АСОЦІЙОВАНІ З *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SAVASTANOI* БАКТЕРІЇ У ПАТОЛОГІЇ *FRAXINUS EXCELSIOR* L.

А.Ф. Гойчук¹, І. М. Кульбанська¹, М.В. Швець²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,

вул. Генерала Родімцева, 19, Київ, 03041, Україна

²Житомирський національний агроекологічний університет,

вул. Старий бульвар, 7, Житомир, 10002, Україна

e-mail: ogoychuk@gmail.com

Незважаючи на певні досягнення у вивченні бактеріозів лісових деревних рослин та їхніх збудників, наразі недостатньо дослідженими залишаються системні взаємозв'язки між окремими компонентами мікро- та мікобіоти, що виникають на різних етапах патологічного процесу. Патологія *F. excelsior* – явище багатогранне, у якому системно взаємопов'язані процеси інфекційного і неінфекційного характеру, що суттєво ускладнює діагностику її першопричин.

Мета. Дослідити та з'ясувати роль і місце фітопатогенних бактерій у масовому всиханні ясеневих насаджень Західного Поділля України та дослідити наявність антагонізму між складниками міко- та мікроорганізмів у патології туберкульозу. **Методи.** За загальноприйнятими фітопатологічними і мікробіологічними методами проводили дослідження патогенних, анатомо-морфологічних, культуральних та антагоністичних властивостей *P. syringae* pv. *savastanoi* та асоційованих з нею бактерій у патології туберкульозу *F. excelsior*. **Результати.** Встановлено, що ізольовані нами з патології *F. excelsior* фітопатогенні бактерії (*P. syringae* pv. *savastanoi*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola*, *E. horticola*, *Xanthomonas* sp.) не виявили антагоністичної активності як між собою, так і по відношенню до тестових культур бактерій. На відміну від бактерій, мікроміцетам (*Ulocladium botrytis*, *Phoma* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum*, *Cylindrocarpon didymum*, *Fusarium sporotrichiella*, *F. heterosporum*, *Fusarium* sp.), ізольованим із вегетативних та генеративних органів *F. excelsior*, притаманна більша антагоністична активність до фітопатогенних бактерій. Зокрема, найбільш активними були *U. botrytis* (середня стерильна зона – 5,8 мм) та *C. cladosporioides* (середня стерильна зона – 4,9 мм). До всіх видів грибів найбільш чутливими були *P. syringae* pv. *savastanoi*, ізольовані з насінин (крилаток), та колекційні *P. syringae* 8511 і *P. savastanoi* 9174. Дослідженнями біопрепаратів на базі аеробних спороутворювальних бактерій *Bacillus* sp. не виявлено високої антимікробної активності до всіх дослідних культур мікроорганізмів, а їхня активність залежала не лише від виду бактерій, а й від того, з яких органів *F. excelsior* вона виділена. **Висновки.** Видовий склад збудників бактеріозів лісових деревних рослин значно менший, ніж збудників мікозів, проте серед інфекційних хвороб *F. excelsior* найрозповсюдженішою і найшкочивнішою є хвороба саме бактеріального походження – туберкульоз ясеня (збудник – *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*). Встановлено, що бактерії роду *Bacillus* sp. здатні пригнічувати адгезію та виживання фітопатогенних *P. syringae* pv. *savastanoi* на поверхнях і в тканинах тест-рослин, елімінуючи популяцію патогена або зменшуючи її щільність з ймовірною атенуацією властивостей, механізм якої потребує подальших досліджень.

Ключові слова: *Fraxinus excelsior*, антагонізм, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, міко- та мікробіота, патоген.

Патогенна міко- та мікробіота є невід'ємною компонентою будь-якого живого організму, у тому числі і рослинного. Зазвичай вона представлена різними функціональними та систематичними групами епіфітів і ендоефітів. Особливою групою патогенних мікроорганізмів є збудники бактеріозів, які у здоровій рослині

представлені в якості аутомікробіоти (нормальної мікрофлори) у мінорній кількості [7]. Наразі бактеріози та їхні збудники значною мірою вивчені для рослин агроценозу. Що стосується бактеріозів лісових деревних рослин, то вони досліджені недостатньо, хоча в останні десятиріччя спостерігається підвищена увага до цієї

проблеми, зокрема і ендofітів [2, 3, 4, 5, 13, 14].

Етіологія, симптоматика і патогенез бактеріозів лісових деревних рослин різні. Навіть у межах однієї і тієї ж бактеріальної патології можуть спостерігатись певні відмінності, зокрема й етіологічні, в частині видової належності збудника. Так, у літературі наведено різні види і роди фітопатогенних бактерій, що є збудниками поширеного і шкодочинного захворювання – туберкульозу ясен звичайного (бактеріального раку). Дослідниками даного питання ізольовано значне видове і формове різноманіття міко- і мікроорганізмів. Зокрема, бактерія *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev. pv. *fraxini* + гриб *Phoma riggenbachii* Boerema та Janse [9]; *P. syringae* subsp. *savastanoi* pv. *oleae* + гриб *Nectria galligena* [8]; *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini* [15]; мікроміцети (*Fusicoccum* sp., *Cytophoma pruinosa* (Fries) von Hoehnel [1, 15], *Gloeosporium aridum* Ell. і Holw.); віруси; нематоди (*Xiphinema a* Brandt *mericanum* Cobb); мікоплазми («відьмина мітла» була знайдена на стовбурах на прогресуючих стадіях відмирання *F. excelsior* в Нью-Йорку [13]). Останні підтверджені дослідження в Україні та світі свідчать про те, що збудником туберкульозу *F. excelsior* є фітопатогенна бактерія *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (ex Smith 1908) Gardan et al. 1992, яку в патології супроводжують відмічені нами мікроміцети та інші складники мікробіоти.

