

ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К.
ЗАБОЛОТНОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ



**ДІАГНОСТИКА І ІДЕНТИФІКАЦІЯ
ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ
ГОРІХУ ВОЛОСЬКОГО (*Juglans regia*) ТА
ОКРЕМИХ КВІТКОВИХ КУЛЬТУР (*Eustoma
grandiflorum*).**



Київ-2024

УДК 632.631:53.027+631.8

Методичні рекомендації підготовлені за участю наукових співробітників та спеціалістів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України – к.б.н., с.н.с. Гнатюк Т.Т., к.б.н., с.н.с. Данкевич Л.А., асп. Зарудняка М.І.

Видання рекомендацій розроблене за результатами наукових досліджень за останні 5 років у різних ґрунтово-кліматичних зонах України.

У методичних рекомендаціях описані симптоми бактеріальних хвороб горіху волоського (*Juglans regia*) та еустоми (*Eustoma*), їх поширення і шкодочинність, наведені результати їх поліфазної таксономії. Охарактеризовано ізолювання бактерій з уражених органів рослин, їх патогенні, морфолого-культуральні, біохімічні властивості та жирнокислотний склад клітинних ліпідів. У методичних рекомендаціях описано філогенетичний аналіз (на основі аналізу гену 16S рРНК) і детально відображено структуру ключових родів до яких вони належать.

Методичні рекомендації призначені для фітопатологів, агрономів, біологів, мікробіологів, селекціонерів, спеціалістів у галузі рослинництва і захисту рослин і карантинних служб, аспірантів, студентів біологічних і агрономічних факультетів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації.

Рецензенти

Член.кор НАНУ, доктор біологічних наук, професор **Г.О.**

Іутинська

доктор біологічних наук, професор **Л.М. Сківка**

Рекомендації розглянуто і затверджено на засіданні вченої ради Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ (протокол №13 від 26.11. 2024 р.)

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. БАКТЕРІАЛЬНІ ХВОРОБИ ГОРІХА ВОЛОСЬКОГО	6
1.1. Бактеріальний опік, коричневий апікальний некроз та вертикальний виразковий рак горіха волоського	6
1.2. Бактеріальний рак коренів	10
1.3. Плямистість листя горіха волоського	13
2. БАКТЕРІАЛЬНІ ХВОРОБИ ЕУСТОМИ	17
2.1. Гниль кореня (мокра бактеріальна гниль, шийкова гниль)	17
2.2. Бактеріальне в'янення та розтріскування стебла	18
2.3. Бактеріальний вілт	20
2.4. Бактеріальні плямистості	21
3. ВИДІЛЕННЯ БАКТЕРІЙ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ	22
4. МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ І ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПАТОГЕННИХ ДЛЯ ГОРІХУ ВОЛОСЬКОГО ТА ЕУСТОМИ БАКТЕРІЙ	25
5. ХЕМОТАКСОНОМІЧНИЙ АНАЛІЗ БАКТЕРІЙ НА ОСНОВІ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ КЛІТИННИХ ЛІПІДІВ	42
6. ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПАТОГЕННИХ ДЛЯ ГОРІХУ ВОЛОСЬКОГО ТА ЕУСТОМИ БАКТЕРІЙ	50
Список літератури	56
Додатки	64

ВСТУП

Згідно зі статистичними даними в Україні у 2018 року, площа насаджень волоського горіха у плодоносному віці перевищувала 13 тис. гектарів. Значну частку з них становили присадибні дерева. Незважаючи на невеликі площі, Україна має сприятливі природні умови для вирощування волоського горіха і, навіть, за мінімальних інвестицій у дану галузь займає провідні позиції у світі з виробництва та експорту. Зокрема в Департаменті сільського господарства США (United States Department of Agriculture) зафіксували у 2020-2021 роках рекордне виробництво волоських горіхів на рівні 2,3 млн тон. За даними цього департаменту Україна входить до топ-5 світових виробників волоських горіхів (близько 126 тисяч тон на рік). Експортний потенціал даної культури на пряму залежать від врожайності, що корелює з відсутністю ураження. За останні 10 років у різних регіонах світу було виявлено збудників бактеріальних хвороб горіха волоського, що раніше не були зареєстровані [5]. Даний факт може бути пов'язаний з інтенсивним антропогенним навантаженням на довкілля, глобалізацією аграрного сектору (переміщення посадкового матеріалу) і селекцією нових сортів з низьким вмістом алкалоїду югландину (бактерицидна і фунгіцидна дія). За даними літератури волоський горіх можуть уражувати: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* – збудник бактеріального опіку, коричневого апікального некрозу та вертикального виразкового раку; *Brenneria rubifaciens* – збудник глибокого раку кори і *Brenneria nigrifluens* – збудник дрібного раку кори [1, 2]; *Agrobacterium tumefaciens* – збудник раку коренів [3, 4] та *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – збудник плямистості листя [5]. Так епіфітотія зпринчинена *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* зареєстрована у 2016 році у одній із провінцій Ірану [5].

Еустома (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) або лізіантус (*Lisianthus grandiflorus*) - рід рослин, що належать до родини тирличевих (*Gentianaceae*) [6]. Ці однорічні або короткоживучі багаторічні квіткові рослини, що активно використовуються в квітникарстві та як декоративна рослина. Поширення *Eustoma* у рослинництві зросло завдяки популярності її продукції та високому попиту на ринку [7]. В нашій країні еустома почала набирати популярність у квітникарстві відносно не давно. Крім імпорту у відносно невеликій кількості, але з тенденцією до зростання, вирощують цю рослину і в Україні, переважно у Запорізькій (була найбільша кількість теплиць, особливо район Енергодару), Київській, Дніпропетровській, Миколаївській та Одеській областях. Вирощують еустому на продаж в теплицях [8]. В залежності від збудника, еустома може страждати від грибних, бактеріальних та вірусних захворювань. Грибні хвороби є найпоширенішою групою захворювань еустоми, які вражають листя, стебла та корені. Ці хвороби можуть проявлятися у вигляді плям на листках, загнивання стебел або гниллю кореневої системи. До найпоширеніших грибних захворювань еустоми належать фузаріоз, фітофтороз, сіра гниль та вертицильозне в'янення [9].

Бактеріальні хвороби уражають усі частини рослини: корені, стебла, листя та квіти. Найпоширенішим бактеріальним захворюванням еустоми є: гниль кореня (мокра бактеріальна гниль) – *Burkholderia gladioli*, бактеріальне в'янення та розтріскування стебла – *Trinickia caryophylli*, бактеріальний вілт – *Ralstonia solanacearum*, бактеріальні плямистості – *Pseudomonas* spp.

Одним із способів боротьби з розповсюдженням фітопатогенів є їх вчасна і коректна ідентифікація. Як правило для коректної ідентифікація фітопатогенних бактерій використовують поліфазну таксономію що

включає в себе дослідження патогенних, морфологічних, культуральних та біохімічних властивостей, а також жирнокислотного складу клітинних ліпідів [10, 11] та спорідненості нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК, що є одним з обов'язкових з критеріїв виду.

1. БАКТЕРІАЛЬНІ ХВОРОБИ ГОРІХА ВОЛОСЬКОГО

1.1. Бактеріальний опік, коричневий апікальний некроз та вертикальний виразковий рак горіха волоського

Синоніми хвороби: фітофтороз горіха волоського
Збудник хвороби: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce 1901) Vauterin et al., 1995; **домен:** *Bacteria*; **філум:** *Proteobacteria*; **клас:** *Gamma**proteobacteria*; **порядок:** *Lysobacterales*; **родина:** *Lysobacteraceae*; **рід:** *Xanthomonas*

Інші наукові назви: *Bacillus juglandis* (Pierce 1901) Holland 1920, *Bacterium juglandis* (Pierce 1901) Smith 1905, *Phytomonas juglandis* (Pierce 1901) Bergey et al., 1930, *Pseudomonas juglandis* Pierce 1901, *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Pierce 1901) Dye 1978, *Xanthomonas juglandis* (Pierce 1901) Dowson 1939

Історія відкриття. Початкова таксономія роду *Xanthomonas* ґрунтувалася на специфічності хазяїна і рослини тобто на концепції "новий хазяїн – новий вид", що призвело до створення складного таксону з понад 100 видами. Згідно даних сучасної таксономії рід *Xanthomonas* об'єднує у своєму складі 35 видів патогенних для рослин бактерій (додаток 1). Вид *X. arboricola* об'єднує у своєму складі три патовара (pv. *pruni*, pv. *corylina*, pv. *juglandis*), що є патогенними для багаторічних деревних культур а саме: бактеріальна плямистість листя кісточкових культур – pv. *pruni* (персик, вишня, абрикос, слива та частково мигдаль); бактеріальний опік ліщини (*Corylus avellana*) – pv.

corylina; бактеріальний опік горіху волоського (*Juglans regia* L) (рв. *juglandis*). Історія *Xanthomonas arboricola* рв. *juglandis* починається у 20-му столітті, коли хвороба була виявлена на англійському горіху, а збудник був визначений як *Bacillus juglandis* [12, 13, 14]. Видова назва «*arboricola*» була вперше запропонована Vauterin et al., і обґрунтована включенням бактерій, які викликають хвороби деревних порід [14, 15, 16]

Розповсюдження. Як відмічалось раніше вид *Xanthomonas arboricola* об'єднує у своєму складі три патовари які мають різний ступінь розповсюдження в світі. Так *X. arboricola* рв. *corylina* є карантинним об'єктом що внесений до фітосанітарного законодавства ЄС (Директива ЄС 2000/29/CE) та до списків Європейської та Середземноморської організації захисту рослин (список EPPO A2). Натомість *X. arboricola* рв. *juglandis* є карантинним лише для окремих країн наприклад у Йорданії він був включений до списку A2 (з 2013 року). Натомість на території ЄС за даними Європейської та Середземноморської організації захисту рослин (EPPO) він внесений до переліку регульованих не карантинних організмів (Швейцарія, Великобританія, ЄС). Аналогічна ситуація склалася з *X. arboricola* рв. *pruni* у окремих країнах і регіонах та за даними EPPO ЄС він є регульованим не карантинним організмом Україна, Швейцарія; карантинний об'єкт – Марокко, Туніс, Чилі (A1), Мексика, Іран (A1), Ізраїль, Йорданія (A2), Грузія (A1), Норвегія, Туреччина (A1), Великобританія (A1). За останнє десятиліття випадки бактеріального опіку горіху волоського були зареєстровані в Ірані, Іспанії, Швейцарії, Тайвані і США, а нещодавні спалахи – Франції, Ірані, Литві та Туреччині. Швидкість розповсюдження *X. arboricola* рв. *juglandis* останнім часом свідчить про можливість спалаху епіфітотій у майбутньому [15, 16].

Шкодочинність. Слід наголосити що різні патовари у складі виду *Xanthomonas arboricola* мають різний ступінь шкодочинності (див. розповсюдження). Що стосується безпосередньо бактеріального опіку горіху волоського *X. arboricola* pv. *juglandis*, то він може уражувати квіти, пагони, листя, бруньки та нестигли плоди. Саме ураження нестиглих плодів є основною причиною економічних збитків що спричинені даним збудником. За вологих умов навколишнього середовища при проникненні у середину до тканин горіху волоського *X. arboricola* pv. *juglandis* може бути втрачено до 80% врожаю. Ряд економічних наслідків що також можуть виникати при проникненні збудника у тканини горіху волоського це: зниження якості та товарного вигляду плодів; зниження продуктивності садів; збільшення витрат на посадковий матеріал, оскільки необхідно уникати контамінованого і частково замінювати вже уражені насадження.

Симптоми. Ознаки інфекції на листі виглядають як напівпрозорі, ніби змочені водою ділянки, які з часом стають некротичними. Ураження часто оточені жовто-зеленим ореолом, мають круглу форму, але розширюються до кутастих плям. Листя може набувати скрученого вигляду. На пізніх стадіях бактерія може проникати в судини. Хвороба також може з'являється на чоловічих пиляках (сережках) після їх квітнення навесні. На пагонах також можуть з'являтися чорні некротичні плями, що призводить до відмирання верхівки пагону згодом. У розсадниках хвороба часто вражає кінчики пагонів, спричиняючи відмирання бруньок і тим самим знищуючи майбутній врожай [3]. На плодах з'являються чорні маслянисті плями. Некротичні ураження можуть охоплювати різні тканини плоду: шкірку, мезокарпій, ендокарпій та ядро. Горіхи, уражені до затвердіння шкаралупи, зазвичай зморщуються, тоді як після затвердіння ураження є поверхневими. Багато плодів

горіха опадає передчасно, але шкаралупа і ядро зрілих чорніє і піддається некрозу [1].

Біологія та екологія збудника. *X. arboricola* pv. *juglandis* може витримувати висихання ексудату протягом декількох тижнів, оскільки представники даного роду є полісахарид синтезуючими, що дозволяє їм виживати певний період за несприятливих умов навколишнього середовища. Натомість, вплив прямих сонячних променів спричиняє їх загибель. Хвороба вражає переважно паренхіматозні тканини [17]. Пилок, який поширюється вітром, також може бути джерелом захворювання. Деревя горіха волоського сприйнятливі до збудника бактеріального опіка від початку цвітіння до майже повної зрілості плодів. Вміст ендогенних фенольних сполук у плодах волоського горіха корелює з тяжкістю їх ураження патогеном. Загалом як вже зазначалося у світовій селекції домінує напрям з виведення сортів горіху волоського зі зниженим вмістом алкалоїдних, фенольних, дубильних сполук що є природним бар'єром для розповсюдження збудників різної етіології. Основними вхідними воротами для проникнення даного збудника у тканини рослини господаря є агротехнічні заходи (щеплення, обрізка) і живі переносники, такі як кліщі або комахи. Також, міжрегіональна, національна і континентальна торгівля садивним матеріалом відіграє важливу роль у поширенні фітопатогенних бактерій на великі відстані. *X. arboricola* pv. *juglandis*, здатен інфікувати плоди горіха, а отже, може бути розповсюджений у нові регіони через імпорт. З усіх цих способів розповсюдження шлях пов'язаний з міжнародною торгівлею інфікованим садивним матеріалом є найбільш серйозною проблемою [16]. Ситуація ускладнюється тим що збудник може перебувати у непатогенному стані певний період. Слід також наголосити що згідно даних літератури даний вид є гетерогенним за стійкістю штамів до мідьвмісних

препаратів. Зокрема, за даними літератури, відсоток штамів *X. arboricola* pv. *juglandis* стійких до мідьвмісних препаратів у популяції є доволі високим, що також є обмежуючим чинником для запобігання розповсюдження бактеріального опіку горіха [18].

Сприятливі для розвитку збудника умови.

Бактеріальний опік волоського горіха з'являється в умовах високої вологості, тоді як температура не має на розвиток даного захворювання значного впливу. Зараження відбувається за температури від 4 до 30° С для листя і від 5 до 27° С для плодів. У польових умовах інкубаційний період зазвичай становить від 10 до 15 днів. Відомо що даний збудник може існувати певний час у сапрофітному стані і за настання сприятливих умов бактерії можуть переходити від сапрофітного до паразитичного способу життя і проникати через природні отвори і пори. Вони також можуть потрапляти в рослини через рани, спричинені як природними, так і штучними чинниками. Найчастіше розвиток хвороби спостерігається під час вегетативного росту навесні, особливо якщо даний період є дощовим. Крім того, збудник *X. arboricola* pv. *juglandis* здатен проникати у опале листя, в якому може перезимувати і повторно інфікувати вегетативні органи горіху волоського навесні [1].

1.2. Бактеріальний рак коренів

Синоніми хвороби: кореневий рак

Збудник хвороби: *Agrobacterium tumefaciens* (E. Smith, et Towns.) Conn.

