сільськогосподарські рослини. В:

- Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України; 11-15 вересня 2017: Одеса, Україна. Львів: СПОЛОМ; 2017. с. 123. (форма участі – очна)
58. Пасічник ЛА, Буценко ЛМ, Щербина ТМ. Бактеріози рослин і органічне землеробство. В: Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України; 11-15 вересня 2017: Одеса, Україна. Львів: СПОЛОМ; 2017. с. 81. (форма участі – очна)
59. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА. Морфологічна дисоціація фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* за дії пестицидів. В: Матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017»; 20-22 квітня 2017: Тернопіль, Україна. Тернопіль, 2017. с. 171–175. (форма участі – заочна)
60. Buletsa NM, Butsenko LM, Pasichnyk LA, Palyka VP. Dissociation of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* under the effects of pesticides. In: Abstract book II International scientific conference «Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century»; 14-15 april 2016: Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2016. p. 28–29. (форма участі – очна)
61. Буценко ЛМ, Булеца НМ, Пасічник ЛА, Патица ВП. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів. В: Збірник тез IVⁱ Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 21–22 травня 2015: Київ, Україна. Київ: ВЦ НУБіП України, 2015. с. 171–172. (форма участі – очна)
62. Butsenko L. Genotoxicity of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. In: Congress NEEFood – 2013; 26 – 29 may 2013: Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2013. p. 209. (форма участі – очна)
63. Буценко ЛМ, Терещук ОО. Протипухлинна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. В: Тез. доп. VII Всеукраїнської науково-практичної конф. «Біотехнологія XXI століття»; 24 квітня 2013: Київ, Україна. К.: НТУУ «КПІ», 2013. с. 21 – 22. (форма участі – очна)

64. Butsenko LM, Olishevsky SV. Biological activities of the *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011 lipopolysaccharide. В: Тези доповідей XIII з'їзду Товариства мікробіологів України; 1-6 жовтня 2013: Ялта, Україна. Ялта, 2013. с.60. (форма участі – заочна)
65. Терещук ОО, Буценко ЛМ. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* ICMP 4394 на пухлиноутворення спричинене *Agrobacterium tumefaciens*. В: Збірник матеріалів конференції daRostim 2012 "Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє"; 19–22 листопада 2012: Київ, Україна. Київ, 2012. с. 313–314. (форма участі – очна)
66. Патыка ВФ, Пасичник ЛА, Буценко ЛН. Бактериальные болезни зерновых культур. В: Материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений – проблемы и перспективы»; 30-31 октября 2012: Кишинев, Молдова. Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2012; 41: 18–21. (форма участі – заочна)
67. Буценко ЛН, Пасичник ЛА, Патыка ВФ. Использование коммерческих пестицидов для защиты от возбудителей бактериозов зерновых культур. В: Материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений – проблемы и перспективы»; 30-31 октября 2012: Кишинев, Молдова. Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2012; 41:357–360. (форма участі – заочна)
68. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасичник ЛА. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фізіологічний стан *Allium cepa* L. В: Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 9-13 серпня 2011; Березне, Україна; Київ, 2011. с. 163–164. (форма участі – заочна)
69. Богдан ЮМ, Буценко ЛМ, Пасичник ЛА, Дзяман ХЗ. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на хромосомні аберації у *Allium cepa* L. В: Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 21-25 вересня 2010: Ялта, Україна. Сімферополь, 2010. с. 177–178. (форма участі – заочна)

70. Буценко ЛМ, Пасічник ЛА, Коломієць ЮВ, Богдан ЮМ, Гвоздяк РІ. Використання RAPD-типування для вивчення гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу в Україні. В: Тези доповідей XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; 25-30 травня 2009: Ужгород, Україна. Ужгород: «Патент», 2009. с. 291. (форма участі – заочна)
71. Буценко ЛН, Гвоздяк РІ, Пасичник ЛА, Коломиец ЮВ, Парий МФ. Генетический полиморфизм *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* и *P. syringae* pv. *coronafaciens*. В: Материалы Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии»; 2–6 июня 2008: Минск, Белорусь. Минск, 2008. Т.1. с. 63– 65. (форма участі – очна)
72. Ващенко** ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва ІО. Використання комерційних пестицидів для боротьби із збудниками бактеріозів зернових культур. В: Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей»; 11–14 сентября 2007: Одесса, Украина. Одесса, 2007. С.62. (форма участі – заочна)
73. Ващенко** ЛМ, Пасічник ЛА, Ходос СФ, Карєва ІО. Вплив фунгіцидів на деяких збудників бактеріозів зернових культур. В: Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції «Сучасні методи захисту рослин від шкідливих організмів»; 2–5 жовтня 2006; Київ, Україна. Київ, 2006. с.32–33. (форма участі – очна)