У зв'язку з вищенаведеним **метою** роботи було дослідити та з'ясувати роль і місце фітопатогенних бактерій у масовому всиханні ясеневих насаджень Західного Поділля України та дослідити наявність антагонізму між складниками міко- та мікроорганізмів у патології туберкульозу.

Матеріали і методи. Для дослідження особливостей етіології туберкульозу *F. excelsior* в природних умовах на територіях державних лісгосподарських підприємств («Чортківське ЛГ», «Тернопільське ЛГ», «Бучацьке ЛГ») відібрали зразки з уражених дерев ясен звичайного. Уражені зразки відбирали з патології різної інтенсивності, з дерев різних вікових груп (молодняки, середньовікові та стиглі) та з різних частин стовбура у поперечному та поздовжньому розрізах – з кори ураженої луб'яної частини, на межі здорової та ураженої деревини та візуально здорової тканини.

У лабораторних умовах Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України гомогенізували і висівали на картопляний агар (КА) шматочки уражених тканин. Бактеріальні посіви вирощували у термостаті за температури 26° С.

За загальноприйнятими фітопатологічними і мікробіологічними методами проводили дослідження патогенних, анатомо-морфологічних, культуральних та антагоністичних властивостей *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* та асоційованих з нею бактерій і мікроміцетів у патології туберкульозу *F. excelsior*.

Кількість мікроорганізмів залежно від функціональних та інших ознак тестували за їхнім ростом на спеціальних поживних середовищах (КА, МПА, МПБ солодовий екстракт агару, Чапека тощо). Патогенні властивості ізолятів виявляли в лабораторних і польових умовах шляхом штучного зараження вегетативних та генеративних органів *F. excelsior* та індикаторних рослин (*Phaseolus vulgaris* L., *Nicotiana tabacum* L., *Kalanchoe laciniata* L.) бактеріальною суспензією з титром 10^8 – 10^9 кл×мл⁻¹ (за стандартом каламутності). Контроль – стерильна водогінна вода. Розміщення і розміри клітин бактерій, забарвлення за Грамом, морфологію колоній мікроорганізмів, їхні біологічні, біохімічні та культуральні властивості вивчали за спеціальними методами [10, 12].

Для з'ясування здатності ізолятів бактерій ферментувати різні джерела вуглеводів застосовували мінеральне середовище Омелянського. Як джерела вуглеводів використовували такі органічні сполуки: лактозу, ксилозу, рамнозу, трегалозу, рафінозу, L-арабінозу, мальтозу, сорбітол, саліцин, сахарозу, галактозу, фруктозу, гліцерол, манітол, цитрат.

Ферментативний або окислювальний шлях засвоєння глюкози визначали за ростом мікроорганізмів на середовищі Омелянського в анаеробних умовах під шаром вазелінового масла товщиною 1 см. Індикатор – водний розчин бромтимолу блакитного. Для виявлення протеолітичних ферментів у бактерій використовували молоко та желатин.

Взаємодію між мікроорганізмами досліджували методом відтермінованого антагонізму. Тест-культурами були стандартний набір штамів бактерій з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, зокрема

Pseudomonas syringae 8511, *P. savastanoi* 9174, *P. fluorescens* 8573, *Erwinia carotovora* 8982, *Xantomonas campestris* 8003 б, а також ізольовані нами з вегетативних та генеративних органів *F. excelsior*.

Антибактеріальну активність біопестицидів на базі *Bacillus* sp. досліджували методом титрів та на *F. excelsior* у природних умовах.

Результати. Всього відібрано 240 зразків для міко- та мікробіологічних досліджень; виділено 110 ізолятів грибів та бактерій, у тому числі 37 штамів фітопатогенних бактерій, які використані нами для подальших досліджень.

На чашках Петрі виростили колонії переважно 3–4 морфотипів, інколи однорідні. Так, з різних уражень були виділені жовті, кремові

та сірі колонії. При цьому жовті і кремові колонії були виділені практично з усіх органів ясени з ознаками всихання і туберкульозу. У той же час еконішею для сірих колоній, до яких відносяться *P. syringae* pv. *savastanoi*, були верхівкові листкові бруньки, деревина, насіння.

Встановлено, що мікробіота вегетативних та генеративних органів *F. excelsior* належить до родів *Pseudomonas*, *Erwinia* і *Xanthomonas* та за анатомо-морфологічними, культуральними та біохімічними характеристиками віднесена до *Pseudomonas* sp., *P. syringae* pv. *savastanoi*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *Erwinia herbicola*, *E. horticola*, *Xanthomonas* sp. (табл. 1). У зразках уражених тканин також виявлено спороносні бактерії *Bacillus* sp. (відсоток їх від загального поширення незначний).

Таблиця 1

Кількість КУО бактерій, ізольованих із вегетативних та генеративних органів *Fraxinus excelsior*

№ зразків	Штами, кількість КУО бактерій						
	<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. syringae</i>	<i>E. herbicola</i>	<i>E. horticola</i>	<i>Xanthomonas</i> sp.	Інші
1	30	0	56	2	0	12	2
2	24	4	70	0	4	7	–
3	77	0	31	3	5	0	14
4	116	4	50	6	6	3	–
5	168	0	91	0	0	6	31
6	40	0	137	0	0	20	18
7	61	1	105	0	0	18	12

У результаті проведених досліджень встановлено, що за кількістю КУО бактерії, ізольовані з вегетативних та генеративних органів *F. excelsior*, вирізнялись між собою. Середні значення кількості бактерій, ізольованих із вегетативних та генеративних органів *F. excelsior*, становили від 1 до 168 КУО. Найбільшу кількість бактерій (116, 168 КУО) отримали за ізолювання *P. syringae* pv. *savastanoi*, а найменшу – за ізолювання *P. fluorescens*.