Інші наукові назви: *Agrobacterium radiobacter* subsp. *tumefaciens*, (Beijerinck & van Delden) Conn, *Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* (Beijerinck & van Delden) Conn, *Alcaligenes radiobacter* (Beijerinck & van Delden) Conn. **Домен:** Bacteria; **Филум:** *Proteobacteria*;

Клас: *Alphaproteobacteria*; **Порядок:** *Rhizobiales*;
Родина: *Rhizobiaceae*; **Рід:** *Agrobacterium*

Історія відкриття. Гали на рослинах вперше були описані Malpighi у 1679 році, який вважав, що цей надзвичайний ріст виникає спонтанно. Збудник пухлиноутворення був вперше описаний Смітом (*Smith*) і Таунсендом (*Townsend*) під назвою *Bacterium tumefaciens* (від *tumor* — «пухлина» і *facere* — «робити, діяти»). У 1942 році Конн (*Conn*) рекласифікував його під назвою *Agrobacterium tumefaciens*. На сьогодні рід *Agrobacterium* об'єднує у своєму складі близько 20 видів з яких понад 60% є патогенами рослин (додаток 2). Типовим видом даного роду є *Agrobacterium tumefaciens*. Після того, як цю бактерію було визнано причиною хвороби корончастих галлів, постало питання щодо механізму, за допомогою якого вона викликає пухлини на різних рослинах. Процес пухлиноутворення пов'язаний з перенесенням Т-ДНК в геном рослини з подальшою його трансформацією. Знання, отримані в результаті цих досліджень, відкрили вченим багато шляхів для вивчення схожих механізмів патогенезу як у рослин, так і у тварин. Ці відкриття також сприяли розвитку генної інженерії для якої саме вид *A. tumefaciens* став ключовим об'єктом досліджень [19].

Розповсюдження. В даний час бактеріальний рак коренів розповсюджений по всьому світу. За даним ЕРРО він є регульованим не карантинним організмом для країн Євразії та Великобританії а також для Єгипту. У Бахреїні та Йорданії є карантинним об'єктом і внесений до списку А2 [16].

Шкодочинність. Як відомо, *A. tumefaciens* є класичним поліфагом і здатний уражувати широке коло рослин господарів [20]. Існує понад 650 видів рослин, чутливих до даного збудника. Найчастіше він індукує пухлино утворення винограду, фруктових і горіхових дерев, ягідних культур, а також окремих лісових культур.

Зараження кореневої системи відбувається через ґрунт, що може слугувати резерватом даного збудника. Проникнення збудника відбувається через пошкодження кореневої системи гризунами, комахами, а також під час пересадження при підрізанні дерев не дезінфікованими інструментами. У результаті хвороби може відмирати частина кореневої системи, порушується водопостачання дерев, знижується їх морозостійкість. Все це послаблює рослини, пригнічує їх ріст, призводить до загибелі. В економічному плані *A. tumefaciens* є серйозним патогеном волоських горіхів, виноградної лози, кісточкових, цукрових буряків тощо. Пухлиноутворення, спричинені хворобою, є незворотнім процесом що робить даного збудника особливо небезпечним для багаторічних культур [21].

Основними шляхами для запобігання розповсюдження *A. tumefaciens* є фумігація ґрунту, фітосанітарія та біоконтроль. Незважаючи на те, що в окремих випадках ці заходи були успішними в боротьбі із бактеріальним раком вони не завжди забезпечують послідовний та ефективний контроль захворюваності багатьох культур, включаючи горіх. Деякі дослідники зазначають що розвиток генетичної стійкості плодових і горіхоплідних культур може бути необхідним доповненням до існуючих заходів боротьби з бактеріальним раком.

Симптоми. У заражених рослин зазвичай утворюються пухлини на коренях і стеблах, а також кореневій системі. Гали зазвичай виникають на стрижневих і бічних коренях і надземній частині стебел. Зазвичай гали розвиваються швидко, утворюючи більш-менш сферичні пухлини від білого до коричневого кольору. Надземні гали на трав'янистих рослинах можуть бути зеленими, залежно від вмісту хлоропластів. Текстура пухлини варіює від м'якої та губчастої в ранньому періоді формування до твердої з часом. Взимку в помірних зонах надземні гали часто стають

некротизованими, чорними і сухими впродовж зими. Нарости спричинені збудником кореневого раку частіше за все зберігаються протягом року і згодом руйнуються за дії інших мікроорганізмів. Навесні на місці старої пухлини з'являються нові.

Біологія та екологія збудника. *A. tumefaciens* може вільно знаходитись в ґрунті або паразитувати всередині рослини. Патоген заражає рослини зазвичай через поверхневі пошкодження. Бактерія рухається до фенольних сполук, які виділяються з них. Потрапивши в рослину-хазяїна, вона вводить у неї ділянку своєї ДНК, яка називається Т-ДНК, яка походить від її Ті-плазмід. Потім Т-ДНК інтегрується в геном рослини і спочатку направляє рослинні клітини на вироблення ауксинів і цитокінінів, що призводить до проліферації тканин та утворення видимих пухлин [23]. Потім Т-ДНК використовує рослинну клітину для виробництва опінів, які *A. tumefaciens* використовує як джерело енергії. Оскільки небагато інших організмів можуть використовувати опіни як джерело енергії, *A. tumefaciens* створює для себе сприятливі умови всередині пухлини [21].

Сприятливі для розвитку збудника умови. У помірних зонах симптоми з'являються з настанням теплих температур у травні або червні і можуть швидко прогресувати. Гали вперше з'являються у вигляді невеликих наростів протягом 2-4 тижнів після зараження, коли температура становить або перевищує 20° С. За умов високих літніх температур це 1-2 місяці.

1.3. Плямистість листя горіха волоського

Синоніми хвороби Бактеріальний рак кісточкових

Збудник хвороби: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
van Hall 1902

Інші наукові назви *Phytomonas vignae* (Gardner & Kendrick) Karassilnikov, *Pseudomonas holci* Kendrick, *Pseudomonas japonica* Loehnis & Hansen, *Pseudomonas medicaginis*, Sackett, *Pseudomonas striafaciens* var. *japonica*; **домен:** Bacteria; **Филум:** Proteobacteria; **Клас:** Gammaproteobacteria; **Порядок:** Pseudomonadales; **Родина:** Pseudomonadaceae; **Рід:** *Pseudomonas*

Історія відкриття. Згідно сучасної таксономії рід *Pseudomonas* містить понад 140 видів, більшість з яких сапрофіти. Фітопатогенні псевдомонади – це дуже різноманітна група бактерій з огляду на їх генетику, екологію та типи захворювань, що вони викликають [23], (додаток 3). Група споріднених з *Pseudomonas syringae* бактерій включає 15 визнаних видів і понад 60 патоварів [15.] (додаток 3). Вид *P. syringae* був вперше виділений у 1902 році з хворого бузку (*Syringa vulgaris*). Саме тому бактерія отримала видову назву *syringae*. Спочатку кожен штам класифікували як окремий вид, але пізніше вчені виявляли спільне серед штамів, що врешті-решт призвело до їх об'єднання в один вид. Як вже зазначалося раніше ураження горіху волоського спричинене *P. syringae* pv. *syringae* описане вперше у 2016 році у Ірані [5].

Поширення. *P. syringae* pv. *syringae* зустрічається в багатьох регіонах з різними кліматичними умовами. Незважаючи на значне розповсюдження і шкодочинність даний збудник є карантинним об'єктом лише для окремих країн світу. Зокрема у Йорданії він внесений до списку карантинних об'єктів (список А₂) у Мексиці він також є карантинним об'єктом. Натомість для країн Євросоюзу, Великобританії та Єгипту він лише регульований не карантинний організм. *P. syringae* pv. *syringae* зустрічається в різних еконішах по всьому світу. Патоген передається і поширюється через живі рослини та вегетативний матеріал для розмноження, а також з дощем. Збудник може бути виділений зі зовні здорових

рослин без видимих симптомів хвороби протягом декількох років, що вказує на його здатність перебувати у епіфітній фазі. *P. syringae* pv. *syringae* є класичним поліфагом, що уражує широке коло рослин господарів [16].

Шкодочинність. *P. syringae* pv. *syringae* є особливою бактерією що може викликати різні типи захворювань у широкого кола рослин господарів в зв'язку з чим обсяги збитків спричинені цим мікроорганізмом оцінити вкрай важко. Крім того збитки можуть бути спричинені прямим ураженням рослин (некроз, пухлино утворення, плямистість) або здатністю синтезувати білок *INA* (англ. *ice nucleation active*), що синтезується на зовні клітинної стінки і слугує ядром для утворення кристалів льоду. У такому випадку зниження врожайності відбувається внаслідок обмерзання або загибелі квіток, пагонів та гілок [21].

Симптоми. Перші уражені дерева помічають наприкінці зими або на початку весни. Симптоми, спричинені *P. syringae* pv. *syringae*, включають знебарвлені або некротичні плями на різних органах багатьох рослин та відмирання пагонів. Перші симптоми з'являються на нижньому боці листків у вигляді невеликих, наче змочених водою плям. Плями збільшуються, зливаються і утворюють більші ділянки, які згодом стають некротичними. У плодових культур гілочки, квітки та плоди також можуть бути уражені. На горіху волоському *P. syringae* pv. *syringae* спричиняє виключно плямистість листя, але враховуючи її екологічну пластичність і здатність перебувати у епіфітному стані спектр симптомів уражень спричиненні даним збудником може значно розширитися найближчим часом.

Біологічні властивості. Більшість штамів виду *P. syringae* pv. *syringae* живуть на поверхні листя, з якого отримують необхідні поживні речовини. Однак ці

бактерії не обмежуються лише паразитичним способом життя. Вони можуть виживати і як сапрофіти, при цьому живлячись готовими органічними сполуками, коли умови навколишнього середовища не є сприятливими для патогенного способу життя. Як відомо *P. syringae* pv. *syringae* здатен синтезувати прямі та опосередковані фактори патогенності. Зокрема одними з ключових факторів патогенності є їх здатність синтезувати токсини. Так даний вид продукує два ліпопептидні токсини - сирингоміцин і сирингопептин, які утворюють пори в плазматичних мембранах, викликають пасивні трансмембранні потоки і як результат порушують транспорт речовин у клітину. Обидва токсини закривають пори і мають властивості біосурфактантів [24, 25]. Крім того, як вже зазначалося раніше, *P. syringae* pv. *syringae* синтезує екзогенний білок *INA* що слугує ядром для утворення кристалів льоду які додатково можуть пошкоджувати рослинні тканини. Даний вид також здатен до над синтезу окремих класів фітогормонів зокрема індольної природи, що може призвести до розбалансування систем росту і розвитку рослин, а значить і слугує додатковим фактором патогенності [26].

Сприятливі для розвитку умови. Патоген, як правило, завдає великих збитків у прохолодних вологих умовах і дощових умовах. Опади є важливим компонентом його здатності виживати і поширюватись на нових хазяїв. У спекотну суху погоду популяції патогену часто різко зменшуються у чисельності [21].

2. БАКТЕРІАЛЬНІ ХВОРОБИ ЕУСТОМИ

2.1. Гниль кореня (мокра бактеріальна гниль, шийкова гниль)

Збудник хвороби - *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993.

Інші наукові назви *Pseudomonas antimicrobica* (Attafuah and Bradbury 1990), *Pseudomonas gladioli* Severini 1913 (Approved Lists 1980) та *Pseudomonas marginata* (McCulloch) Stapp 1928; **домен:** *Bacteria*; **Філум:** *Pseudomonadota*; **Клас:** *Betaproteobacteria*; **Порядок:** *Burkholderiales*; **Родина:** *Burkholderiaceae*; **Рід:** *Burkholderia*.

Перші відомості про визначення цього патогена на еустомі з'явилися у 2002р. у штаті Флорида [27].

Поширення. *B. gladioli* поширена в багатьох країнах світу (Японія, США, Нідерланди тощо), але в деяких країнах цього фітопатогена віднесено до карантинних об'єктів: Єгипет, Мексика, Китай – список А1 з 2018 року, Йорданія – список А2, і в Європі – до списку регульованих некарантинних патогенних організмів [28].

Шкодочинність. Цей вид має чотири патовари: *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli* pv. *alliicola*, *B. gladioli* pv. *agaricicola* та *B. gladioli* pv. *cocovenerans*. *B. gladioli* здатна викликати хвороби в ряді видів рослин, таких як гладіолуси, іриси, орхідеї, еустома, морква, цибуля, рис, кукурудза та їстівні гриби. Також деякі штами можуть бути умовно патогенними для людини та тварин.

Симптоми. Характерною ознакою є такі симптоми, як гниль біля основи стебла, на листках викликає пожовтіння, знебарвлення або жовто-коричневий некроз жилок листка, а також в'янення рослини.

Патоген може вражати насіння та рослини різного віку, починаючи від маленьких саджанців і закінчуючи квітучими рослинами, і спричиняє некрози жилок на листках, гниль стрижневого кореня, крони та стебла, а також в'янення та загибель. Бактерії заселяють судинну

систему рослини, що призводить до в'янення та відмирання через порушення циркуляції води. Ці бактерії можна знайти в ґрунті. Вони також зберігаються в рослинних рештках. Можуть поширюватися через насіння, забруднену воду, повітря та через комах. Хвороба частіше розвивається при сприятливих умовах, включаючи високу вологість і температуру [29].

Біологічні властивості. За біологічними властивостями це грам-негативна паличкоподібна бактерія із злегка зігнутими кінцями, може мати один або кілька джгутиків розташованих полярно. Вона є аеробом, має позитивну реакцію на каталазу, уреазу, не утворює спори. Здатна ферментувати желатин, але не крохмаль, ферментує галактозу, глюкозу, фруктозу, манозу та манітол, оксидазо варіабельна [29, 30].

Сприятливі для розвитку умови. *B. gladioli* може рости в діапазоні температур від +4° до +41° С, розповсюдженню сприяють теплі температури 28°С і вище.

2.2. Бактеріальне в'янення та розтріскування стебла.

Збудник хвороби - *Trinickia caryophylli* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993.

Інші наукові назви: *Paraburkholderia caryophylli* (Burkholder 1942) Sawana et al. 2015, *Burkholderia caryophylli* (Burkholder 1942) Yabuuchi et al. 1993, *Pseudomonas caryophylli* (Burkholder 1942) Starr and Burkholder 1942 (Approved Lists 1980) та "*Phytomonas caryophylli*" Burkholder 1942.

Домен: *Bacteria*; **Филум:** *Pseudomonadota*; **Клас:** *Betaproteobacteria*; **Порядок:** *Burkholderiales*; **Родина:** *Burkholderiaceae*; **Рід:** *Trinickia*.

Розповсюдження. *T. caryophylli* належить до фітопатогенів, які відсутні на території України, і занесений у карантинний список А1 в Україні з 2019

року [31, 32]. Цей фітопатоген, крім еустоми уражує такі рослини, як: гвоздика (основна рослина-хазяїн), соняшник [33], керемек виїмчастий та лешиця волотиста [34, 35, 36]. Він обмежено поширений на території Європейського союзу та включений у перелік A2 (обмежено поширені збудники) Європейської та середземноморської організації з карантину і захисту рослин (EPPO) [36, 37].

Симптоми. Основними симптомами є в'янення бічних пагонів та всієї рослини, розтріскування стебел і утворення глибоких виразок, особливо на нижніх міжвузлях. А також виділення ексудату жовтуватокоричневого кольору [39]. Збудник спричинює скручування молодих листочків, пізніше рослини набувають сіро-зеленого забарвлення з подальшим жовтінням, що зазвичай супроводжується в'яненням рослин та іноді гниттям коріння [36]. Коріння інфікованої рослини часто загниває, рослина легко видаляється з ґрунту. На повздовжньому розрізі кореня спостерігається чітко окреслені бурі плями, за якими можна відрізнити це захворювання від фітофторозу коренів [31].