ДОДАТОК Б

Блок-схема ідентифікації *Pseudomonas syringae*



Карта-схема виявлення *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на пшениці та житі в Україні

(за даними співробітників відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ).

■ області України, у яких було виявлено збудник

ДОДАТОК Г



А

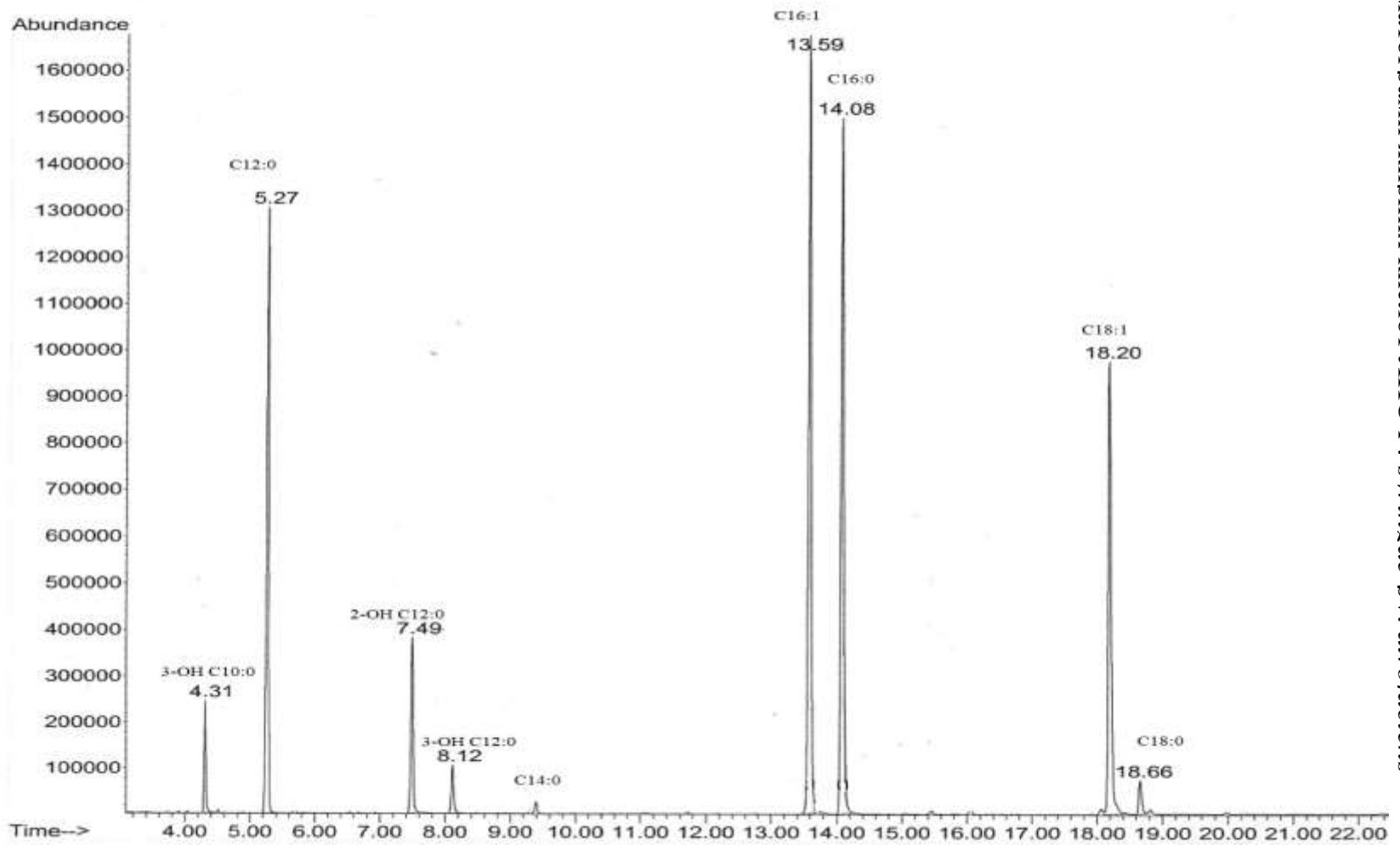


Б

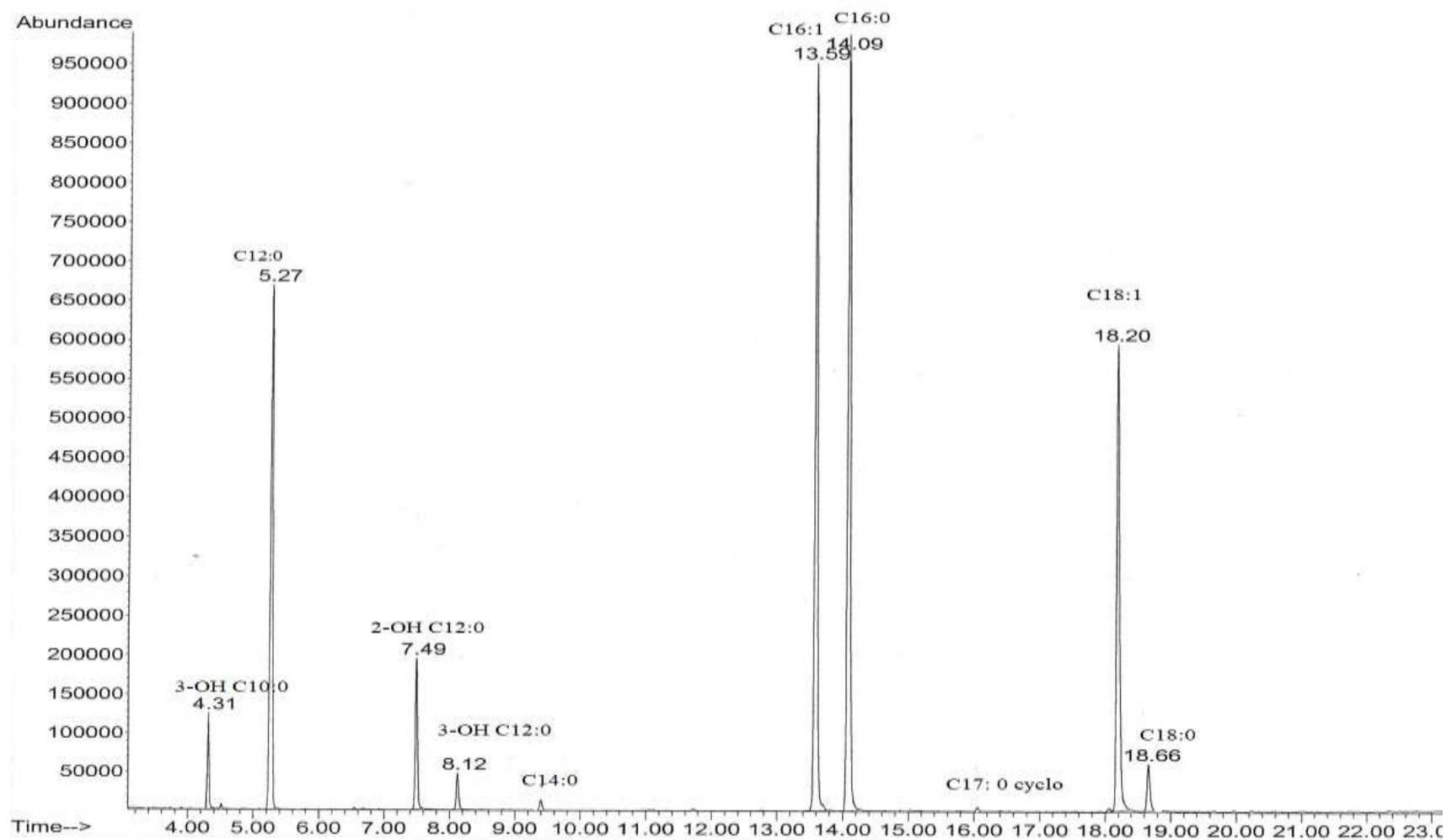


В

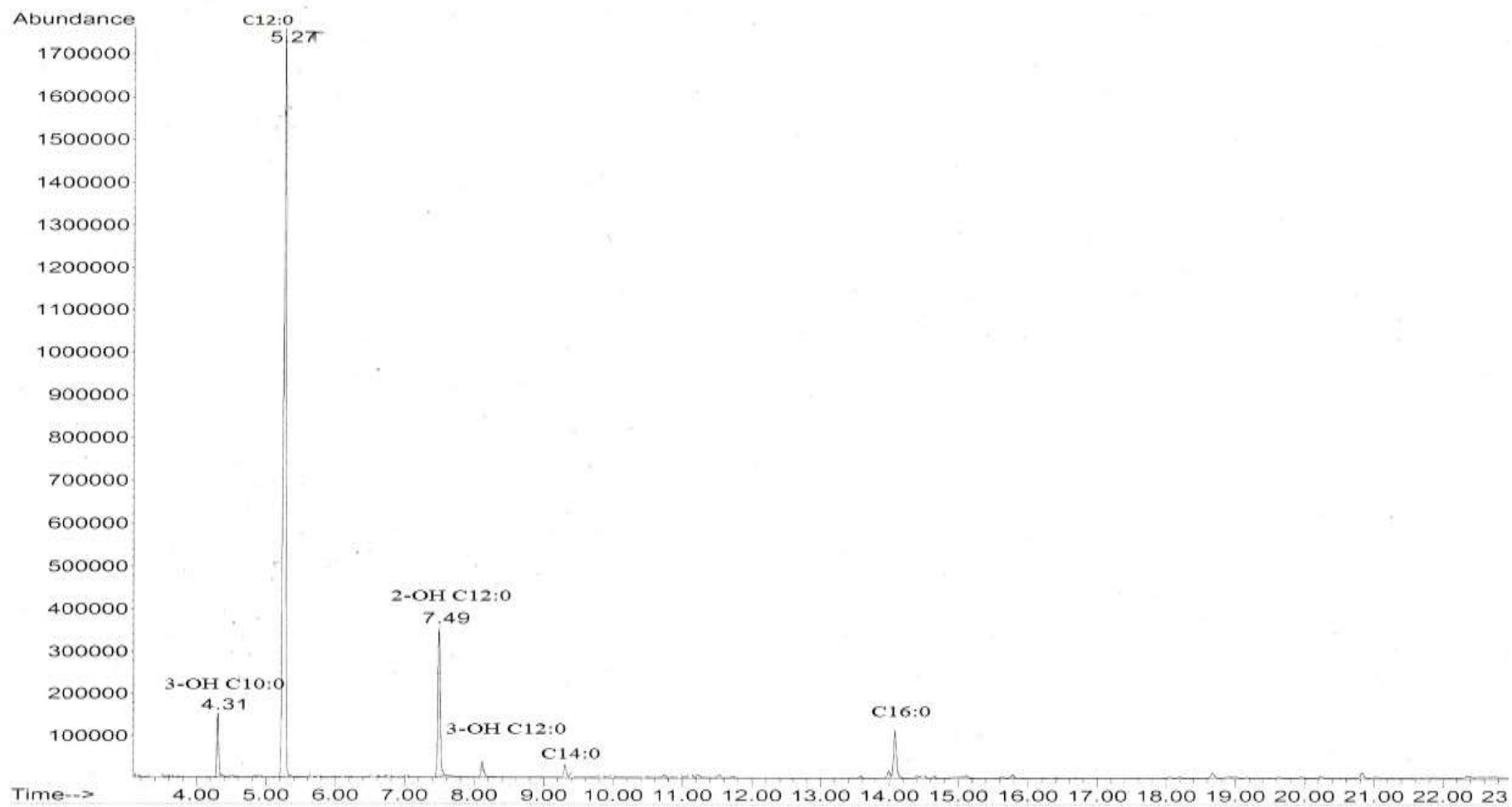
Симптоми ураження на бур'янах, що розвиваються за штучної інокуляції штамми *P. syringae* pv. *atofaciens*, які ізолювано із пшениці: А – симптоми на осоті польовому за інокуляції *P. syringae* pv. *atofaciens* 9837; Б - симптоми на хвощі польовому за інокуляції *P. syringae* pv. *atofaciens* 9780; В - симптоми на пирію повзучому за інокуляції *P. syringae* pv. *atofaciens* 9780.