Окрім того, із уражень *F. excelsior* ізольовано 10 видів мікроміцетів, які належать до анаморфних грибів, зокрема, *Acremonium strictum* W. Gams., *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, *Cylindrocarpon didymum* (Harting), *Fusarium heterosporum* Nees, *F. sporotrichiella* Bilaivar., *Fusarium* sp., *Mycelia sterilia* (dark), *Mycelia sterilia* (orange), *Phoma* sp. та *Ulocladium botrytis* Preuss.

На відміну від встановлення видової належності мікроміцетів, яка базується зазвичай на анатомо-морфологічних характеристиках вегетативних та генеративних органів (міцелію та спороношення) із використанням класичних мікологічних методів, ідентифікація фітопатогенних бактерій, зважаючи на їхні незначні морфологічні відмінності між окремими видами, складна і потребує спеціальних мікробіологічних методів.

Основну увагу приділено бактеріям *Pseudomonas* sp., які виявилися інертними до джерел вуглеводів як на мінеральному середовищі Омелянського, так і на середовищі Гісса. Використовують деякі амінокислоти і солі органічних кислот. Оксидазонегативні. Всі штами мають каталазну активність; не виявлені пектиноруїнуючі ферменти, амілаза, уреаза. Молоко тільки пептонізують. Лакмусову сироватку підлугують через добу.

Збудник туберкульозу *F. excelsior* – *P. syringae* pv. *savastanoi* – ізольований нами з різних, окрім листків, органів, має типові ознаки для роду *Pseudomonas*. Це неспороносні рухомі палички розміром 0,4–0,8×1,3–3,0 мкм, грамнегативні, розміщені поодинокі, парами або короткими ланцюжками, іноді групами, лофотрихи, з 1–6 полярними джгутиками. Кінці паличок плавно заокруглені (табл. 2).

На КА колонії сіро-білі, гладенькі, круглі, прозорі, з більш щільним центром, з рівним чи злегка хвилястим, іноді з блакитним відтінком, краєм.

На МПА колонії дрібні, 2–3 мм в діаметрі, ростуть повільно, сіро-білі, круглі, плоскі або випуклі, з виїмкою в центрі, прозорі, з рівним чи хвилястим краєм.

У МПБ ріст помірний, бактерії утворюють рівномірне помутніння, яке починається зверху, осад, тоненьку плівку і пристіночне кільце. Не виявлено росту на середовищах Чапека і Омелянського.

За фізіологічними ознаками виділені штами не однорідні. Аероби, не ферментують глюкозу під вазеліновим маслом. Бактерії засвоюють сахарозу, галактозу, фруктозу, гліцерол, манітол, цитрат; не засвоюють лактозу, ксилозу, рамнозу, трегалозу, рафінозу, L-арабінозу, мальтозу, сорбітол, саліцин. Не редукують нітрати, не утворюють левану. Спричиняють реакцію надчутливості на листках *Nicotiana tabacum*. Утворюють флюорисцентний пігмент на КА.

Желатин не гідролізують, не редукують нітрати, не утворюють левану. Оксидазонегативні, каталазопозитивні. Відмічено ріст при 37° С.

За наведеними ознаками збудник туберкульозу *F. excelsior* близький до описаного в літературі. Зокрема, ріст (відсутність росту) на більшості поживних середовищ, значна варіабельність по відношенню до джерел живлення, спорідненість у продукуванні ферментів. Основні відмінності полягають у відсутності флюорисценції в рідких поживних середовищах і повільне засвоєння вуглеводів та спиртів. Неоднорідність і пластичність даного виду пов'язані з можливістю розширення спектру рослин-живителів [4].

Клітини *Pseudomonas fluorescens* типові для роду *Pseudomonas*. Це – прямі, рухомі палички, лофотрихи, розташовані поодинокі або парами, грамнегативні. Спор не утворюють. У фізіологічному відношенні всі штами досить подібні. Колонії на КА сірувато-білі, напівпрозорі, блискучі, круглі, діаметром 4–6 мм, плоскі, з

піднятим центром і, зазвичай, слабохвилястим краєм. В МПБ утворюють плівку, слабкий осад і жовто-зелений пігмент, який флюорисціює. Молоко пептонізують. Желатин гідролізують. Не утворюють індол і сірководень. Аеробно засвоюють глюкозу, сахарозу, галактозу, фруктозу, гліцерол. Спричиняють реакцію надчутливості на листках *Nicotiana tabacum*. Оксидазо- і каталазопозитивні, не утворюють пектинруйнуючі ферменти. Досліджений нами комплекс фенотипових властивостей подібний до описаних у літературі [4] та підтверджує спорідненість з представниками роду *Pseudomonas*, а саме з оксидазопозитивними представниками *P. fluorescens*.

Клітини *Pseudomonas syringae*, як збірного виду, грамнегативні, неспороносні, лофотрихи, розміщуються поодинокі, парами або короткими ланцюжками. На КА колонії круглі, брудно-білі з хвилястим краєм, поверхня припіднята, зерниста, центр ущільнений. На МПА колонії дрібні, 2–3 мм в діаметрі, ріст помітний через 24–48 год. Структура колоній тонкоштрихувата або гранульована, прозора, напівпрозора. Форма випукла, консистенція масляниста, колір сірувато-білий, білий або перламутрово-білий. При рості на КА утворюють специфічний запах. Краї рівні або хвилясті. Оптимальна температура росту бактерій 25–30° С, при 41° С – ріст припиняється.

В МПБ під впливом бактерій помутніння спотерігається через 24 год. На другу добу бульйон починав флюорисціювати. Притаманні варіабельні властивості до розрідження желатину. Бактерії не продукують індол, сірководень, протопектиназу. Каталазопозитивні. Оксидазонегативні. Не гідролізують крохмаль. Штами утилізують з утворенням кислоти без газу сахарозу, фруктозу, галактозу, манітол; не ферментують лактозу, ксилозу, рамнозу, мальтозу, рафінозу, сорбітол.