Біологічні властивості. *T. caryophylli* є грамнегативна, аспорогенна, аеробна бактерія, яка має прямі або злегка вигнуті паличкоподібні клітини із закругленими кінцями. Ці клітини можна знайти окремо або парами і мають здатність рухатися. Даний мікроорганізм є оксидазо-негативним, не утворює H_2S , але має здатність відновлювати нітрати, не утилізує лізин. Однією з примітних фізіологічних характеристик цієї бактерії є її здатність зброджувати різні речовини, включаючи глюкозу, інозит, аргінін, ксилозу, рибозу, рамнозу та судан [38, 39, 40, 41].

Сприятливі для розвитку умови. Однією з небезпечних особливостей *T. caryophylli*, є те що вона досить жаро- та холодостійка бактерія (здатна активно

уражувати рослини в температурному діапазоні 17-33° С) та може зимувати в ризосфері за тісної взаємодії з рослиною-господарем й виживати в рослинних рештках у ґрунті. При чому, симптоми в'янення виявляються частіше у рослин, вирощуваних при високих температурах (> 30 °С), тоді як відсутність симптомів або лише симптоми розтріскування стебла частіше зустрічаються при більш низьких температурах (<20 °С). Коли температура ґрунту нижче 17° С, відбувається швидке розмноження клітин та закупорення навколо ксилеми та флоєми [42].

2.3. Бактеріальний в'ялт.

Збудник хвороби - *Ralstonia solanacearum* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993.

Інші наукові назви: *Burkholderia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1993, "*Bacillus solanacearum*" Smith 1896 та *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1896) Smith 1914 (Approved Lists 1980).

Домен: *Bacteria*; **Филум:** *Pseudomonadota*; **Клас:** *Betaproteobacteria*; **Порядок:** *Burkholderiales*; **Родина:** *Burkholderiaceae*; **Рід:** *Ralstonia*.

Поширення. *R. solanacearum* є поліфагом широкого кола рослин: картопля, соняшник, бобові, томати, перець, еустома тощо. Цей фітопатоген також відноситься до карантинних списків А1 та А2 в багатьох країнах світу: Африка, Китай, Іран, Україна, Сербія, Швейцарія – карантинний список А1, Великобританія, Грузія, ЄС, СОКЗР, Іран, Аргентина, Бразилія – список А2 [43 [5].]

Шкодочинність. *R. solanacearum* зазвичай потрапляє в рослину через коріння, а потім поширюється по судинній системі, зрештою викликаючи в'янення, блокуючи потік води. Бактерія здатна виживати в ґрунті та рослинних рештках протягом тривалого періоду часу, що ускладнює її ліквідацію після встановлення. Інфекція також може поширюватися через воду, інструменти,

грунт та інфікований рослинний матеріал, наприклад живці та насіння. Переміщення інфікованого матеріалу, навіть якщо рослини не виявляють симптомів, а також перенесення ґрунту чи води може призвести до розповсюдження збудника на великі відстані.

Симптоми. Характерними симптомами цієї хвороби є в'янення нижнього листа, а потім і всієї рослини, з подальшим побурінням листа та загибеллю рослини [27].

Біологічні властивості. За біологічними властивостями це короткі прямі грам-негативні палички, які здатні утилізувати глюкозу, декстрозу, цукрозу та лактозу, але не гідролізувати крохмаль. Також бактерія не утворює H_2S та не розкладає целюлозу. *Ralstonia solanacearum* може знаходитися в ґрунті та вражати широкий спектр рослин, що призводить до стана, відомого як бактеріальне в'янення.

Сприятливі для розвитку умови. Бактерія гарно розмножується в теплих і вологих умовах, що сприяє її поширенню та вираженості симптомів захворювання. У рослин лізіантуса симптоми в'янення *Ralstonia* включають в'янення нижнього листа, яке потім прогресує і вражає всю рослину. Листя може побуріти, і рослина може з часом загинути. При дослідженні поперечного зрізу зараженого стебла можна спостерігати виразне коричневе забарвлення кортикальної тканини. Заражені стебла також можуть відчуватися порожнистими при натисканні через руйнування внутрішніх тканин [44, 45].

2.4. Бактеріальні плямистості

Домен: *Bacteria*; **Филум:** *Proteobacteria*; **Клас:** *Gamma proteobacteria*; **Порядок:** *Pseudomonadales*; **Родина:** *Pseudomonadaceae*; **Рід:** *Pseudomonas*

При зараженні рослин еустоми *Pseudomonas sp.* виявляються різноманітні симптоми. Ці симптоми можуть охоплювати зміну забарвлення листків і квіток на

жовті або коричневі, появу водяних плям на листках, відпадання квітів і листя, згорблення стебел, зменшення росту рослин, гнилий запах, а також утворення слизової рідини на листках та квітках. Варто відзначити, що симптоми можуть проявлятися у різних комбінаціях і залежать від виду *Pseudomonas sp.*, що заражає рослину [46].

3. ВИДІЛЕННЯ БАКТЕРІЙ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ.

Базовими властивостями для дослідження будь-яких патогенних для рослин мікроорганізмів є вивчення їх патогенних властивостей. Зокрема визначення характеру ураження рослини господаря, агресивності штамів і кола уражуваних рослин.

Ізолювання збудників у чисту культуру. Аналіз відібраних зразків уражених надземних органів рослин (листя, нестигли плоди) здійснювали наступним чином: шматочки ураженої тканини промивали у струмені водогінної води. Зразок розтирали у ступці в краплі стерильної водогінної води та висівали на пластинки картопляного агару (КА) з наступним інкубуванням при 27⁰ С протягом 5 діб. Колонії, що вирости, описували. Виділення бактерій з гілок і коріння здійснювали як методом обростання так і зазначеним вище способом.

Перевірка агресивності штамів. Агресивність штамів перевіряли шляхом штучного інфікування гілок та нестиглих плодів горіху волоського. Для штучного ураження використовували суспензію одnodобових бактерій титром 10⁷–10⁹ кл/мл. Контролем слугувала стерильна водогінна вода. Облік агресивності штамів здійснювали на 7–10-у добу після інфікування за загальноприйнятою 5-бальною шкалою. Штучне інфікування здійснювали у лабораторних умовах з наступним знезараженням рослинного матеріалу.

Агресивність пухлин індукуючих штамів перевіряли на експлантах моркви, картоплі і рослинах каланхое у лабораторних умовах. Для цього використовували суспензію одностодових бактерій титром 10^7 – 10^9 кл/мл. Контролем слугувала стерильна водогінна вода. Облік агресивності штамів здійснювали на 14-28 добу після інфікування за загальноприйнятою 5-бальною шкалою. Повторюваність дослідів 4-х кратна (табл.1).

Таблиця 1. Патогенні властивості ізольованих та колекційних штамів патогенних для горіха ВОЛОСЬКОГО

Патогенні властивості	<i>Pseudomonas</i> spp. ізольовані штами	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> В1027 ^Г	<i>Xanthomonas</i> sp. ізольовані штами	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> колекційні штами 8665-8865	<i>Agrobacterium</i> spp. ізольовані штами	<i>A. tumefaciens</i> колекційні штами 8466-8933 ^Г
Пухлиноутворення на експлантах моркви та картоплі	-	-	-	-	+	+
Реакція надчутливості на листі тютюну (РНЧ)	+	+	-	-	-	-
Реакція надчутливості на кінських бобах	+	+	+	+	-	-
Здатність уражувати листя, гілки, плоди волоського горіха	+	+	+	+	-	-

Примітка: «-» - позитивна реакція; «+» - негативна реакція.

Реакція надчутливості ізольованих штамів, проводили шляхом штучного інфікування листя тютюну. Результати реакції (поява некротичних уражень) спостерігали через 24 годин після інокуляції, що є характерним для бактерій роду *Pseudomonas*. Ця реакція є захисною реакцією рослини проти патогену, що характеризується місцевою запрограмованою смертю клітин у місці інфікування [47]. Найбільш поширеною методикою є інокуляція бактеріальної суспензії у листок тютюну із нижньої сторони між жилками за допомогою інсулінового шприця. Для контролю використовують стерильну водогінну воду [48].

Результати аналізу патогенних властивостей штамів бактерій, патогенних для волоського горіха, зображені у таблиці нижче (табл. 1, додаток 4, рис. 1.e). Ілюстративний матеріал з симптомами штучного інфікування рослини господаря і індикаторних рослин наведені у додатках (додаток 4, рис. 1 а-д). Штучне зараження еustomи має певні тонкощі, оскільки, як відомо усі три збудника бактеріальних хвороб еustomи (*Burkholderia gladioli*, *Trinickia caryophylli*, *Ralstonia solanacearum*) можуть знаходитись в латентній фазі деякий час, тому після штучного ураження рослин прояв симптомів ураження рослин спостерігають від 7 до 30 діб. Оскільки потенційно одним із виділених ізолятів може бути *T. caryophylli*, яка також уражує керемек, то проводили зараження і цієї рослини (табл. 5, додаток 6, рис. 2, 3).

Як видно з таблиці 2 всі ізоляти були високоагресивні до рослин еustomи. Штами 1E та 1E* також виявляли середню агресивність до керемек, що наближає їх до подібності із *Trinickia caryophylli*, але *Burkholderia gladioli* є поліфаг, що теж може теоретично може уражувати і керемек, хоча в літературі таких відомостей не було знайдено.

Таблиця 2. Визначення вірулентних властивостей ізольованих з еустоми штамів бактерій

Штам	Агресивність, бали		РНЧ
	Еустома	Кермек	
1E	4	2	-/+*
1E*	4	2	-/+*
9E	3-4	0-1	-/+*

Примітка: оцінювання агресивності штамів здійснювали за 5-ти бальною шкалою, де 0 – відсутність агресивності; 1-2 – слабо агресивний; 2-3 – середньо агресивний; 3-4 – високо агресивні; «*» - неспецифічна реакція на 7-му добу.

Щодо РНЧ на тютюні, то переважна більшість фітопатогенних представників роду *Pseudomonas* на 1-2гу добу дає класичну реакцію на тютюні. Усі ж наші штами дали неспецифічну реакцію на 7-й день. Таку реакцію не прийнято вважати «позитивною».

4. МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ І ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПАТОГЕННИХ ДЛЯ ГОРІХУ ВОЛОСЬКОГО ТА ЕУСТОМИ БАКТЕРІЙ.

Культуральні та фізіологічні властивості штамів ізольованих з горіху волоського і еустоми вивчали загально прийнятими методами [4, 43, 49]. *Морфологію клітин та колоній* описували за ростом на КА. Визначали колір, форму, консистенцію колоній та забарвлення клітин за Грамом. *Культуральні та біохімічні властивості вивчали* за характером росту на стерильному м'ясопептонному бульйоні (МПБ), молоці та желатині. *Протеоліз на середовищі з желатином* визначали за його розрідженням. *Коагуляцію молока* вивчали після росту бактерій протягом 30 діб. Якщо після

цього терміну молоко візуально не змінювалось, його стан визначали після підігріву. **Здатність розщеплювати білок та пептон до індолу** визначали методом Мореллі за допомогою смужок фільтрувального паперу, змоченого насиченим розчином щавлевої кислоти. За наявності індолу у середовищі кінчики паперу рожевіли. Для виявлення сірководню папірці змочували насиченим розчином оцтово-кислого свинцю. Про виділення сірководню свідчило почорніння смужок паперу. **Редуцію нітратів до нітритів** виявляли за допомогою додавання реактиву Грісса до бактеріальної культури, вирощеної на МПБ, який містив 0,1% азотнокислого калію. Почервоніння бактеріальної маси свідчило про здатність бактерій редукувати нітрати до нітритів. **Оксидазну активність** визначали методом N. Kovacs [49]. Для цього клітини досліджуваних бактерій наносили на фільтрувальний папір, змочений 1%-м розчином N,N-диметил-П-фенілен-діаміносульфату. Через 5-10 секунд оксидазопозитивні бактерії забарвлювались в темно-червоний колір. **Каталазну активність** у бактерій вивчали за допомогою 10%-го перекису водню. Однодобову культуру розтирали на склі і додавали по одній краплині розчину перекису водню. Поява пухирців газу свідчила про наявність каталази.

Для визначання леван синтезуючої здатності штамів ізольованих з еустоми використовують поживне середовище МПА із додаванням 5% сахарози. За наявності левану та продукції цього полісахариду бактеріальні колонії виглядають більшими у розмірах та мають слизисту консистенцію на відміну від нормальних умов та росту на іншому середовищі без сахарози. Деякі види псевдомонад можуть давати також пігмент, наприклад, атипова *Pseudomonas viridiflava* яка має жовтий пігмент [25]. Для визначення флюоресценції з метою попереднього відокремлення бактерій роду *Pseudomonas* використовували середовище МПА або Кінг

Б (пептон-20 г/л; гліцерин-10 г/л; K_2HPO_4 -1,5 г/л; $MgSO_4$ x $7H_2O$ -1,5 г/л; Агар-агар-15 г/л; рН 7,2).

Визначення флюоресценції. Для попереднього відокремлення бактерій роду *Pseudomonas* часто використовують тест на здатність до флюоресценції. Для цього використовують середовища МПА або Кінг Б, інкубують протягом 24-48 годин і дивляться при УФ світлі (366 нм). Склад середовища Кінг Б: пептон - 20 г/л, гліцерин – 10 г/л, K_2HPO_4 – 1,5 г/л, $MgSO_4$ x $7H_2O$ – 1,5 г/л, агар-агар - 15 г/л, рН 7,2.

В цьому та подальших дослідженнях для штамів ізольованих з рослин еустоми використовували в якості тест-культури для штаму 9E - *Pseudomonas fluorescens* IMB В-8573, взятого із Української Колекції Мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, відділ фітопатогенних бактерій. Для штамів 1E та 1E* – використовували літературні данні (Bergey's Manual, 2010 та on-line бібліотека «REGNUM PROKARYOTAE» [31, 50].

Так, за результатами визначення здатності до флюоресценції штами 1E та 1E* не проявляли такої властивості, а штами 9E та *P. fluorescens* IMB В-8573 – виявляли флюоресценцію із блакитним відтінком (табл.3).

Усі штами виділені з еустоми є грам-негативними, рухливими аспорогенними паличками (табл. 3). Колонії штамів 1E та 1E* округлі, гладкі та блискучі з рівними краями: спочатку світло кремового кольору, з часом колонії темнішають. Штам 9 E утворював молочно-білі, круглі, плоскі, блискучі з рівним прозорим, слабохвилястим краєм колонії. Також штам 9E виявляв здатність до сильної флюоресценції, що вказує на його відношення до *Pseudomonas* sp., а позитивна оксидаза дозволяє зробити припущення, що цей штам може відноситись до *Pseudomonas fluorescens*, хоча раніше в

літературі ніде не зустрічається *P. fluorescens*, як збудник хвороб на еустомі.