Хроматограма жирних кислот ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011



Хроматограма жирних кислот ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027



Хроматограма жирних кислот ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, отриманого методом водно-фенольного екстрагування

ДОДАТОК Е

Патенти на корисні моделі





ДОДАТОК Ж

Акти впровадження результатів роботи в навчальниц процес

Міністерство освіти і науки України
Національний університет харчових технологій

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Реक्टर НУХТ
А.І. Українець
20 20 р.



АКТ

впровадження результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і дисертаційних робіт у навчальний процес вищих навчальних закладів
Замовник Національний університет харчових технологій
(найменування організації, установи)

Українець А.І.
(П.І.Б. керівника)

Дійсним актом підтверджується, що результати докторської дисертації на тему: «Біологічні властивості і мікробно-рослинні взаємодії збудника базального бактеріозу агрофітоценозу пшениці», що виконувалась згідно плану науково-дослідної роботи відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України «Екологічна роль фітопатогенних бактерій у формуванні збалансованого агрофітоценозу» (ДР № 0107U002577, 2007-2011 рр.), «Моніторинг та генетичне різноманіття фітопатогенних бактерій в системі органічного землеробства» (ДР № 0112U002751, 2012-2016 рр.), «Біосинтетична активність і функціональна роль фітопатогенних бактерій і мікоплазм при взаємодії з рослинами в агроекосистемах» (ДР № 0117U004513, 2017-2019 рр.)

виконаної у відділі фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України
(найменування кафедри)

виконуваної з 2007 по 2019
(термін виконання)

впроваджені у навчальний процес кафедри біотехнології і мікробіології

1. Вид впроваджених результатів: методи контролю найпоширенішого в Україні збудника базального бактеріозу пшениці за використання хімічних і мікробіологічних препаратів, спосіб клітинної селекції пшениці на стійкість до збудника базального бактеріозу.

2. Форма впровадження: лекційні, практичні та лабораторні заняття.

3. Новизна результатів науково-дослідних робіт: Встановлено, що фунгіцидам беноміл, тіофанат-метил та флудіоксаніл, які використовують в посівах пшениці,

2020-9-22 15:36


притаманні мутагенні властивості, щодо збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Виявлена здатність пестицидів індукувати морфологічну дисоціацію *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що ускладнює діагностику базального бактеріозу. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризуються підвищеною здатністю до утворення біоплівки, що призводить до збільшення здатності збудника до виживання у філосфері. Показано можливість використання мікробних пестицидів на основі *Bacillus* у контролі збудника базального бактеріозу пшениці. Запропоновано використання ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 у концентрації 0,4 мг/мл як селективного фактору при відборі стійких до збудника ліній пшениці.

4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких викладені результати НДР:

Результати наукових досліджень увійшли як окремі розділи до курсу лекцій з дисципліни «Біотехнологічні методи захисту рослин» для здобувачів освітнього ступеня «магістр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія». Матеріали дисертаційної роботи використано під час підготовки до видання підручника: Буценко Л.М., Пирог Т.П. Біотехнологічні методи захисту рослин. К.: Видавництва Ліра-К, 2018. 346 с. (Рекомендовано Вченою радою Національного університету харчових технологій як підручник для студентів вищих навчальних закладів. Протокол № 3 від 31 жовтня 2018 р.).