Ізольовані нами неферментуючі штами *Pseudomonas* sp. за морфологічними ознаками колоній і клітин бактерій не відрізняються від *Pseudomonas syringae*, проте їм притаманна інертність у засвоєнні вуглеводів з амінокислот, цукрів і спиртів. Можливо, вони є ауксеотрофними мутантами *P. syringae* [4].

Клітини *Xanthomonas* sp. прямі, рухомі палички, розташовані поодинокі або парами, грамнегативні, лофотрихи. Спор не утворюють. При рості на КА утворюють круглі, гладенькі, іноді зустрічаються шорсткуваті, блискучі, жовті колонії з рівними краями.

Оксидазонегативні. Каталазопозитивні. Відношення до молока і желатину варіабельні. Індол не утворюють. Нітрати не відновлюють. Ае-

робно утилізують глюкозу, сахарозу, трегалозу; не використовують арабінозу, фруктозу, лактозу, мальтозу, рафінозу, манітол, гліцерол і саліцин.

Таблиця 2

Морфологічні та біохімічні властивості *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*

Тест	Ізольовані нами, 2014	За (Goychuk et al., 2004)
Рухливість, джгутики полярні	+	+
Фарбування за Грамом	–	–
Спороутворення	–	
Пігментоутворення	+	±
Розрідження желатину	–	–
Відношення до молока: згурджування пептонізація		– +
Лакмусова сироватка		л/р
Редукція нітратів	–	–
Утворення : левану індолу аміаку, сірководню	–	+ – –
Ріст на середовищах: КА, МПА, МПБ, Ейкмана, Ушинського, Ліске, Фермі, Кона Чапека, Омелянського	+ –	+ + – –
Засвоєння: глюкози (аеробно) глюкози (анаеробно)	+ –	+ +
Використання: ксилози, рамнози, трегалози, рафінози, L-арабінози, сорбітолу	–	
цитрату, манітолу	+	
мальтози, лактози	–	к
саліцину	–	–
галактози, сахарози, гліцеролу, фруктози	+	к
крохмалю, гліцерину, арабінози, манози, рафінози, декстрози, маніту, дульциту		к
ескулін		–
Засвоєння органічних кислот: лимонна, кетоглутарова, мурашина, оцтова, яблучна, янтарна, молочна, винна		л
щавлева, сульфанілова		–
Засвоєння амінокислот та амідів:		
аланін, аспарагін, глутамін, триптофан, аспаргінова, глутамінова, γ- аміномасляна кислота		л
цистеїн, цистин, лейцин		–
Ферментативна активність: оксидаза, протопектиназа	–	–
пектинази,	–	
целюлаза, амілаза, пектинруйнуючі ферменти		–
каталаза	+	+
уреаза, левансахараза		+
Ріст при 37° С	+	
Реакція Фогес-Проскауера		–

Примітка: (+) – наявність властивостей; (–) – відсутність властивостей; (+,–) – варіабельні властивості;
(к) – утворення кислоти; (л/р) – утворення лугу з наступною редукцією.

Клітини *Erwinia horticola* – короткі палички, еліпсоподібні, розміром 0,3–0,5×0,8–1,3 мк, рухомі, перитрихи, розміщуються поодинокі або парами, рідко – короткими ланцюжками. Спор не утворюють. На КА колонії круглі, білого, сіробілого, іноді брудно-білого кольору, із випуклою поверхнею і ущільненим центром, діаметром 5–6 мм. На МПА колонії достатньо великі, до 5 мм в діаметрі, конусовидні, гладенькі, блискучі, напівпрозорі зі слабо хвилястим краєм. У МПБ спостерігається рівномірний ріст з утворенням нижньої плівки на поверхні бульйону, кільця на стінці та слабого осаду. Повільно ростуть на арабінозі, саліцині, ксилізі. Добрий ріст спостерігається на середовищі з глюкозою, мальтозою, рафінозою, рамнозою, фруктозою, галактозою. Ізоляти не ферментують лактозу; не утворюють пектиназу, протопектиназу, желатиназу. Не розріджують желатин, молоко повільно звурджують, але не пептонізують. Утворюють індол. Оксидазонегативні.

Bacillus subtilis і *B. pumilus* на картопляному агарі утворювали сірувато-кремові, маслянисті, з нерівними краями колонії, які не просвічувались. У літературі є дані щодо прояву агресивних властивостей цих бактерій до деревних рослин лише в несприятливих умовах їх зростання.

Перевірка патогенності, тобто здатності уражувати живі клітини дозволяє надійно відділити патогенів від сапротрофів і експериментально довести причину хвороби. Попереднє встановлення патогенних властивостей ізолятів ми вивчали на рослинах-господарях (листяках, паго-

нах та стовбурах *F. excelsior*) як у лабораторних (на вегетуючих зрізаних пагонах, занурених у воду), так і в природі, а також на листках і стеблах рослин-індикаторів (*Phaseolus vulgaris* L., *Nicotiana tabacum* L., *Kalanchoe laciniata* L.). Для кінцевої діагностики інфікування рослин проводили виключно в природних умовах.

Результати штучного ураження пагонів та стовбурів *F. excelsior* у більшості випадків дали позитивний результат – утворення незначного некрозу навколо місця введення інокулюму з подальшим розвитком патологічного процесу, притаманного туберкульозу (рис. 1).

Місцями епідерміс припіднімався та частково лущився, було помітне руйнування не тільки поверхневої кірки, а й первинної кори та лубу.