Таблиця 3. Визначення морфолого-культуральних та фізіологічних властивостей

Морфолого-культуральні властивості	Штами з еустоми			Колекційний штам	Літературні дані**	
	1E	1E*	9E	<i>P. fluorescens</i> 8573	<i>T. caryophylli</i>	<i>B. gladioli</i>
Флуоресценція на середовищі Кінг Б	-	-	+	+	-	-
Рухливість	+	+	+	+	+	+
Тип клітинної стінки	гр-***	гр-	гр-	гр-	гр-	гр-
Оксидаза	-	-	+	+	-	d
Продуктування левану	-	-	+	+	-	-
Здатність рости при 41°C	+	+	-	-	+	+

Примітки: «+» - наявність ознаки, «-» - відсутність ознаки; «d» - варіабельність ознаки; «**» - літературні дані; «***» - негативне забарвлення за Грамом

ЛОРАТ-тести використовують для диференціації фітопатогенних псевдомонад. Тест складається із: визначення продукції левану, оксидази, пектинолітичної, аргініндігідролазної активностей і реакцій надчутливості на тютюні [51]. Продуктування левану та визначення оксидазної активності детально описано вище. **Пектинолітичну активність** визначають методом точкового нанесення або у вигляді маленького хрестика бактеріальної культури на шматочки картоплі. Картоплю

попередньо очищують та стерилізують, а після нанесення бактеріальної культури інкубують протягом доби. Утворення чорних плям, що нагадують гниль у місяцях нанесення, є позитивною реакцією на тест. **Аргініндигідролазна активність** характеризується наявністю аргінін декарбоксилази (або ж дигідроллази) та використання аргініну в якості джерела Карбону. Такий тест проводиться за допомогою аргініндигідроллазного бульйону із глюкозою. У пробірці розливають бульйон із барвником, що змінює забарвлення при змінах рН, вносять бактеріальну культуру та додають мінеральну олію для створення мікроаерофільних умов. За цією методикою бактерія спочатку проферментує глюкозу і колір змінюється із рожевого на жовтий через зниження рН. Якщо після цього колір з часом змінюється знов на рожевий (тобто рН підвищується знов до нормального або стає ближче до лужних показників), це свідчить про позитивний результат аргініндегідроллазного тесту. Є також методика без додавання глюкози (вдосконалення від Фей та Беррі), де бульйон з самого початку має низький показник рН і при декарбоксилюванні амінокислот колір змінюється з жовтого на рожевий при підлученні середовища (27 Lal, 2015). Окрім цього, декарбоксилювання аргініну та деяких інших амінокислот (лізин та орнітин) можна визначити за допомогою API 20 E/NE тестів. Отримавши усі результати із цих тестів, далі зіставляють схему відповідно до LOPAT та порівнюють із 9 групами за Lelliott (табл. 4). Наприклад, найчисельнішою групою є Ia, яка має схему «+, -, -, -, +» (леван +, оксидаза -, пектинолітична активність -, аргініндигідроллаза -, РНЧ+). Сюди входять усі патовари *P. syringae* та деякі інші псевдомонади (табл.3)

Табл. 4. Групи фітопатогенних псевдомонад за LOPAT-схемою.

Група	L	O	P	A	T	Представники
Ia	+	-	-	-	+	<i>P. antirrhini</i> , <i>P. coronafaciens</i> , <i>P. lachrymana</i> , <i>P. morsprunorum</i> , <i>P. phaseolicola</i> , <i>P. pisi</i> , <i>P. tomato</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. tabaci</i>
Ib	-	-	-	-	+	<i>P. delphinii</i> , <i>P. savastanoi</i> , <i>P. sesami</i>
II	-	-	+	-	+	<i>P. viridiflava</i> , soft rotting <i>pseudomonads</i>
III	-	+	-	-	+	<i>P. cichorii</i> , <i>P. papaveris</i>
IVa	+	+	+	+	-	<i>P. marginalis</i> , <i>P. pastinaceae</i> , soft rotting <i>pseudomonads</i>
IVb	-	+	+	+	-	Soft rotting <i>pseudomonads</i>
Va	-	+	-	+	-	<i>P. tolaasii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i>
Vb	+	+	-	+	-	<i>P. fluorescens</i>

Примітки: «+» - наявність ознаки, «-» - відсутність ознаки.

Оскільки за низкою культурально-морфогічних ознак та особливо флуоресценцією на середовищі Кінг Б штамп 9E подібен до *P. fluorescens*, для нього було проведено LOPAT-тест (табл 5).

Так за результатами LOPAT-тесту можна попередньо віднести штамп 9E до *P. fluorescens* LOPAT-групи Vb. Але для точної ідентифікації потрібно проведення визначення фізіолого-біохімічних властивостей

Таблиця 5. LOPAT-тест для новоізольованого та колекційного штаму *P. fluorescens*

Штам	Тест				
	L	O	P	A	T
9E	+	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> IMB B-8573	+	+	-	+	-

Примітки: L – продукція левану, O – оксидаза, P – мацелування тканини картоплі, A – аргініндегідролаза, T – реакція надчутливості на тютюні, «-» - відсутність ознаки/реакції, «+» - позитивна реакція.

Використання комерційних API-систем. Для ідентифікації за біохімічною активністю, пов'язаною із ферментацією деяких вуглеводів, амінокислот та білків, як експрес-метод використовують стріпи API 20E, 32E та 20NE комерційних тест систем. Даний метод представляє пластинку, в яких знаходяться лунки із середовищами різних джерел вуглецю, амінокислот та білків, за ферментацією яких можна ідентифікувати та порівнювати дослідні бактеріальні культури. **Підготовка стріп-тесту API.** API-тест включає набір стріпів, який надає стандартизовану мініатюрну версію існуючих методів ідентифікації, які до цього часу було складно виконувати та важко читати. В API 20E пластикова смужка вміщує двадцять мінікамер для тестування (у API 32E – відповідно 32 мінікамери), що містять зневоднені середовища з певним хімічним складом для кожного тесту. Зазвичай вони виявляють ферментативну активність, здебільшого пов'язану з ферментацією вуглеводів або метаболізмом білків чи амінокислот інокульованими мікроорганізмами.

API-системи 20E та 32E. Підготовка бактеріальної суспензії та внесення в лунки. В стерильну пробірку додають 5 мл стерильної водогінної води в яку вносять бактеріальну культуру петлею в умовах асептики. Концентрацію бактеріальної суспензії доводять до 10^8

клітин на 1 мл (0,5 МакФарланда). У кожному лунку додають бактеріальну суспензію за допомогою мікропетет-дозатора або автоматичної піпетки. В деякі лунки додаються реактиви, що йдуть у комплекті та мінеральну олію. **Інкубація та спостереження.** Стріпи інкубують в термостаті за температури 28° С (для фітопатогенних бактерій). Облік проводиться на 20-24 годину. Результати оцінюються за наявністю або відсутністю реакції.

API-система 20NE. Це стандартизована система для ідентифікації невибагливих, грамнегативних не ентеропаличок (наприклад, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* та ін.), яка містить 8 звичайних та 12 асиміляційних тестів. Такий тест складається із спеціальної смужки, що має 20 лунок із реагентами, в які інокують бактеріальну суспензію.

Підготовка бактеріальної суспензії та внесення в лунки. Бактеріальну суспензію готують на основі добової культури та розчину NaCl 0,85% об'ємом 2 мл за 0,5 стандартом МакФарланда та вносять у перші 8 лунок для ферментуючих тестів. Для асиміляційних тестів – 200 мкл готової бактеріальної суспензії додають у поживне рідке середовище API AUX Medium (що йде у наборі) та обережно гомогенізують піпеткою, аби уникнути утворення бульбашок, і вносять у наступні 12 лунок. Відповідно до спеціальних позначок (наприклад, підкреслення коду під лункою або код у клітинці) суспензію вносять, заповнюючи лунку частково або повністю, а також в кінці додають мінеральну олію (для тестів ADH, URE та визначення ферментації глюкози).

Інкубація та спостереження. Смужку із заповненими лунками інкубують за 28°С протягом 24 годин (\pm 2 години). Після цього роблять облік результатів, фіксуючи зміни забарвлення у звичайних тестах та появи помутніння у лунках з асиміляційними тестами.

За результатами дослідження морфолого-культуральних властивостей ізолюваних з горіху волоського штамів сформовано три групи штамів споріднених з *A. tumefaciens*, *P. syringae* pv. *syringae* та *X. arboricola* pv. *juglandis*.

Таблиця 5. Фізіолого-біохімічні властивості ізолюваних та колекційних штамів.

Ознака	Штами <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B1027 ^Г	<i>Xanthomonas</i> spp. ізолювані штамми	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> колекційні штамми 8665-8865	Штами <i>Agrobacterium</i> spp.	<i>A. tumefaciens</i> колекційні штамми 8466-8933 ^Г
Фарбування за Грамом	-	-	-	-	-	-
Утворення індолу, H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Утворення оксидази	-	-	-	-	+	+
Рухливість, утворення каталази, коагуляція молока	+	+	+	+	+	+
Відновлення нітратів	+	+	-	-	-	-
Розрідження желатину	+	+	+	+	-	-
Лакмусова сироватка	л	л	л	л	л	л

Примітка: «-» - позитивна реакція; «+» - негативна реакція; «л» - ферментація речовин з утворенням луку.

Штами бактерій що викликають коричневий апікальний некроз та вертикальний виразковий рак волоського горіха та колекційні штамми бактерій виду *X. arboricola* pv. *juglandis* утворюють жовті гладкі, слизові, що з часом можуть ставати дещо шорохуватими колонії.

**Таблиця 6. Фізіолого-біохімічні властивості
ізольованих та колекційних штамів бактерій,
патогенних для волоського горіха**

Реакція/фермент	Штами <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B1027 ^T	Штами <i>Xanthomonas</i> spp.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> колекційні штами 8665-8865	Штами <i>Agrobacterium</i> spp.	<i>A. tumefaciens</i> колекційні штами 8466- 8933 ^T
Утворення, синтез						
β-галактозидаза	-	-	+	+	+	+
Аргінінегідролаза	-	-	-	-	+/-	+/-
Лізінедекарбоксі- лаза, орнітінедекарбоксі- лаза	-	-	-	-	-	-
Уреаза, ацетон	-	-	-	-	+	+
Триптофандезамі- наза	+	+	-	-	+	+
Ферментація цитрату	+	+	-	-	-	-
Ферментація/окислення						
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+
D-манітол, інозитол, D-сорбітол, D- мелобіоза, амідгалін	-	-	-	-	-	-
L-рамноза	-	-	-	-	+/-	+/-
D-сахароза	+	+	-	-	-	-
L-арабіноза	+	+	-	-	+/-	+/-
NO ₂ , продукування N ₂	-	-	-	-	-	-

Примітки: 1. (-) - позитивна реакція; 2. (+) - негативна реакція;

Бактерії що викликають плямистість листя волоського горіха *P. syringae* pv. *syringae* утворюють блакитно-сірі напівпрозорі колонії з рівним або злегка хвилястим краєм. Центр колонії злегка піднятий. Колонії утворюють флуоресцентний пігмент. Грамнегативні, рухливі за рахунок одного або декількох полярних джгутиків. Бактерії що викликають бактеріальний рак коренів горіху волоського *A. tumefaciens* утворюють підняті вологі блискучі кремові колонії з рівними краями. (табл. 5).

Для прискорення ідентифікації збудників фізіолого-біохімічні властивості бактерій досліджували з використанням комерційної тест-системи АРІ 20Е. Детально фізіолого-біохімічні властивості цих груп описані у таблицях наведених нижче (табл. 6).

Результати біохімічних тестів за АРІ 20Е штамів 1Е і 1Е* в більшості тестів співпадають із літературними даними *B. gladioli* (табл. 7). Біохімічні профілі *B. gladioli* та *T. caryophylli* достатньо подібні між собою, але є кілька суттєвих відмінностей, а саме: наявність β -галатозидази, використання L-лізину та розрідження желатини. Штами 1Е і 1Е* повністю співпадають із *B. gladioli* за цими трьома показниками. Але обидва штами мають відмінність по використанню амігдалину і штамоваріабельні по відношенню до L-арабінози

Таблиця 7. Фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних штамів 1E та 1E* за методом API 20 E

Назва тесту	Скорочення у стріпах API-систем	Номер штаму		Літературні данні	
		1E	1E*	<i>B. gladioli</i>	<i>T. caryophylli</i>
β-галатозидаза	ONPG	-	-	-	+
Аргініндегідролаза	ADH	+	+	+	+
L-лізин	LDC	+	+	+	-
L-орнітин	ODC	+	+	+	+
Цитрат	CIT	+	+	+	+
Натрій тіосульфат	H ₂ S	-	-	-	-
Сечовина	URE	-	-	d	н.в.
L-триптофан	TDA	-	-	d	-
Індол	IND	+	+	+	+
Натрій піруват	VP	+	+	+	+
Желатина	GEL	+	+	+	-
D-глюкоза	GLU	+	+	+	+
D-манітол	MAN	+	+	+	+
Інозитол	INO	+	+	н.в.	+
D-сорбітол	SOR	+	+	+	+
L-рамноза	RHA	-	-	-	+
D-сахароза	SAC	+	+	+	d
D-мелобіоза	MEL	-	-	-	-
Амігдалін	AMY	-	+	-	-
L-арабіноза	ARA	-	-	+	+

Примітки: «-» - негативна/відсутність ознаки, «+» - позитивна реакція, «d» - варіабельна ознака, «н.в.» - немає відомостей.

Біохімічні профілі штамів 9E та референтного *P. fluorescens* 8573 повністю співпадають між собою (та з літературними даними), окрім L-триптофану (табл. 8).

Штам 9E виявляв варіабельність по використанню L-триптофану при повторних постановках тесту. Що може пояснюватись особливостями метаболізму бактерії або не точністю API-системи.

Таблиця 8. Фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних штамів 1E та 1E* за методом API 20 E

Назва тесту	Номер штаму		
	Скорочення у стріпах API-систем	9E	<i>P. fluorescens</i> 8573
β-галатозидаза	ONPG	+	+
Аргініндегідролаза	ADH	+	+
L-лізин	LDC	-	-
L-орнітин	ODC	-	-
Цитрат	CIT	+	+
Натрій тіосульфат	H ₂ S	-	-
Сечовина	URE	-	-
L-триптофан	TDA	d	+
Індол	IND	-	-
Піруват	VP	+	+
Желатина	GEL	-	-
D-глюкоза	GLU	+	+
D-манітол	MAN	-	-
Інозитол	INO	-	-
D-сорбітол	SOR	-	-
L-рамноза	RHA	-	-
D-сахароза	SAC	-	-
D-мелобіоза	MEL	-	-
Амігдалін	AMY	-	-
L-арабіноза	ARA	-	-

Примітки: «-» - негативна/відсутність ознаки, «+» - позитивна реакція, «d» - варіабельна ознака.

Оскільки *B. gladioli* та *T. caryophylli* достатньо схожі за біохімічним профілем і відмінності по трьом показникам не достатньо для ідентифікації бактерії, було

використано систему API 32E, яка включає в собі 32 тести (табл. 9).

Таблиця 9. Фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних штамів 1E та 1E* методом API 32E

Назва тесту	Номер штаму		Літературні данні	
	1 E	1 E*	<i>B. gladioli</i>	<i>T.caryophylli</i>
L-орнітин, L-аргінін, D-манітол, D-глюкоза	+	+	+	+
L-лізин	+	+	+	-
Сечовина	-	-	d	н.в.
L-арабітол	-	-	-	+
Галактуронова кислота	-	-	н.в.	н.в.
Калій 5-кетоглюконат	-	-	-	-
5-бромо-3-індоксилінонаноат	+	+	н.в.	н.в.
Піруват	+	+	+	+
4-нітрофеніл β-D-глюкопіранозид	-	-	н.в.	н.в.
D-мальтоза	-	-	d	-
Адонітол	-	-	+	d
Палатиноза	-	-	н.в.	н.в.
4-нітрофеніл β-D-глюкуронид	-	-	н.в.	н.в.
Малонат	-	-	+	-
L-триптофан	-	-	d	-
N-ацетил - глюкозамін	+	+	+	+
β-галатозидаза (4-нітрофеніл-β-D-галактопіранозид)	-	-	-	+
D-сахароза	+	+	+	d
L-арабіноза	-	+	+	+
D-арабітол	-	-	-	+

4-нітрофеніл- α -D-глюкопіранозид	-	-	н.в.	н.в.
α -галатозидаза (4-нітрофеніл- α -D-галактопіранозид)	-	-	н.в.	н.в.
D-трегалоза	-	-	+	-
L-рамноза	-	-	-	+
Інозитол	-	-	н.в.	-
D-целобіоза	-	-	d	d
D-сорбітол	-	-	+	+
4-нітрофеніл- α -D-мальтопіранозид	-	-	н.в.	н.в.
L-аспартат	+	+	н.в.	н.в.