5. Соціальний і науково-технічний ефект полягає в ознайомленні майбутніх фахівців напряму «Біотехнологія» з можливостями біотехнології у галузі захисту рослин від фітопатогенних бактерій. Показано негативні наслідки від застосування хімічних препаратів для контролю збудників бактеріальних хвороб. Встановлено можливість використовувати мікробіологічних препаратів на основі *Bacillus* у контролі збудника базального бактеріозу пшениці. Розроблено спосіб відбору стійких до збудника базального бактеріозу клітинних ліній пшениці, що полягає у використанні як селективного фактору ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 у концентрації 0,4 мг/мл, відбір стійких ліній здійснюється культивуванням клітин пшениці із чергуванням: 1 пасаж – селективне середовище, 2 пасаж – неселективне середовище, 3 пасаж – селективне середовище.

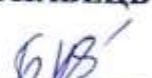
Керівник НДР


(підпис)

(Пирог Т.П.)
(ініціали, прізвище)

«28» 01 2020 р.

ВИКОНАВЕЦЬ


(підпис)

(Буценко Л.М.)
(ініціали, прізвище)

«28» 01 2020 р.

2020-09-29 15:36

ПОГОДЖЕНО
Проректор з навчальної і виховної
роботи НУБіП України
академік НААН Кваша С. М.

«*[підпис]*» 2020 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ
Перший проректор НУБіП України



академік НААН Ібатуллин І. І.

2020 р.

АКТЕ

про впровадження результатів дослідження
Буценко Людмили Миколаївни у навчальний процес

Основні положення, висновки і пропозиції дисертаційної роботи старшого наукового співробітника відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України Буценко Людмили Миколаївни на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія на тему «Біологічні властивості і мікробно-рослинні взаємодії збудника базального бактеріозу агрофітоценозу пшениці» впроваджені у навчальний процес, у вигляді підручника і методичних рекомендацій, а саме: «Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник» – 2018 р., «Діагностика і контроль збудників бактеріальних хвороб пшениці. Методичні рекомендації» – 2019 р. та при викладанні дисциплін «Загальна біотехнологія», «Екологічні біотехнології» і «Молекулярна біотехнологія» для підготовки студентів ОС «Бакалавр» за напрямом «Біотехнології й біоінженерія» та ОС «Магістр» зі спеціальності «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології,
д.с.-г.н., професор, членкор НААН

[підпис]

М. М. Доля



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ

вул. Г. Сковороди, 1/3, м. Полтава, 36003, тел./факс: (0532) 50-02-73,
E-mail: pdaa@pdaa.edu.ua Код ЄДРПОУ 00493014

№ 02-04/18

На № _____ від _____

2020-9-22 15:38

До спеціалізованої вченої ради Д
26.233.01 Інституту
мікробіології і вірусології ім. Д.К.
Заболотного НАН України

ДОВІДКА

про використання в освітньому процесі результатів наукових досліджень кандидатів біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України Буценко Людмили Миколаївни за темою «Біологічні властивості і вплив на рослинні клітини *Pseudomonas syringae* pv. *atrolaciens* – збудника базального бактеріозу агроєкосистеми пшениць»

Результати і висновки дисертаційного дослідження Буценко Л.М. щодо розроблення наукових і методологічних основ вивчення збудника базального бактеріозу пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *atrolaciens*, який є основним збудником бактеріальних хвороб зернових культур як в Україні, так і в інших країнах, розповсюдження і екологічних ніш збудника, зміну властивостей *P. syringae* pv. *atrolaciens* за дії пестицидів і його здатності впливати на рослину, зокрема, геномодульовальну активність його ліпополісахаридів використовуються у дослідному господарстві академії і навчальному процесі Полтавської державної аграрної академії при підготовці фахівців освітніх ступенів «бакалавр» та «магістр» спеціальності 202 Захист і карантин рослин і викладання курсів «Фітосанітарний моніторинг», «Інтегрований захист рослин», «Екологія шкідників та збудників хвороб».

Перший проректор,
д.с.-г.н., професор



П. В. Писаренко