Динаміка розвитку штучного інфікування гілок *F. excelsior* показує, що перші ознаки ураження проявилися в розтріскуванні кірки в місці введення бактеріальної суспензії вже на 15 день експерименту. Ще через 10 днів окремі тріщини злилися в одну суцільну рану, відбулося збільшення її розмірів, стало помітним руйнування не тільки поверхневої кірки, а й первинної кори та лубу. Через три місяці після ураження злупився верхній шар кірки, відбулося «оголення» покривної тканини та рубцювання окремих шарів. Почалося затухання процесу розвитку зони ураження, проте весною наступного року (9 місяців після ураження) поновився процес розвитку хвороби, вона набула типового для туберкульозу вигляду. Внутрішні тріщини поглибилися та збільшилися у розмі-

Рис. 1. Розвиток патологічного процесу в природних умовах при штучному ураженні пагонів ясени *P. syringae* pv. *savastanoi* (штам Н₁)

рах. Через рік після ураження рана набула вигляду туберкульозної пухлини. Встановлено, що листки ясена звичайного в експерименті не були чутливими до ізолюваних нами і колекційних штамів бактерій.

Одним із перспективних напрямів біозахисту лісових деревних рослин від шкідливих організмів є пошук бактерій-антагоністів. Тому дослідження взаємовідношень, насамперед антагоністичних, між різними видами міко- та мікроорганізмів, зокрема сапротрофів і патогенів, збудників інфекційних хвороб рослин, у тому числі і бактеріозів, у контексті виявлення активних антагоністів до патогенних складників міко- та мікробіоти є надзвичайно важливим та актуальним.

Взаємовідносини між різними видами фітопатогенних бактерій – збудників бактеріальних захворювань *F. excelsior* (туберкульозу та всихання) – вивчали методом перпендикулярних штрихів. Облік результатів проводили на 2-у та 6-у добу. При обліку враховували наявність або відсутність росту тестової культури. Ступінь

антагоністичної активності штамів визначали за зонами затримки росту культур фітопатогенних бактерій. Повторність дослідів – трикратна.

Для встановлення антагоністичних взаємовідносин між патогенами *F. excelsior* використовували 7 ізолятів бактерій і мікроміцетів, ізолюваних нами з уражених генеративних та вегетативних органів, а також колекційні штамів відділу фітопатогенних бактерій ІМВ ім. Д. К. Заболотного НАН України, зокрема *Pseudomonas syringae* 8511, *P. savastanoi* 9174, *P. fluorescens* 8573, *Erwinia carotovora* 8982.

Експериментальні дослідження взаємовідносин проводили як між штамми одного виду, так і між штамми, які належать до різних систематичних груп організмів. Усі штамми були використані в перехресних реакціях «основна культура-тестова культура». Всього поставлено 108 варіантів реакцій. При проведенні досліджень нами не виявлено антагоністичної взаємодії (зона затримки росту 0 мм) між тестовими культурами – патогенами *F. excelsior* в системі «бактерія-бактерія» (рис. 2).

Рис. 2. Взаємовідносини між колекційними штамми та ізолятами з *Fraxinus excelsior* у системі «бактерія-бактерія» (9к₁, 11₂, Н₁, К₆ – *P. syringae* pv. *savastanoi*, 8511 – *P. syringae* (колекційний штам), 9174 – *P. savastanoi* (колекційний штам), Кр₄, 8к₂ – *Pseudomonas* sp., Б₂ – *Xanthomonas* sp.)

На відміну від бактерій, мікроміцети, виділені з вегетативних та генеративних органів *F. excelsior*, виявили дещо більшу антагоністичну активність щодо фітопатогенних бактерій. Найактивнішими були *Ulocladium botrytis* (середня стерильна зона 5,8 мм) та *Cladosporium cladosporioides* (середня стерильна зона 4,9 мм). Вони пригнічували різною мірою всі тест-культури фітопатогенних бактерій. Активність

інших трьох видів мікроміцетів – *Acremonium strictum*, *Fusarium heterosporum* та *Fusarium sporotrichiella* була вибірковою. Вони не затримували ріст *Pseudomonas* sp. (Кр₄ – ізолювано з однокрилаток) та *P. syringae* pv. *savastanoi* (К₆ – ізолювано з кори) і слабо пригнічували *P. syringae* pv. *savastanoi* (Н₁ – ізолювано з насіння) та колекційний *P. savastanoi* 9174. Інші види мікроміцетів не проявили антибактері-

альної активності. До всіх видів грибів найбільш чутливими були бактерії *P. syringae* pv. *savastanoi* (H₁), *P. syringae* 8511 та *P. savastanoi* 9174 (табл. 3).

Щодо зворотного впливу, тобто фітопатогенних бактерій на мікроміцети, то в більшості випадків їхня фунгіцидна активність дорівнювала нулю. Незначні зони, які утворилися при дії бактерій на мікроміцети теж фактично нульові. Можна допустити, що і в природі фітопатогенні бактерії поза патологічним процесом не впливають на ріст мікроміцетів. Таке припущення узгоджується з дослідженнями інших авторів в експериментах із шпильковими лісовими деревними рослинами [6].

Узагальнюючи дослідження взаємовідносин між міко- та мікрофлорою вегетативних та генеративних органів *F. excelsior* в системі «бактерія-бактерія», «бактерія-мікроміцет», слід констатувати, що серед бактерій *F. excelsior*, у тому числі фітопатогенних, не виявлено антагоністів із зоною пригнічення росту, яка перевищує 30 мм, що не дає підстав для подальшого їхнього вивчення як біологічного пестициду. Чинниками обмеження заселення *F. excelsior* фітопатогенними бактеріями є спороносні бактерії та мікроміцети. Серед вивчених ізолятів не виявлено

стимуляторів росту патогенних мікроорганізмів.