Примітки: «-» - негативна/відсутність ознаки, «+» - позитивна реакція, «d» - варіабельна ознака, «н.в.» - немає відомостей.

Як видно з таблиці 10 штам 9E повністю співпадає із колекційним штамом *P. fluorescens* 8573 та літературними даними. Стосовно штамів 1E і 1E*, то ці штами виявляють гетерогенність за асиміляцією арабінози, і відрізняються від *B. gladioli* за 4-ма ознаками, а саме: використання сорбітолу, треголози, малонату та адонітолу; від *T. caryophylli* – 6-тю ознаками: використання сорбітолу, рамнози, D та L арабітолу та лізину, і відсутністю β -галатозидази. Серед перелічених ознак, головними є використання лізину та відсутність β -галатозидази. Але все одно отримані результати не дають можливості повністю віднести до *B. gladioli* чи *T. caryophylli*, тому було вирішено зробити тестування методом API 20NE (табл. 11), який орієнтований на представників родини *Pseudomonas* та псевдоманадоподібних бактерій, а *B. gladioli* чи *T. caryophylli* раніше відносились до родини *Pseudomonas*.

Таблиця 10. Фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних штаму 9E методом API 32E

Назва тесту	Номер штаму	
	9E	<i>P. fluorescens</i> 8573
L-орнітин	-	-
L-аргінін	+	+
L-лізин	-	-
Сечовина	+	+
L-арабітол	-	-
Галактуронова кислота	-	-
Калій 5-кетоглюконат	-	-
5-бромо-3-індоксилнонаноат	+	+
Натрій піруват, D-манітол, D-мальтоза, D-глюкоза, D-сахароза, D-трегалоза	-	-
4-нітрофеніл β-D-глюкопіранозид	-	-
Палатиноза	-	-
4-нітрофеніл β-D-глюкуронид	-	-
Натрій малонат	-	-
L-триптофан	-	-
N-ацетил -глюкозамін	-	-
β-галактозидаза (4-нітрофеніл-β-D-галактопіранозид)	-	-
L-арабіноза	+	+
D-арабітол	-	-
4-нітрофеніл-α-D-глюкопіранозид	-	-
α -галактозидаза (4-нітрофеніл- α -D-галактопіранозид)	-	-
Адонітол, Інозитол, D-целобіоза, D-сорбітол	-	-
4-нітрофеніл-α-D-мальтопіранозид	-	-
L-рамноза, L-аспартат-4-нітроанілід	-	-

Примітки: «-» - негативна/відсутність ознаки, «+» - позитивна реакція, «d» - варіабельна ознака.

Таблиця 11. Фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних штамів, з методом API 20NE

Назва тесту	Скорочення у стріпах API-систем	Номер штаму		Літературні данні	
		1E	1E*	<i>B. gladioli</i>	<i>T.caryo-phylli</i>
Редукція нітратів	NO ₃	+	+	d	+
L-триптофан	TRP	-	-	d	-
D-глюкоза (анейробно)	GLU	-	-	-	-
Аргініндегідролаза	ADH	-	-	-	+
Сечовина (Уреаза)	URE	-	-	d	н.в.
Ескулін (β-глюкозидаза)	ESC	+	-	-	-
Желатина	GEL	+	+	+	-
β-галатозидаза	PNPG	-	-	-	+
D-глюкоза (аеробно)	GLU	+	+	+	+
L-арабіноза	ARA	-	-	+	+
D-маноза	MNE	+	+	+	+
D-манітол	MAN	+	+	+	+
N-ацетил - глюкозамін	NAG	+	+	+	+
D-мальтоза	MAL	+	+	d	-
Глюканат калію	GNT	+	+	+	+
Капріонова кислота	CAP	+	+	+	-
Адипінова кислота	ADI	-	-	+	-
Малонат	MLT	+	+	+	-
Цитрат	CIT	+	+	+	+
Фенілоцтова кислота	PAC	+	+	+	+

Примітки: «-» - негативна/відсутність ознаки, «+» - позитивна реакція, «d» - варіабельна ознака, «н.в.» - немає відомостей.

Таким чином, фізіолого-біохімічні дослідження, не дають однозначної відповіді при ідентифікації *B. gladioli* і *T. caryophylli*, тому наступним етапом ідентифікації є визначення жирнокислотного складу клітинних ліпідів для представників *Burkholderiaceae*.

5. ХЕМОТАКСОНОМІЧНИЙ АНАЛІЗ БАКТЕРІЙ НА ОСНОВІ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ КЛІТИННИХ ЛІПІДІВ

Жирні кислоти, є типовими складовими клітинної стінки майже всіх бактерій. За даними численних досліджень жирнокислотний склад клітинних ліпідів є таксономічно значимою ознакою при ідентифікації різних фізіологічних груп бактерій. Дана ознака широко використовується у поліфазній таксономії фітопатогенних бактерій. Якісний та кількісний склад жирних кислот клітинних ліпідів є специфічним хемотаксономічним маркером.

Для дослідження жирнокислотного складу клітинних ліпідів бактерії вирощували на картопляно-декстрозному агарі (24 години). Однодобову культуру змивали фізіологічним розчином, осаджували центрифугуванням 40-60 хв при 1500 об/хв. Для дослідження використовували 10 мг клітин у перерахунку на суху масу бактерій. Бактеріальні клітини витримували в 5% розчині ацетилхлориду в метанолі протягом 4 годин при 100 °С, потім додавали 2-3 мл дистильованої води. Метиловий ефір жирної кислоти двічі екстрагували сумішшю ефір/гексан (1:1) [52, 49]. Склад метилових ефірів жирних кислот аналізували за допомогою газової хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6800N/5973 inert. Метилові ефіри ідентифікували автоматично за часом утримування порівняно зі стандартами (Supelco, США). Вміст жирних кислот визначали за допомогою програмного забезпечення Agilent ChemStation і відображали як % від загальної

площі піку. Для оцінки достовірності експериментальних даних, наведених у роботі, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне (\bar{X}) і середньоквадратичне відхилення ($S\bar{X}$) на рівні значущості $<0,05$. Аналіз проводили за допомогою пакету комп'ютерних програм STATISTICA 6.0 та Microsoft Excel.

За даними літератури, представники роду *Agrobacterium* характеризуються наявністю у своїх профілях таких жирних кислот: гексадеканової ($C_{16:0}$), 3-оксигексадеканової (3-ОН- $C_{16:0}$) та циклопропанової жирної кислоти з 19 атомами вуглецю ($C_{19:0\text{cyclo}}$). Крім того, наявність у клітинних ліпідах циклопропанової жирної кислоти з 17 ($C_{17:0\text{cyclo}}$) атомами вуглецю може вказувати на спорідненість з представниками біовару I цього виду [53].

За нашими даними клітинні ліпіди колекційних *A. tumefaciens* та ізолюваних штамів *Agrobacterium* sp. характеризуються наявністю жирних кислот з довжиною вуглецевого ланцюга від 14 до 19 атомів, а саме: насичених - гексадеканої ($C_{16:0}$), октадеканової ($C_{18:0}$); ненасичених - гекса- ($C_{16:1}$) і октадеканова ($C_{18:1}$); оксикислот — 3-оксидеканової (3-ОН- $C_{10:0}$), 3-окситетрадеканової (3-ОН- $C_{14:0}$), 3-огексадеканової (3-ОН- $C_{16:0}$) і циклопропанової кислоти з 17 ($C_{17:0\text{cyclo}}$) і 19 ($C_{19:0\text{cyclo}}$) атомами вуглецю (рис.1). Кількість гексадеканової кислоти ($C_{16:0}$) коливається у межах від 7,89% до 11,87%. У спектрах у слідових кількостях були виявлені *cis*-9,10-метилгексадеканова ($C_{17:0\text{cyclo}}$) та октадеканова ($C_{18:0}$) кислоти (вміст яких становив від 0,5 до 1%). Слід підкреслити, що жирнокислотний профіль *Agrobacterium* sp. ізолюваних зі штамів волоського горіха та колекційних штамів *A. tumefaciens* є подібним. Це свідчить про спорідненість ізолюваних штамів з представниками виду *A. tumefaciens*.

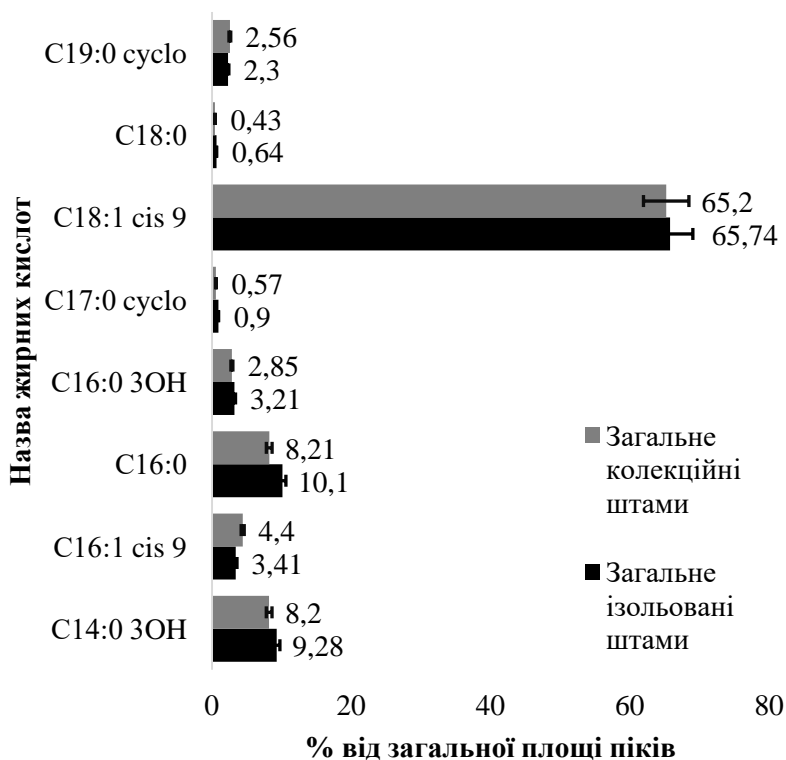


Рисунок 1. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів ізольованих *Agrobacterium* sp. та колекційних штамів *A. tumefaciens*

У жирнокислотних спектрах ізольованих та колекційних штамів *X. arboricola* pv. *juglandis* детектовано жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга від 12 до 18, а саме: насичені - деканову ($C_{10:0}$), ундеканову ($C_{11:0}$), тетрадеканову ($C_{14:0}$), пентадеканову ($C_{15:0}$), гексадеканову ($C_{16:0}$), октадеканову ($C_{18:0}$) кислоти; ненасичені - гекса- ($C_{16:1}$) та октадеценову ($C_{18:1}$); оксикислоти - 3-оксидеканову (3-ОН- $C_{10:0}$), 2-оксидеканову (2-ОН- $C_{10:0}$), 3-оксидодеканову (3-ОН- $C_{12:0}$), 2-оксидодеканову (2-ОН- $C_{12:0}$), 3-

окситетрадеканову (3-ОН-С_{14:0}), 3-оксигексадеканову (3-ОН-С_{16:0}) (рис. 2).

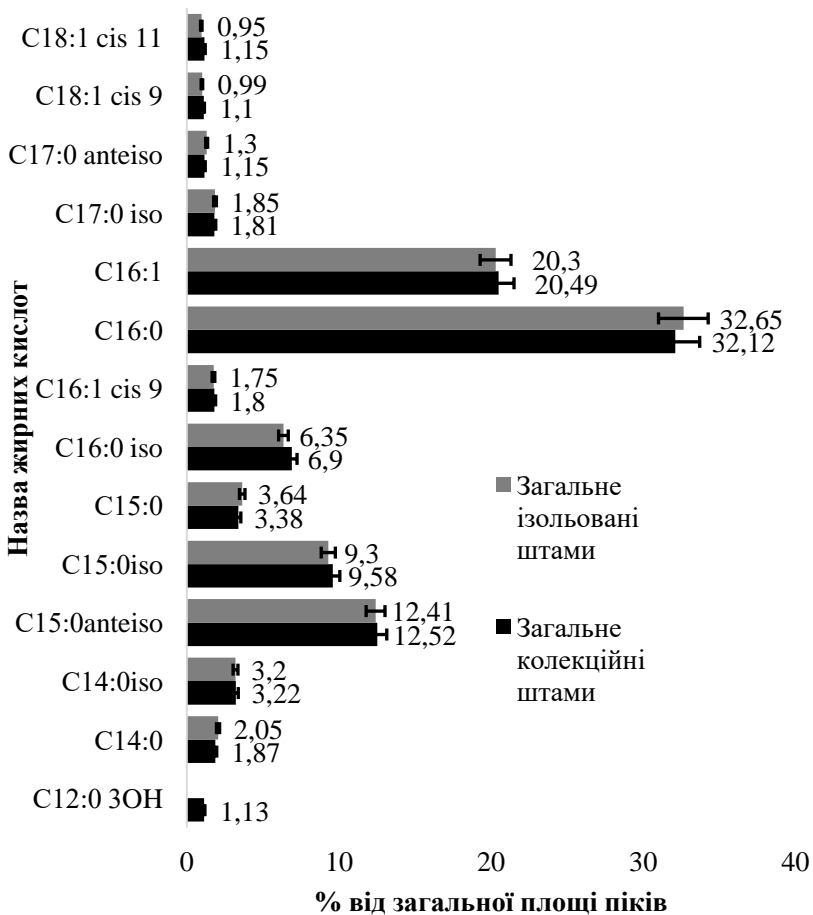


Рисунок 2. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів ізольованих *Xanthomonas* sp. та колекційних штамів *X. arboricola* pv. *juglandis*

У жирнокислотних спектрах ізольованих штамів *Xanthomonas* sp. та колекційних штамів *X. arboricola* pv. *juglandis* також виявлено широкий спектр iso та anteiso

жирних кислот, зокрема 13-метилтетрадеканову ($C_{15:0iso}$), 12-метилтетрадеканову ($C_{15:0anteiso}$), 14-метилпентадеканову ($C_{16:0iso}$), 15-метилгексадеканову ($C_{17:0iso}$), 14-метилгексадеканову ($C_{17:0anteiso}$). Крім того, в жирнокислотних спектрах клітинних ліпідів виявлено циклопропанову жирну кислоту з 17 атомами вуглецю, що є характерною ознакою представників роду *Xanthomonas* [54].

У жирнокислотних профілях штамів *Pseudomonas* sp, виділених з волоського горіха, та типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T виявлено жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{10} до C_{19} : ненасичені - гекса- ($C_{16:1}$) та октадецена ($C_{18:1}$); насичені - деканова ($C_{10:0}$), додеканова ($C_{12:0}$), тетрадеканова ($C_{14:0}$), гексадеканова ($C_{16:0}$) і октадеканова ($C_{18:0}$) кислоти; оксикислоти - 3-оксидеканова (3-ОН- $C_{10:0}$), 2-оксидодеканова (2-ОН- $C_{12:0}$), 3-оксидодеканова (3-ОН- $C_{12:0}$) і циклопропанові кислоти з 17 і 19 атомами вуглецю (рис. 3).

З літератури відомо, що найбільш важливим для таксономії бактерій *P. syringae* є наявність оксикислот [55]. У профілях жирних кислот були виявлені характерні для представників даного виду оксикислоти: 3-оксидодеканова (3-ОН- $C_{10:0}$), 2-оксидодеканова (2-ОН- $C_{12:0}$) та 3-оксидодеканова (3-ОН- $C_{12:0}$). Ці жирні кислоти містилися в кількостях від 0,98% до 1,25%.

Одержані нами результати щодо жирнокислотного складу клітинних ліпідів ізольованих *P. syringae*, узгоджуються з даними літератури. Для D. Stead результати розподілу тих чи інших оксикислот слугували однією з підстав для розподілу представників роду *Pseudomonas*. Згідно цієї характеристики патовари *P. syringae* входять до групи 1 підгрупи 1a [55].

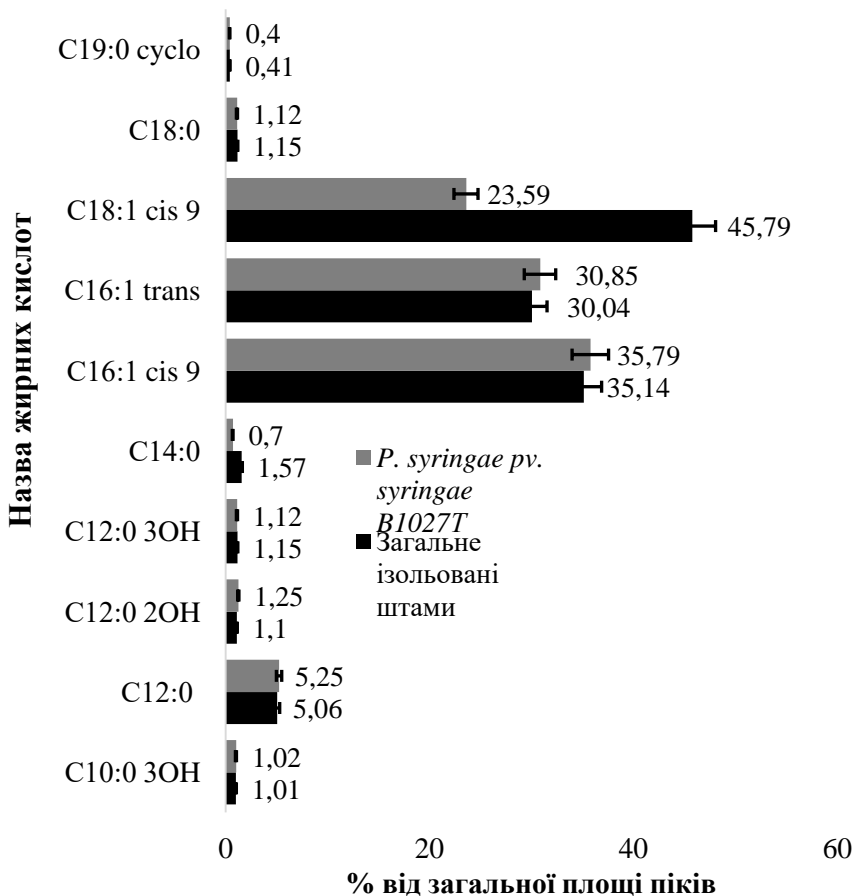


Рисунок 3. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів ізольованих *Pseudomonas* sp. та колекційних штамів *P. syringae* pv. *syringae*.

Отже за результатами хемотаксономічного аналізу ізольовані з горіху волоського штами споріднені з типовими представниками видів *P. syringae*, *X. arboricola*, *A. tumefaciens*.

За жирнокислотним профілем штами 1E та 1E* виділенні з еустоми є гомогенною групою (табл. 12).

Таблиця 12. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів штамів 1E та 1E*

Назва жирних кислот	Штам		Літературні дані	
	1E	1E*	<i>T. caryophylli</i>	<i>B. gladioli</i>
C _{12:0}	0,73	0,78	-	-
C _{14:0 iso}	4,64	4,28	-	-
C _{15:0}	0,56	0,45	14,1	8,4 - 11
C_{14:0} ЗОН	1,56	4,08	-	Tr-5,42
C_{16:0} ЗОН	1,03	1	-	3,39-5,9
C_{16:1 cis 9}	26,38	27,70	14,1	-
C_{16:0}	31,70	35,47	21,7	13,0-30,53
C _{17:0 cyclo}	7,18	9,34	2,4	5,41-8,4
C _{17:0 anteiso}	0,53	0,48	-	-
C_{18:1 cis 9}	18,03	17,56	48,8	20,0-25,0
C _{18:0}	3,64	3,24	1,1	1,19-1,31
C_{18:1 2ОН}	0,26	0,41	1,6	Tr-2,34
C _{19:0}	0,47	0,56	-	-
<i>C_{19:0 cyclo}</i>	<i>0,97</i>	<i>1,19</i>	<i>Tr-3</i>	<i>2,95-8,3</i>

Примітки: «Tr» - слідова кількість, «-» - немає даних.

У клітинних ліпідах цих штамів присутні у слідових кількостях наступні жирні кислоти: додеканова (C_{12:0}) (0,73-0,78%); 2-оксиоксадецена (2-ОН–C_{18:1}) (0,26-0,41%); cis-9,10-метилен октадеканова (C_{19:0 cyclo}); нонадеканова (C_{19:0}) (0,47-0,56%). Також присутні маркерні для видів *Burkholderia* жирні гідрокси кислоти з 14, 16 і 18 атомами вуглецю (C_{14:0} ЗОН і C_{16:0}, C_{16:1} та C_{18:1}). Найхарактернішою з цих кислот є C_{16:0} ЗОН. [7]

Обидві маркерні жирні кислоти для *T. caryophylli* (ОЕРР/ЕРРО, 2006) були присутні у відповідних кількостях: гексадеканова (C_{16:0}), якої повинно бути більше 20% - в обох штамів було 31,70 і 35,47%; та октадеканова (C_{19:0 cyclo}), якої повинно бути менше 3%, - в наших дослідних штамів було 0,97 та 1,19 %. Тобто аналіз жирнокислотних спектрів клітинних ліпідів підтверджує їх спорідненість з представниками *T. caryophylli*. Також слід відмітити що наявність у їх

спектрі додеканової ($C_{12:0}$) кислоти вказує на їх спорідненість і з представниками виду *B. gladioli*. Данна група 2a (*T. caryophylli*, *B. gladioli*, *B. andropogonis*, *B. glumae*, *B. plantarii*) має доволі споріднений жирнокислотний спектр [55], тому остаточне вирішення таксономічного статусу даних штамів потребує залучення більш широкого спектру ознак, зокрема генотипових.

Для штаму 9E було визначено типовий склад жирних кислот клітинних ліпідів для представників роду *Pseudomonas* групи 1a за Stead D.E [55]. А саме були присутні: додеканова ($C_{12:0}$ – 4,9%), 3-гідроксидодеканова (3-ОН $C_{12:0}$ – 0,3%), 9- *цис*- гексадеценова ($C_{16:1}$ *cis* 9 – 20,3%), гексодеканова ($C_{16:0}$ – 30,21%), циклопропанова ($C_{17:0}$ *cyclo* – 10,85%), *цис*-9-октадеценова ($C_{18:1}$ *cis* 9 – 20,92%), октадеценова ($C_{18:0}$ – 0,69%) та циклопропаноктанова ($C_{19:0}$ *cyclo* – 0,71%). Кількісний вміст цих кислот співпадає із літературними даними, як для *P. fluorescens*, так і приблизно для всієї групи 1a. До групи 1a віднесено такі бактерії, як *P. agarici*, *P. aeruginosa*, *P. asplenii*, *P. aureofaciens*, *P. caricapapayae*, *P. chlororaphis*, *P. cichorii*, *P. fluorescens* biovar 1-5, *P. fuscovaginae*, *P. marginalis* pv. *alfalfae*, *P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. marginalis* pv. *pastinacae*, *P. meliae*, *P. putida* biovar A, B, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. tolaasii*, and *P. viridijlava*. Серед цієї групи переважає більшість псевдомонад, які є фтопатогенами, тому для ідентифікації до виду для *P. fluorescens* визначення жирнокислотного спектру не є дієвим, але до роду та для звуження кола можливих видів до представників однієї групи (1a) дану ознаку можна використовувати.

6. ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПАТОГЕННИХ ДЛЯ ГОРИХУ ВОЛОСЬКОГО ТА ЕУСТОМИ БАКТЕРІЙ

Ген 16S рРНК став надійним інструментом для ідентифікації та класифікації бактерій. А його довжина приблизно 1500 п.н. є достатньою для біоінформативного аналізу [56]. У філогенетичних дослідженнях бактерій використання гена 16S рРНК є досить ефективним, оскільки його функції практично не змінилися в процесі еволюції. Крім того, цей показник є одним з обов'язкових критеріїв виду. Інформація про його нуклеотидну послідовність у повному обсязі представлена в онлайн-базі даних GenBank. Наявність універсальних праймерів для 16S рРНК і притаманна більшості бактеріальних геномів висока кількість копій 16S рРНК є двома основними атрибутами, що сприяють включенню послідовності 16S рРНК як частини розробленої поліфазної таксономії бактерій [10, 56, 12, 57].

Для виділення ДНК застосовували Silica Spin колонки фірми Qiagen і набір реактивів «ДНК-сорб-В». ДНК копію гена 16S рРНК ампліфікували з використанням універсальних праймерів рА-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (8-27, нумерація за *E. coli*) і рН-3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5' (1542-1523, нумерація за *E. coli*). Ампліфікування проводили з використанням термоциклеру Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902, фірми Applied Biosystem (США) за експериментально підібраних умов. Ампліфікати 16S рРНК сиквенували з 5'- і 3' кінців на автоматичному сиквенаторі 3130 Genetic Analyzer. Початок і кінець гену 16S рРНК досліджуваних штамів визначали порівняльним аналізом з аналогічними фрагментами типового штаму *E.coli* ATCC 11775^T (X80725) та типових штамів видів, що належать до родів *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*. Побудову зворотного компліменту здійснювали з використанням комп'ютерних програм доступних онлайн. Встановлення

спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК досліджуваних штамів із аналогічними нуклеотидними послідовностями типових штамів зазначених вище родів, що розміщені у GenBank, здійснювали використовуючи програму BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Для побудови дендрограми філогенетичних зв'язків застосовували програму MEGA 5. Дендрограму будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури за 100 репліками «bootstrap» аналізу.

Agrobacterium tumefaciens

Рід *Agrobacterium* спочатку був запропонований для трьох видів бактерій, які спричиняли ризогенний або пухлиногенний процес у рослин або були взагалі не патогенними для рослин (1942 рік). З роками рід неухильно зростає, і охоплює все більше видів. На сьогодні рід включає 18 видів, 45% з яких було описано протягом останніх 5 років. Філогенетичний аналіз що базується на спорідненості гену 16S рРНК показав, що рід *Agrobacterium* це дуже гетерогенне угруповання [11]. На сьогодні даний таксон об'єднує патогенні, непатогенні види для рослин види і навіть екстремальні і умовно патогенні для людини види. Формування даного таксону було переосмислено на основі молекулярно-генетичних досліджень (додаток 2)[15, 19].

В результаті філогенетичного аналізу як ізольовані з волоського горіха штами, так і колекційні штами *A. tumefaciens* виявили найбільшу спорідненість за послідовностями гена 16S рРНК з представниками видів *Agrobacterium*, депонованих в GenBank: *Agrobacterium arsenijevicii*, *Agrobacterium fabacearum*, *Agrobacterium nepotum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vaccinii* (понад 99%). Беручи до уваги попереднє вивчення фенотипових властивостей, найбільш вірогідною, на нашу думку, є їхня приналежність до виду

A. tumefaciens. Побудова дендрограми філогенетичних зв'язків дещо звузила коло близькоспоріднених видів оскільки ізольовані нами види віднесено до 2 близькоспоріднених з типовими представниками виду *A. tumefaciens* кластерів (додаток 7). Зокрема ізольовані, колекційні штами і типовий штам *Agrobacterium tumefaciens* УКМ ІМВ-В-8933^T, утворили дві групи кластерів близько споріднених з типовими представниками видів *Agrobacterium arsenijevicei*, *Agrobacterium nepotum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium fabacearum* (додаток 7). Слід відмітити, що види *Agrobacterium nepotum* та *Agrobacterium fabacearum* є сапрофітами значно дистанцією їх від ізольованих нами штамів. Натомість види *Agrobacterium arsenijevicei* і *Agrobacterium tumefaciens* є патогенними для рослин. За даними літератури *Agrobacterium arsenijevicei* здатен індукувати утворення корончастих галів на малині (*Rubus idaeus*) і аличі (*Prunus cerasifera*) [15]. Слід наголосити що дані про індукування процесу пухлиноутворення представниками даного виду у дерев горіху волоського (*Juglans regia*) в літературі відсутні тому найбільш вірогідним є їх належність до виду *Agrobacterium tumefaciens* (додаток 6).

Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis

Рід *Xanthomonas* згідно сучасної таксономії об'єднує у своєму складі в основному патогенні для рослин види (понад 30 видів). Зокрема 94% видів віднесені до роду *Xanthomonas* є патогенними для понад рослин. Філогенія даного роду є доволі сталою оскільки тільки 22% видів описані протягом останніх 5 років (додаток 1).

Високий відсоток гомології (99-98%) нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК ізольованих з горіху волоського штамів *Xanthomonas* spp та колекційних штамів *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* задетектовано з представниками видів *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. citri*, *X.*

cucurbitae, *X. dyei*, *X. euroxanthea*, *X. euvesicatoria*, *X. floridensis*, *X. hortorum*, *X. hydrangeae*, *X. nasturtii*, *X. oryzae*, *X. phaseoli*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. prunicola*, *X. vasicola*, *X. vesicatoria*. За дендрограмою філогенетичних зв'язків як ізольовані *Xanthomonas* sp. так і колекційні *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* штами утворили 2 групи кластерів близькоспоріднених з типовим штамом *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 411 (додаток 8) Також до даної групи є спорідненим вид *X. hortorum* що викликає плямистість листя і гниття салату. Натомість вид *Xanthomonas euroxanthea* виділений з волоського горіха (*Juglans regia*) та об'єднує непатогенні та патогенні для волоського горіха штами бактерій є згідно дендрограми доволі віддаленим від ізольованих штамів *Xanthomonas* sp. (додаток 8).

Pseudomonas syringae* pv. *syringae

Згідно сучасної таксономії рід *Pseudomonas* містить понад 140 видів, більшість з яких сапрофіти. Фітопатогенні псевдомонади — це дуже різноманітна група бактерій з огляду на їх генетику, екологію та типи захворювань, що вони викликають [23]. Філогенетична група *Pseudomonas syringae* включає 15 визнаних видів бактерій і понад 60 патоварів [15] (додаток 3).

Філогенетичний аналіз спорідненості ізольованих нами з горіху волоського штамів *Pseudomonas* sp. показав значну спорідненість (99–98 %) з представниками видів *Pseudomonas cerasi*, *Pseudomonas congelans*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas cannabina*, *Pseudomonas savastanoi*, що належать до I, III, IV генетичних груп згідно зазначеної вище класифікації. Натомість ізольовані нами штами *Pseudomonas* sp. згідно дендрограми філогенетичних (аналіз гену 16S рРНК) зв'язків утворили окрему групу близько споріднену з типовими представниками виду *Pseudomonas syringae* (додаток 9). Крім того, решта типових представників видів є рівновіддаленими від даної групи.

***Burkholderia* sp.**

Рід *Burkholderia* це фенотипово і генотипово різноманітна група організмів, що ізолюється з різноманітних екологічних ніш від ґрунту, водних джерел, інфікованих людей, а також є причиною хвороб окремих рослин і мікроорганізми корисні для росту і розвитку рослин а також для біоремідації. Типовий вид *Burkholderia cepacia* спочатку був ідентифікований як патоген рослин, що спричиняє м'яке гниття цибулі але в останні 20 років підтверджено його умовно-патогенний для людей статус. Типовими представниками патогенними для рослин видів є: *Burkholderia gladioli* (рв. *gladioli* ізолюваний з гниття цибулин гладіолусів; рв. *alliicola* ізолюваний з гнилих цибулин цибулі; рв. *agaricicola* ізолюваний з м'якого гниття грибів; рв. *cocovenerans* збудник м'якого гниття м'якоті кокосу); *Burkholderia glumae* (збудник бактеріального гниття волоті рису); *Burkholderia plantarii* (збудник хвороб рослин в тому числі зернових). Раніше до даного роду також належав вид «*Burkholderia caryophylli*» але за даними повногеномного секвенування він був переміщений до роду *Trinickia* [15].