З метою теоретичного та практичного обґрунтування біологічного захисту *F. excelsior* від збудників інфекційних хвороб, і в першу чергу бактеріозів, ми провели експериментальні дослідження щодо антифунгальної та бактерицидної активності біопрепаратів (Віктант та П27ант) на базі аеробних спороутворювальних бактерій *Bacillus* sp. щодо колекційних та ізольованих нами фітопатогенів з родів *Pseudomonas*, *Xantomonas* та *Erwinia*. Бактеріостатична та бактерицидна дія досліджуваних бактерій оцінювалась за зоною пригнічення росту тест-культур фітопатогенних бактерій (рис. 3).

З'ясовано, що найбільш високу антагоністичну активність проявив Віктант до колекційного штаму *Pseudomonas savastanoi* 9174 – зона затримки росту складала 19,5 мм (середньоактивний). Також середньоактивним він виявився по відношенню до штаму *P. syringae* pv. *savastanoi* (H₁). Проявив слабку антагоністичну дію до штамів *Pseudomonas* sp. (Кр₄, Кр₅ – ізольовано з однокрилаток), *P. syringae* pv. *savastanoi* (9к₁ – ізольовано з черешків і листків, 11₂ – ізольовано з кори) та *P. syringae* 8511 – зона затримки росту коливалася у межах 4–9 мм (табл. 4).

Таблиця 3

Антибактеріальні властивості мікроміцетів, виділених із вегетативних та генеративних органів *Fraxinus excelsior*

Тест-культури бактерій	Тест-культури грибів								Зона пригнічення росту (середнє значення), мм
	<i>Ulocladium botrytis</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Acremonium strictum</i>	<i>Cylindrocarpon didymum</i>	<i>Fusarium sporotrichiella</i>	<i>Fusarium heterosporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	
	Зона пригнічення росту, мм								
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (Кр ₂)	5	0	3,5	1	0	2	2	0	1,7
<i>Pseudomonas</i> sp. (Кр ₄)	2	0	2	0	0	0	0	0	0,5
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (H ₁)	3	0	7,5	6	0	7,5	8,5	0	4,0
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (K ₆)	8	0	3	0	0	0	0	0	1,4
<i>P. syringae</i> 8511	6,5	0	5	5	0	3,5	3	0	2,9
<i>P. savastanoi</i> 9174	10	0	8,5	7	0	7	9	0	5,2
(Зона пригнічення росту (середнє значення), мм	5,8	0	4,9	3,2	0	3,3	3,8	0	—

Рис. 3. Антимікробна активність Віктанту та штаму П27ант (9к₁, 11₂, Н₁ – *P. syringae* pv. *savastanoi*, 8511 – *P. syringae* (колекційний штам), 9174 – *P. savastanoi* (колекційний штам), Кр₄ – *Pseudomonas* sp.)

Таблиця 4

Антимікробна активність Віктанту та штаму П27ант

Тест-культури бактерій	П27ант	Віктант	Зона пригнічення росту (середнє значення), мм
	Зона пригнічення росту, мм		
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (Кр ₂)	9	–	4,5
<i>Pseudomonas</i> sp. (Кр ₄)	12	9	10,5
<i>Pseudomonas</i> sp. (Кр ₅)	5	7	6
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (9к ₁)	0	4	2
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (11 ₂)	11	9	10
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (Н ₁)	13,5	15	14,3
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (К ₆)	0	0	0
<i>P. syringae</i> 8511	9,5	4	6,8
<i>P. savastanoi</i> 9174	16,5	19,5	18
<i>P. fluorescens</i> 8573	7,5	10	8,8
<i>E. carotovora</i> 8982	2	2,5	2,3
Зона пригнічення росту (середнє значення), мм	8,8	8,2	–

Примітка: – зона відсутності росту тестової культури, мм; 0 – відсутність антагоністичної дії.

Культура виявилася не активною до штаму *P. syringae* pv. *savastanoi* (К₆). Штам П27ант проявив найвищу антагоністичну активність до штаму *P. savastanoi* 9174 (як і Віктант) – зона затримки росту склала 16,5 мм (середньоактивний). Також середньоактивним він виявився і до штамів *Pseudomonas* sp. (Кр₄) та *P. syringae* pv. *savastanoi* (11₂, Н₁) – зона затримки росту коливалася в межах 5–13,5 мм. Проявив слабку антагоністичну дію до штамів *P. syringae* pv. *savastanoi* (Кр₂), *Pseudomonas* sp. (Кр₅) та *P. syringae* 8511 – зона затримки росту коливалася в межах 5–9,5 мм. Культура виявилася не ак-

тивною до штаму *P. syringae* pv. *savastanoi* (К₆), (як і Віктант) та до *P. syringae* pv. *savastanoi* (9к₁).

При дослідженні дії препаратів Віктант та П27ант на мікроміцети встановлена певна варіабельність фунгіцидної та фунгістатичної дії. Так, неважко помітити, що в даному досліді між мікроміцетом і *Bacillus* sp. встановились більшою мірою фунгістатичні та бактеріостатичні відносини (ріст макроколоній бактерії і гриба спрямований в протилежні сторони, а між компонентами досліді добре видно чітку стерильну зону) (рис. 4, зліва).

Рис. 4. Антагоністична взаємодія між мікроміцетами *Fraxinus excelsior* та бактеріями *Bacillus* sp.

Обговорення. Наведена вище залежність пов'язана з тим, що дані складники досліджу мають достатню кількість поживних речовин. Щодо високої бактерицидної дії мікроміцетів (рис. 4, *справа*), то це також, на нашу думку, зумовлене вищезгаданим чинником. У природних умовах, де спостерігається жорстка конкуренція за поживні речовини, ці залежності можуть бути іншими, оскільки на мікроорганізми та режим їхнього живлення впливають різні чинники (деревна рослина, метеорологічні (синоптичні) та лісорослинні умови тощо). Зокрема, на КА інтенсивно ростуть бактерії, а ріст мікроміцетів при цьому пригнічений. У той же час на середовищі Чапека бактерії практично не ростуть в силу наявності у цих середовищах різних за придатністю для мікроміцетів і бактерій поживних речовин. То ж можна погодитись з думкою, що в природі відбуваються складні, постійно напружені, динамічні взаємовідносини не лише між мікроорганізмами та деревною рослиною, але й між складниками міко- та мікробіоти, що її колонізують [6].

Для підтвердження даної думки в природних (польових) умовах було проведено штучне ураження пагонів *F. excelsior* сумішшю чистих культур колекційних (*P. savastanoi* 9174 (9174)) та ізолюваних нами із вегетативних та генеративних органів *F. excelsior* з характерними ознаками ураження *P. syringae* pv. *savastanoi* фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *savastanoi* (H_1 , 9_{kl}), *P. sp.* (Kp_4) та препаратів П27ант, Віктант і *Bacillus* sp. (K_{1-4ant}) робочим розчином з титром 1×10^7 КУО $\times$ мл $^{-1}$. Контроль – ін'єкція препаратів та чистої культури *Bacillus* sp. У даному експерименті ми отримали варіабельні результати (табл. 5).

Так, при інокуляції пагонів *F. excelsior* сумішшю препарату П27ант та дослідних фітопатогенних бактерій в експерименті ми отримали позитивний результат (поява симптомів туберкульозу) з *P. savastanoi* 9174, *Pseudomonas* sp. (Kp_4) та *P. syringae* pv. *savastanoi* (9_{kl}). У той же час, за аналогічних обставин, нами не встановлено ознак патології при інокуляції пагонів сумішшю П27ант і *P. syringae* pv. *savastanoi* (H_1) (рис. 5).

Таблиця 5

Результати штучного зараження пагонів *Fraxinus excelsior* сумішшю препаратів та фітопатогенних бактерій в природних умовах

Препарати та культура <i>Bacillus</i> sp.	Фітопатогенні бактерії			
	<i>P. savastanoi</i> 9174 (9174)	<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (H_1)	<i>Pseudomonas</i> sp. (Kp_4)	<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> (9_{kl})
П27ант	+	–	+	+
Віктант	±	±	+	+
<i>Bacillus</i> sp. (K_{1-4ant})	+	+	±	+

Примітка: (+) – антагоністична дія; (–) – відсутність антагоністичної дії; (±) – варіабельні властивості.

Рис. 5. Результат ін'єкції суміші Віктант–Н₁ (*P. syringae* pv. *savastanoi*) (зліва) та П27ант–Н₁ (*P. syringae* pv. *savastanoi*) (справа)

Певною мірою подібні результати ми отримали і в інших варіантах досліду. Так, при штучній ін'єкції пагонів сумішшю Віктанту і *Bacillus* sp. (К_{1-4ант}) з дослідними фітопатогенними бактеріями позитивний результат отримано у варіантах Віктант–*Pseudomonas* sp. (Кр₄), Віктант–*P. syringae* pv. *savastanoi* (9к₁) та *Bacillus* sp. (К_{1-4ант})–*P. syringae* pv. *savastanoi* 9174 (9174), *Bacillus* sp. (К_{1-4ант})–*P. syringae* pv. *savastanoi* (Н₁), *Bacillus* sp. (К_{1-4ант})–*P. syringae* pv. *savastanoi* (9к₁). В інших варіантах результати були варіабельні. Певною мірою ми пояснюємо це тим, що згадані ізоляти бактерій виділені з різних типів уражень, з різних органів, можливо, з різновидів чи форм ясена тощо, які мають і різні фізіолого-біохімічні характеристики (обводненість, кількісні показники та співвідношення елементів живлення тощо).

Отже, виявлені нами, як і іншими дослідниками, елементи антагоністичних взаємовідносин між складниками різних систематичних і функціональних груп міко- та мікроорганізмів вказують на можливість і необхідність використання цього феномену у контексті механізмів позитивного та негативного зворотних зв'язків для напрацювання засобів і методів біологічного захисту лісових деревних рослин, у тому числі і *F. excelsior*, від збудників інфекційних хвороб, зокрема і бактеріозів.

Таким чином, видовий склад збудників бактеріозів лісових деревних рослин значно менший, ніж збудників мікозів, проте серед інфекційних хвороб *F. excelsior* найрозповсюдженішою і найшкодочиннішою є хвороба саме бактеріального походження – туберкульоз ясена (збудник – *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*). Між складниками мікробіоти не виявлено системного впливу між бактеріями. Більшою мірою фітопатогенні бактерії пригнічували спороносні бактерії та мікроміцети. Зворотного

негативного впливу на спороносні бактерії та мікроміцети не виявлено. Чинниками обмеження активності збудників бактеріозів *F. excelsior* є спороносні бактерії *Bacillus* sp. та біопрепарати на їхній основі. Досліджені нами згадані бактерії та біопрепарати Віктант і П27ант були середньоактивними на поживних середовищах до *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* та виявили варіабельні властивості в експерименті в природних умовах.

BACTERIA ASSOCIATED WITH *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SAVASTANOI* IN THE PATHOLOGY OF *FRAXINUS EXCELSIOR* L.