За результатами проведеного порівняльного аналізу гену 16S рНК ізолюваного з еustomи штаму E1 з нуклеотидними послідовностями гену 16S рНК типових штамів роду *Burkholderia* і *Trinickia*, що зберігаються у базі GenBank. За даними філогенетичного аналізу ізолюваний нами з еustomи штам споріднений з типовим штамом *B.gladioli* рв.*gladioli* NCPPB 1891 на 100%, з *B.glumae* М6-4 на 98,75%, а з *B.plantarii* СІР 105769 на 97,82%. Натомість спорідненість даного штаму з *T. caryophylli* АТСС 25418 становить лише 95,28 %. Згідно дендрограми філогенетичних зв'язків даний штам утворив кластер з типовим представником виду *B.gladioli* рв. *gladioli*. Цей кластер є близькоспорідненим з

кластером утвореним видами *B. glumae* і *B. plantarii* (додаток 10).

Тобто штам 1E за аналізом гену 16S рРНК на 100% співпадає із *B. gladioli* pv. *gladioli* NCPPB 1891, тому штам 1E ідентифіковано як *B. gladioli*.

***Pseudomonas* sp.**

Як відомо група видів близькоспоріднених з видом *Pseudomonas fluorescens* є доволі гетерогенним угрупованням у складі роду *Pseudomonas*. Багато видів з даного угруповання є новоствореними, а також деякі мають складну внутрішньовидову структуру (біовари, патовари, підвиди). Зокрема у структурі виду *Pseudomonas fluorescens* вирізняють 5 біоварів [15] (додаток 5). Саме тому коректна ідентифікація на рівні виду є вкрай важливою. Аналіз послідовності гену 16SpРНК останнім часом інтенсивно використовується для ідентифікації даної груп и бактерій. Крім того існує ряд досліджень що показали кореляцію між генетичною структурою даної групи встановленої в результаті аналізу гену 16Sp РНК і однокопійним геном що кодує σ -субодиницею РНК-полімерази *groD*. Саме тому нами було проведено порівняльний аналіз гену 16SpРНК ізольованого з еустоми штаму з нуклеотидними послідовностями гену 16S рРНК типових штамів групи *P. fluorescens*, що зберігаються у базі GenBank. За результатами аналізу ізольований нами з еустоми штам споріднений з *Pseudomonas fluorescens* IAM 12022 з найбільшим відсотком подібності даного гена (98,64%).

Ізольований нами штам *Pseudomonas* sp. згідно дендрограми (додаток 11) філогенетичних (аналіз гену 16S рРНК) зв'язків утворили окрему групу близько споріднену з типовим представником виду з *Pseudomonas fluorescens* IAM 12022. Даний кластер також близькоспоріднений з такими патогенними для рослин видами як: *Pseudomonas cyclaminis* (збудник

бактеріального опіку бруньок цикламену), *Pseudomonas petroselini* (збудник бурої бактеріального гниття петрушки). Також до даної групи є близькоспорідненими інші патогенні для рослин види а саме: *Pseudomonas tolaasii* та *Pseudomonas costantinii* (збудники бурої плямистості культивованих грибів), *Pseudomonas marginalis* (поліфаг що уражує широке коло рослин господарів) [15].

Список літератури

1. Frutos D. (2010). Minireview. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. *Journal of Plant Pathology*. 92 (1, Supplement)., 79–85.

2. Sagawa, C. H. D, Assis, R. de A. B., Zaini, P. A., Wilmarth, Ph., Phinney, B. S., Moreira, L. M., Dandekar, A. M. (2020) Proteome Analysis of Walnut Bacterial Blight. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (20), 7453 <https://doi.org/10.3390/ijms21207453>.

3. Rouhrazi, K., Rahimian, H. (2014). Biochemical and genetic characterisation of *Agrobacterium tumefaciens* the causal agent of walnut crown gall disease in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(20), 2493-2500. <https://doi.org/10.1080/03235408.2014.880575>

4. Dankevych, L.A., Patyka, V.P. (2013) Polyphasic taxonomy of pathogens of bacterial diseases of walnut based on phenotype. Abstracts of reports of the XII Congress of the Society of Microbiologists of Ukraine named after S.M. Vinogradskyi, Yalta October 1-6, 156 p.

5. Keshtkar A. R., Khodakaramian Ch., Rouhrazi K. (2016). Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* which induce leaf sport on walnut. *Eur J Plant Pathology*, 146, 837–846 <https://doi:10.1007/s10658-016-0962-2>.

6. The Botanical Garden. Perennials and annuals. London: Macmillan. 2002. Vol. 2. P. 210.

7. Sharma I. (2021). Phytopathogenic fungi and their biocontrol applications. In *Fungi Bio-Prospect in*

Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology (pp. 155-188). Academic Press.

8. Клеффманн Групп Юкрейн. Ринок квітів та декоративних рослин в Україні. Скорочений звіт. 2019. С. 26.

9. Pandit, M. A., Kumar, J., Gulati, S., Bhandari, N., Mehta, P., Katyul, R., & Kaur, J. (2022). Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens*, 11(2), 273.

10. Moore, E. R. B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E. C., Hutson, R. A., Collins, M. D., Van De Peer, Y., De Wachter, R., & Timmis, K. N. (1996). The Determination and Comparison of the 16S rRNA Gene Sequences of Species of the Genus *Pseudomonas* (sensu stricto and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(4), 478–492. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(96\)80021-x](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(96)80021-x)

11. Hördt A., López M. G., Meier-Kolthoff J. P., Schleuning Marcel, Weinhold L.-M., Tindall B. J, Gronow S., Kyrpides N. C, Woyke T., Göker Markus. (2020). Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of *Alphaproteobacteria*. *Front Microbiology*, 7(11), 468 <https://doi:10.3389/fmicb.2020.00468>

12. Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1–1. Portico. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>

13. Kałużna, M., Fischer-Le Saux, M., Pothier, J. F., Jacques, M., Obradović, A., Tavares, F., & Stefani, E. (2021). *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and pv. *corylina*: Brothers or distant relatives? Genetic clues, epidemiology, and insights for disease management. *Molecular Plant Pathology*, 22(12), 1481–1499. <https://doi.org/10.1111/mpp.13073>

14. Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Essakhi, S., Manceau, C., & Jacques, M.-A. (2015). Aggressive Emerging Pathovars of *Xanthomonas arboricola* Represent Widespread

Epidemic Clones Distinct from Poorly Pathogenic Strains, as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4651–4668. <https://doi.org/10.1128/aem.00050-15>

15. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2024. <https://www.bacterio.net/>

16. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2024) EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/search>.

17. Lamichhane, J. R. (2014). *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *Plant Disease*, 98(12), 1600–1610. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-14-0831-fe>

18. Fu B., Zhu J., Lee C., Wang L. (2021) Multilocus sequence analysis and copper ion resistance detection of 60 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates from China. *Plant Disease*. 105(11), 3715–3719

19. Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Peix, A., García-Fraile, P., Velázquez, E. (2020). History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*. 43(1), 126046

20. Kotan, R. (2022). Pathogenicity of different *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) isolates and their identification with conventional methods KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (Ek Sayı 1). KSU J Agric Nat 25 (Suppl 1), 149-157. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.976158>

21. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби росли. під. ред. Патики В.П. Київ: ТОВ «Науково-виробниче підприємство Інтерсервіс»; 2011. Том 1; 442с.

22. Lassalle, F., Planel, R., Penel, S., Chapulliot, D., Barbe, V., Dubost, A., Calteau, A., Vallenet, D., Mornico, D., Bigot, T., Guéguen, L., Vial, L., Muller, D., Daubin, V., & Nesme, X. (2017). Ancestral Genome Estimation Reveals the

History of Ecological Diversification in *Agrobacterium*. *Genome Biology and Evolution*, 9(12), 3413–3431. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx255>

23. Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Front. Microbiol.* 8, 2422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422>

24. Dankevych, L.A. (2019) Identification of causative agents of brown bacterial spotting of lupine by the presence of the syringomycin secretion gene (syr D). *Factors of experimental evolution of organisms*. 25., P. 122–125

25. Bultreys A, Gheysen, I. (1999). Biological and Molecular Detection of Toxic Lipodepsipeptide-Producing *Pseudomonas syringae* Strains and PCR Identification in Plants. *Applied and environmental microbiology*. 65 (5), 1904–1909. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.1904-1909.1999>

26. Dankevych L., Leonova N., Dragovoz I., Patyka V., Kalinichenko A., Włodarczyk P. P., Włodarczyk B. J. (2018). The synthesis of plant growth stimulators by phytopathogenic bacteria as factor of pathogenicity. *Applied ecology and environmental research*, 16(2), 1581–1593 https://doi.org/10.15666/aer/1602_15811593

27. Seijo, T. E., Biologist, S., McGovern, R. J., Dickstein, E. R., & Harbaugh, B. K. (2018). Bacterial Crown Rot of *Lisianthus* Caused by *Burkholderia gladioli*. *Plant Health Progress*, 3(1), 21 p. <https://doi.org/10.1094/PHP-2002-0520-01-HN>

28. Глобальна база даних ЄОКЗР (EPPO Global Database) *Burkholderia gladioli*. <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMGA/categorization>

29. Akhtar, G., Shehzad, M. A., Faried, H. N., Ullah, S., Razaq, K., Ahsan, M., & Sajjad, Y. (2023). Evaluation of new cultivars of *Gladiolus grandiflorus* grown in subtropical conditions for their post-harvest performance and growth

traits. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 1–16.

30. Bergey's manual of systematic bacteriology / Eds Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley — V. 2, — 2nd ed. — New York, Berlin, Heidelberg: Springer. 2005. — 2, Part C. 1389 P.

31. Вергелес П.М., Пінчук Н.В., Коваленко Т.М. Карантин рослин. Навч. посіб.: Вінниця: ВНАУ, 2021. — 377 с.

32. Глобальна база даних ЄОКЗР (EPPO Global Database). <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMCA/categorization>

33. Compant S., Nowak J., Coenye T., Clément C, Barka E. A. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 №4. P.607–626. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00113>.

34. Kishi K. *Plant diseases in Japan*. Tokyo, Japan: Zenkoku nousei kyoiku kyokai (Japanese). 1998.

35. Билай В. И, Гвоздяк Р. И., Скрипаль И. Г., и др . Микроорганизмы – возбудители болезней растений – К: Наукова думка, 1988. – 552 с.

36. McGovern R.J. *Diseases of Lisianthus*. In: McGovern R., Elmer W. (eds) (2016). *Handbook of Florists' Crops Diseases. Handbook of Plant Disease Management*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32374-9_20-1

37. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests – version 2021-09 https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list#bacteria

38. Hnatyuk T. *Burkholderia caryophylli* - potentially dangerous patient of bacterial witness in floristry of Ukraine. *Biological Systems: Theory and Innovation*,. 2022. Vol 13 №1-2, С. 50-58. [https://doi.org/10.31548/biologiya13\(1-2\).2022.005](https://doi.org/10.31548/biologiya13(1-2).2022.005)

39 Elshafie, H. S., Camele, I. (2021). An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of

Burkholderia Spp. Metabolites, 11(5), 321 p.
DOI: [10.3390/metabo11050321](https://doi.org/10.3390/metabo11050321)

40. Pal, G., Saxena, S., Kumar, K., Verma, A., Sahu, P. K., Pande, A. & Verma S. K. (2022). Endophytic Burkholderia: Multifunctional roles in plant growth promotion and stress tolerance. Microbiological Research, 265, 127201. PMID: 36167006.
DOI: [10.1016/j.micres.2022.127201](https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127201)

41. Jiao, J., Du, J., Frediansyah, A., Jahanshah, G., & Gross, H. (2020). Structure elucidation and biosynthetic locus of trinickiabactin from the plant pathogenic bacterium Trinickia caryophylli. The Journal of antibiotics, 73(1). P. 28-34. DOI: [10.1038/s41429-019-0246-0](https://doi.org/10.1038/s41429-019-0246-0)

42. Quarantine pests for Europe. Data sheets on quarantine pests for the European Union and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. (Ed. 2), 1997. 1425 pp. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.

43. Глобальна база даних ЄОКЗР (EPPO Global Database) *Ralstonia solanacearum*
<https://gd.eppo.int/taxon/RALSSL/categorization>

44. Liu, L., Chen, Z., Su, Z., Li, S., Ali, A., Cai, Z., ... & Huang, X. (2023). Soil pH indirectly determines Ralstonia solanacearum colonization through its impacts on microbial networks and specific microbial groups. Plant and Soil, 482(1), 73-88.

45. Ren, G., Wang, G., Guo, D., Lu, C., & Ma, Y. (2023). Changes of microbiome in response to sugars in a wilt pathogen-infested soil. Soil Ecology Letters, 5(1), 46-65.

46. Pandey S., & Gupta, S. (2020). Evaluation of Pseudomonas sp. for its multifarious plant growth promoting potential and its ability to alleviate biotic and abiotic stress in tomato (Solanum lycopersicum) plants. Scientific Reports, 10 №1, Article number: 20951. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77850-0>

47. Johansson, O. N., Nilsson, A. K., Gustavsson, M. B., Backhaus, T., Andersson, M. X., & Ellerström, M. (2015). A

quick and robust method for quantification of the hypersensitive response in plants. PeerJ, 3, e1469.

48. Sobiczewski, P., Iakimova, E. T., Mikiciński, A., Węgrzynowicz-Lesiak, E., & Dyki, B. (2017). Necrotrophic behaviour of *Erwinia amylovora* in apple and tobacco leaf tissue. *Plant Pathology*, 66(5), 842-855.

49. Пати́ка В.П., Пасі́чник Л.А., Гвоздяк Р.І., Петри́ченко В.Ф., Кали́ниченко А.В. та ін. (2017). Фітопатогенні бактерії. Методи дослідження. за ред. В. П. Пати́ки [монографія: 3 т.]. Вінниця: ТОВ «Віндрок». Т.2. 432 с.