A.F. Goychuk¹, I. M. Kulbanska¹, M.V. Shvets²

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 19 Gen. Rodimtseva Str., Kyiv, 03041, Ukraine

²Zhytomyr National Agro-Ecological University, 7 Old Boulevard Str., Zhytomyr, 10002, Ukraine

Summary

Despite some advances in the study of bacterioses of forest woody plants and their pathogens, systemic relationships between the individual components of micro- and mycobiota that occur at various stages of the pathological process remain insufficiently studied. The pathology of *F. excelsior* is a multifaceted phenomenon in which the processes of an infectious and non-infectious nature are systemically interconnected, significantly complicating the diagnosis of its underlying causes. **The purpose of the article** was to elucidate the role and place of phytopathogenic bacteria in the mass dieback of many types of forest woody plants, including common ash, and to study systemic relationships, including antagonistic between the components of mycobacteria and microbiota in bacterial pathology of *Fraxinus excel-*

sior. **Methods.** According to generally accepted phytopathological and microbiological methods, the pathogenic, morphological, cultural, and antagonistic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* and associated bacteria in the pathology of tuberculosis of *F. excelsior* were studied. **Results.** It was established that phytopathogenic bacteria isolated from *F. excelsior* plants with pathology (*P. syringae* pv. *savastanoi*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola*, *E. horticola*, *Xanthomonas* sp.) did not have antagonistic activity to each other and to test-cultures of bacteria. Unlike bacteria, micromycetes (*Ulocladium botrytis*, *Phoma* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum*, *Cylindrocarpon didymum*, *Fusarium sporotrichiella*, *F. heterosporum*, *Fusarium* sp.) isolated from vegetative and generative organs of *F. excelsior*, have significant antagonistic activity against phytopathogenic bacteria. In particular, the most active were *U. botrytis* (average growth inhibition zone – 5.8 mm) and *C. cladosporioides* (average growth inhibition zone – 4.9 mm). They suppressed all the test cultures of phytopathogenic bacteria. The activity of other fungi species – *A. strictum*, *F. heterosporum* and *F. sporotrichiella* was selective. The most sensitive to all species of

fungi were *P. syringae* pv. *savastanoi* isolated from seeds and collection *P. syringa* 8511 and *P. savastanoi* 9174 strains. Regarding the effect of phytopathogenic bacteria on micromycetes, we did not reveal their antifungal activity. Research on biological products based on aerobic *Bacillus* sp. bacteria (which form spores) did not revealed high antimicrobial activity for all studied microorganisms, and their activity depended not only on the type of bacteria, but also on the organ of *F. excelsior* from which it was isolated. **Conclusions.** The species composition of bacterial pathogens of forest woody plants is much smaller than that of mycosis pathogens. However, tuberculosis caused by bacterial pathogen *P. syringae* pv. *savastanoi* is the most common and dangerous among the infectious diseases of *F. excelsior*. It was found that *Bacillus* genus bacteria are able to suppress the adhesion and survival of phytopathogenic *P. syringae* pv. *savastanoi* on the surfaces and tissues of test plants, eliminating the pathogen population or decreasing its density with a possible attenuation of properties, the mechanism of which requires further research.

Keywords: *Fraxinus excelsior*, antagonism, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, myco- and microbiota, pathogen.

1. Brandt RW. Ash dieback in Northeast U. S. Dept Agr Northeastern Forest Expt Sta Paper. 1961. Vol. 163. 8 p.
2. Cherpakov VV. [Bacterial diseases of forest species in pathology of forest]. SPb. : SPb GLTU; 2012. p. 292–303. Russian.
3. Davydenko K, Vasaitis R, Stenlid J, Menkis A. Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*; 2013. For Path. 43, p. 462–467.
4. Goychuk AF, Gordienko MI, Gordienko NM, et al. [Patologiya dibrov]. – Kiev; 2004: 470 p. Ukrainian.
5. Goychuk AF, Kulbanska IM. [Pathogenic myco- and microflora of common ash in the Podillia of Ukraine]. Mikrobiol Z. 2015; 77(5):69–73. Ukrainian.
6. Gvozdyak RI, Goychuk AF, Rozenfeld VV, Pasichnik LA. [Bacterial diseases of pine (*Pinus sylvestris* L.) and its floral microflora]. Monograph. Zhitomir: Polissya; 2011. 224 p. Ukrainian.
7. Gvozdyak RI. [Perspective directions of research of phytopathogenic bacteria]. In: Proceedings of the International Scientific Conference «Phytopathogenic bacteria. Phytoncidology. Allelopathy»; 2005 Oct 4–6; Zhitomir, Ukraine. 2005. p. 3–8. Ukrainian.
8. Inoue Iasuihiro, Takikawa Iuichi. *Pseudomonas syringae* strains are classified into five groups by comparing DMA homology at the hrp neighboring regions. J Gen Plant Pathol. 2000; 66 (3):238–241.
9. Janse JD. The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. II. Etiology and taxonomic considerations. European Journal of Forest Pathology. 1981; 11(7):425–438. URL: www.aginternetwork.oeg

10. Klement Z, Rudolf K, Sands DS. Methods in phytobacteriology. Budapest : Academial Knido, 1990. 568 p.
11. Kulbanska IM. [Pathogenesis of tuberculosis of an ash tree in the conditions of Western Podillya of Ukraine]. Forest Journal. 2015; 6:75–84. Russian.
12. Patika VP, Pasichnyk LA, Gvozdyak RI, Petrichenko VF, et al. [Phytopathogenic bacteria. Methods of research]. Monograph. Vol. 2. Vinnytsia: Windruck; 2017. 432 p. Ukrainian.
13. Schall RA, Agrios GN. Graft transmission of ash witches broom to ash. Phytopathology. 1973; 63:206.
14. Shvets MV. [Associated with *Enterobacter nimipressuralis* bacteria in the pathology bacterial dropsy of *Betula pendula* Roth]. Scientific Bulletin of UNFU. 2017; 27(3):66–69. Ukrainian.
15. Silverborg SB, Ross EW. Ash dieback disease development in New York state. Plant Dis Repr. 1987; 52:105–107.

Отримано 28.02.2020