50. On-line бібліотека «REGNUM PROKARYOTAE»
<https://www.tgw1916.net/Pseudomonas/caryophylli.html>

51. Lelliott, R. A., Billing, E., & Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology*, 29 №3, P. 470-489.

52. Dankevich, L. A., Votselko, S. K., Scherbina, T. M., Patyka, V. P. (2016). Phenotypic heterogeneity of phytopathogenic bacteria belong to *Erwinia* genus – agent of apples bacterial diseases in Ukraine. *Microbiological journal*, 78(5), 30–41. <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.05.030>

53. Tighe, S.W., de Lajudie, P., Dipietro, K., Lindström, K., Nick, G., Jarvis, B. D. (2000). Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(2). 787–801

54. Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J., Kersters, K. (1993). Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(1), 47-71. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80250-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80250-X)

55. Stead, D. E. (1992). Grouping of Plant-Pathogenic and Some Other *Pseudomonas* spp. by Using Cellular Fatty Acid

Profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), 281–295. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-281>

56. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/jcm.01228-07>

57. Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>

Додаток 1

Видовий склад роду *Xanthomonas* [15]

Вид	Характеристика виду
<i>Xanthomonas albilineans</i> (Ashby 1929) Dowson 1943 (Approved Lists 1980)	Збудник що викликає опіки листя цукрової тростини.
<i>X. arboricola</i> Vauterin <i>et al.</i> 1995	Вид викликає захворювання таких деревних культур (слива, фундук і волоський горіх)
<i>X. axonopodis</i> Starr and Garces 1950 (Approved Lists 1980)	Збудник що викликає опік листя цибулі
<i>X. bonasiae</i> Mafakheri <i>et al.</i> 2022	Вид ізольований з дерев інжиру (<i>Ficus benjamina</i>)
<i>X. bromi</i> Vauterin <i>et al.</i> 1995	Викликає вілт (в'янення) стоколосу (<i>Bromus grass</i>)
<i>X. campestris</i> (Pammel 1895) Dowson 1939 (Approved Lists 1980)	Збудник судинного бактеріозу рослин родини Капустяних (<i>Brassicaceae</i>)
<i>X. cassavae</i> (ex Wiehe and Dowson 1953) Vauterin <i>et al.</i> 1995)	Збудник бактеріального некрозу рослин маніоки (<i>Manihot esculenta Crantz</i>)
<i>X. cerealis</i> Tambong <i>et al.</i> 2024	Збудник бактеріальної смугастості листя пшениці (<i>Triticum aestivum</i>), ячменю (<i>Hordeum vulgare</i>), жита (<i>Secale cereale</i>) та вівса (<i>Avena sativa</i>).
<i>X. cissicola</i> (Takimoto 1939) Rudra and Gupta 2021	Збудник плямистості листя дикої виноградної лози (<i>Cissus japonica</i>)
<i>X. citri</i> (ex Hasse 1915) Gabriel <i>et al.</i> 1989)	Збудник бактеріального раку citrusових
<i>X. codiae</i> Vauterin <i>et al.</i> 1995	Вид ізольовано з кодіеуму строкатого (<i>Codiaeum variegatum</i>)
<i>X. cucurbitae</i> (ex Bryan 1926) Vauterin <i>et al.</i> 1995)	Бактеріальна плямистість листя гарбузових культур

<i>X. dyei</i> <u>Young et al. 2010</u>	Патогенний для рослин вид ізольований з метросідероса повстяного (<i>Metrosideros excelsa</i> Sol. Ex Gaertn.)
<i>Xanthomonas euroxanthea</i> <u>Martins et al. 2020</u>	Вид виділений з волоського горіха (<i>Juglans regia</i>), об'єднує непатогенні та патогенні штами.
<i>X. euvesicatoria</i> <u>Jones et al. 2006</u>	Збудник бактеріальної плямистості томатів і перцю, може уражувати дані культури разом з <i>X. hortorum</i> pv. <i>gardneri</i> і <i>X. vesicatoria</i> .
<i>X. floridensis</i> <u>Vicente et al. 2017</u>	Ізольований з листя настурції лікарської (<i>Nasturtium officinale</i>).
<i>X. fragariae</i> <u>Kennedy and King 1962 (Approved Lists 1980)</u>	Вид викликає плямистість листя полуниці (<i>Fragaria</i> spp.)
<i>X. hortorum</i> <u>Vauterin et al. 1995</u>	Патоген, викликає бактеріальну плямистість листя та гниль салату (<i>Lactuca</i> spp.).
<i>X. hyacinthi</i> (<i>ex</i> <u>Wakker 1883</u>) <u>Vauterin et al. 1995</u>	Збудник жовтої хвороби гіацинтів (<i>Hyacinthus</i> spp.) та інших споріднених цибулевих культур
<i>X. hydrangea</i> (<u>Dia et al. 2021</u>)	Збудник плямистості листя гор腾зії деревоподібної (<i>Hydrangea arborescens</i>)
<i>X. maliensis</i> (<u>Triplett et al. 2015</u>)	Сапрофіт ізольований з поверхні листя рису (<i>Oryza sativa</i>) чи рогозу вузьколистого (<i>Ischaemum rugosum</i>)
<i>X.s melonis</i> (<u>Vauterin et al. 1995</u>)	Збудник внутрішньої м'якого гниття плодів дині (<i>Cucumis melo</i> ; <i>Melo sativus</i>)
<i>X. nasturtii</i> (<u>Vicente et al. 2017</u>)	Ізольований з листя настурції лікарської (<i>Nasturtium officinale</i>).
<i>X. oryzae</i> (<i>ex</i> <u>Ishiyama 1922</u>) <u>Swings et al. 1990</u>	Збудник бактеріального опіку рису
<i>X. phaseoli</i> (<i>(ex</i> <u>Smith 1897</u>) <u>Gabriel et al. 1989</u>)	Збудник бактеріального опіку бобів квасолі (<i>Phaseolus vulgaris</i>)

<u><i>X. pisi</i></u> ((<u>ex Goto and Okabe 1958</u>) <u>Vauterin et al. 1995</u>)	Збудник бактеріальної плямистості листя гороху (<i>Pisum sativum</i> .)
<u><i>X. populi</i></u> ((<u>ex Ridé 1958</u>) <u>van den Mooter and Swings 1990</u>)	Збудник бактеріального раку тополі (<i>Populus</i> sp.)
<u><i>X. prunicola</i></u> (<u>López et al. 2018</u>)	Вид, що уражує нектарин (<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>)
<u><i>X. rydalmerensis</i></u> (<u>McKnight et al. 2024</u>)	Не патогенний вид ізольований з суниці ананасної (<i>Fragaria ananassa</i>)
<u><i>X. sacchari</i></u> (<u>Vauterin et al. 1995</u>)	Патоген рослин, виділений із хворих рослин цукрової тростини (<i>Saccharum officinarum</i>)
<u><i>X. theicola</i></u> (<u>Vauterin et al. 1995</u>)	Збудник бактеріального раку рослин чаю (<i>Camellia sinensis</i> L.)
<u><i>X. translucens</i></u> (<u>ex Jones et al. 1917</u>) <u>Vauterin et al. 1995</u>)	Збудник чорного бактеріозу пшениці (<i>Triticum</i> L)
<u><i>X.s vasicola</i></u> (<u>Vauterin et al. 1995</u>)	Збудник бактеріальної смугастості кукурудзи (<i>Zea mays</i>), так і хворобу цукрової тростини (<i>Saccharum</i> spp.)
<u><i>X.s vesicatoria</i></u> (<u>ex Doidge 1920</u>) <u>Vauterin et al. 1995</u>)	Викликає бактеріальну плямистість листя томатів (<i>Lycopersicon</i> spp.) і перцю (<i>Piper</i> spp.)
<u><i>X.s youngii</i></u> (<u>Mafakheri et al. 2022</u>)	Вид ізольовано з рослин амаранту (<i>Amaranthus</i> sp.)

Додаток 2

Видовий склад роду *Agrobacterium* [15]

Вид	Характеристика виду
<i>Agrobacterium arsenijeviceii</i> Kuzmanović <i>et al.</i> 2019	Патоген, корончасті гали малини (<i>Rubus idaeus</i>) і аличі (<i>Prunus cerasifera</i>)
<i>A. burrii</i> Mafakheri <i>et al.</i> 2022	Патоген, корончасті гали рослин роду <i>Rosa</i> L (троянда, шипшина)
<i>A. cavarae</i> Flores-Félix <i>et al.</i> 2020	Ендofіт, корені кукурудзи (<i>Zea mays</i> L.)
<i>A. cucumeris</i> Warabieda <i>et al.</i> 2023	Патоген, розростання коренів огірку (<i>Cucumis sativus</i>)
<i>A. divergens</i> Naranjo <i>et al.</i> 2023	Сапрофіт, асоційовані з рослиною або ґрунтові штами ізольовані з дикорослих рослин акана красильна <i>Alkanna tinctoria</i> (L.) - Греція і ґрунту - Бельгія
<i>A. fabacearum</i> Delamuta <i>et al.</i> 2020	Ендofіт, бульбочки коріння бобових рослини (<i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Glycine max</i> L.), Країни Південної Америки
<i>A. larrymoorei</i> / <i>Rhizobium</i> ** <i>larrymoorei</i> Bouzar and Jones 2001	Патоген, корончасті гали фікуса Бенджаміна <i>Ficus benjamina</i> L
<i>A. leguminum</i> / <i>Rhizobium</i> ** <i>leguminum</i> Castellano-Hinojosa <i>et al.</i> 2021	Ендofіт, виділений із бульбочок <i>Phaseolus vulgaris</i> L. в Іспанії
<i>A. nepotum</i> / <i>Rhizobium</i> ** <i>nepotum</i> (Puławska <i>et al.</i> 2012) Mousavi <i>et al.</i> 2016	Сапрофіт, ґрунт сільгосп. угідь Шрі-Ланка

<p><i>A. pusense/Rhizobium** pusense</i> (Panday et al. 2011) Mousavi et al. 2016</p>	<p>Об'єднує як сапрофітні так і патогенні штами з ризосфери нуту (<i>Cicer arietinum</i> L.), і збудники корончастих галів кипариса Лавсона (<i>Chamaecyparis lawsoniana</i> L.)</p>
<p><i>A. rosae</i> Kuzmanović et al. 2019</p>	<p>Об'єднує патогенні (пухлино утворення чайно-гібридна троянда (<i>Rosa hybrida</i>) і непатогенні види ізольовані з пухлин винограду (<i>Vitis vinifera</i> L), малини (<i>Rubus idaeus</i> L) і чорниці (<i>Vaccinium myrtillus</i>)</p>
<p><i>A. rubi</i> (Hildebrand 1940) Starr and Weiss 1943 (Approved Lists 1980)</p>	<p>Патоген, збудник утворення гал на рослинах ожини (<i>Rubus caesius</i> L.)</p>
<p><i>A. salinitolerans</i> Yan et al. 2017</p>	<p>Сапрофіт, бактерія стійка до лужного розчину, виділена з кореневої бульбочки дерев <i>agami</i>, <i>каре</i> (<i>Sesbania cannabina</i>)</p>
<p><i>A. shirazense</i> Mafakheri et al. 2022</p>	<p>Патоген, збудник утворення корончастих гал рослин роду <i>Rosa</i> L (троянда, шипшина), провінція Фарс, Іран</p>
<p><i>A. skierniewicense</i> (Puławska et al. 2012) Mousavi et al. 2016</p>	<p>Патоген, збудник утворення корончастих гал хризантем (<i>Chrysanthemum</i>) Польща, ЕС</p>
<p><i>A. tomkonis</i> Singh et al. 2022</p>	<p>Штами ізольовані з різноманітних середовищ, у тому числі з ризосфери рослин (сапрофіти); як</p>

	представники мікробіому водоростей, що розкладає лігноцелюлозу; з лікарняного середовища, як умовно-патогенний мікроорганізм для людини ; з поверхні в межах Міжнародної космічної станції.
<i>A. tumefaciens</i> (Smith and Townsend 1907) Conn 1942 (Approved Lists 1980)	Патоген, поліфаг викликає пухлиноутворення багатьох видів рослин
<i>A. vaccinii</i> Puławska <i>et al.</i> 2022	Об'єднує непатогенні штами , виділені з корончатих галлів рослин чорниці (<i>Vaccinium corymbosum</i>)

Додаток 3

Видовий склад «*Pseudomonas syringae* group» [15]

Вид	Характеристика виду
<i>Pseudomonas cerasi</i> Kaluzna <i>et al.</i> 2017	Патоген, ряду деревних культур зокрема вишні (<i>Prunus cerasus</i> L)
<i>Pseudomonas congelans</i> Behrendt <i>et al.</i> 2003	Ізольовані з філосфери трави
<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall 1902 (Approved Lists 1980)	Патоген, викликає різні типи хвороб у широкого кола рослин
<i>Pseudomonas avellanae</i> Janse <i>et al.</i> 1997	Патоген, викликає бактеріальний рак ліщини (<i>Corylus avellana</i> L.).
<i>Pseudomonas cannabina</i> (ex Šutič and Dowson 1959) Gardan <i>et al.</i> 1999	Патоген, викликає гниття листя і стебла конопель (<i>Cannabis sativa</i>)
<i>Pseudomonas amygdale</i> Psallidas and Panagopoulos 1975 (Approved Lists 1980)	Патоген, ізольований з мигдалю (<i>Prunus dulcis</i>)
<i>Pseudomonas meliae</i> Ogimi 1981	Патоген, викликає бактеріальний рак китайської ягоди (<i>Melia azedarach</i> L)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> (Janse 1982 ex Smith 1908) Gardan <i>et al.</i> 1992	Патоген, викликає пухлино утворення оливи (<i>Olea europaea</i>)
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> Goto 1983	Патоген, збудник бактеріальної плямистості листя фікуса (<i>Ficus erecta</i>)
<i>Pseudomonas caricapapayae</i> Robbs 1956 (Approved Lists 1980)	Патоген, ізольований з папайї (<i>Carica papaya</i>)
<i>Pseudomonas asturiensis</i> González <i>et al.</i> 2013	Патоген, виділений із рослин сої. Викликає темно-червонувату плямистість листя

<i>Pseudomonas viridiflava</i> (Burkholder 1930) Dowson 1939 (Approved Lists 1980)	Патоген, ізольований з кущової квасолі
<i>Pseudomonas cichorii</i> (Swingle 1925) Stapp 1928 (Approved Lists 1980)	Патоген, що уражує широке коло рослин господарів і може мати важливий економічний вплив на посіви салату, селери та хризантем
<i>Pseudomonas caspiana</i> Busquets <i>et al.</i> 2017	Патоген, що ізольований з насаджень цитрусових культур. Збудник викликає плямистість листя

Додаток 4



а



б



в



г



д



е

Рисунок 1. Симптоми інфікування рослини-господаря (а,б) і індикаторних рослин (в, г, д, е) штамами фітопатогенних бактерій ізольованими з горіху волоського.

Додаток 5



Рисунок 2. Природне ураження рослин еустоми.

Додаток 6

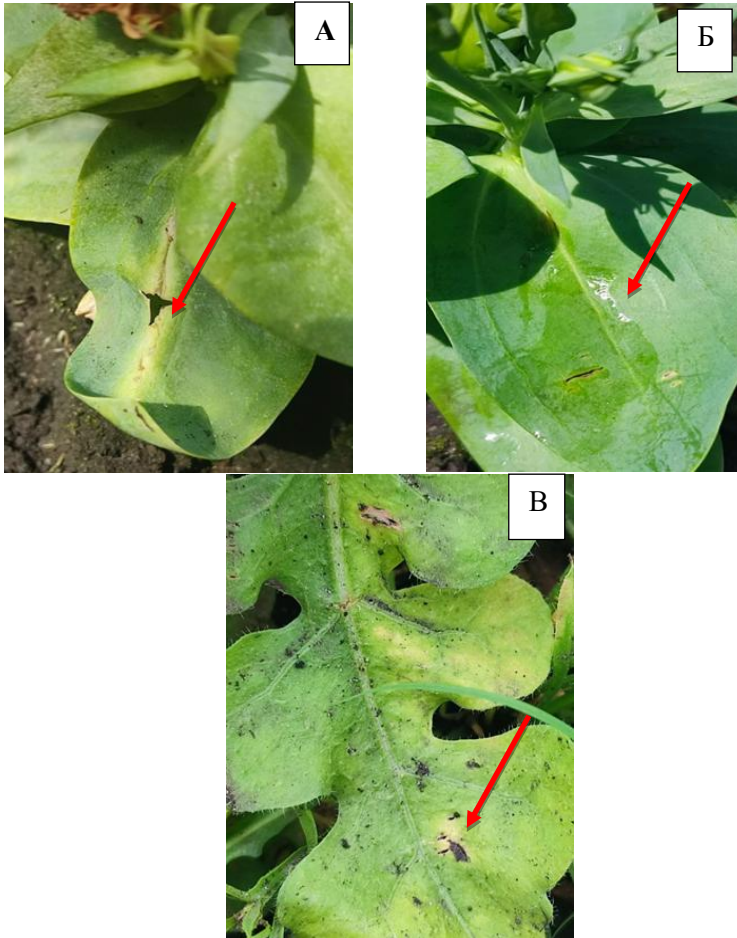


Рисунок 3. Штучне зараження еустоми: А- штамом 1Е , Б - штамом 9Е; В – кермека штамом 1Е.

Додаток 7

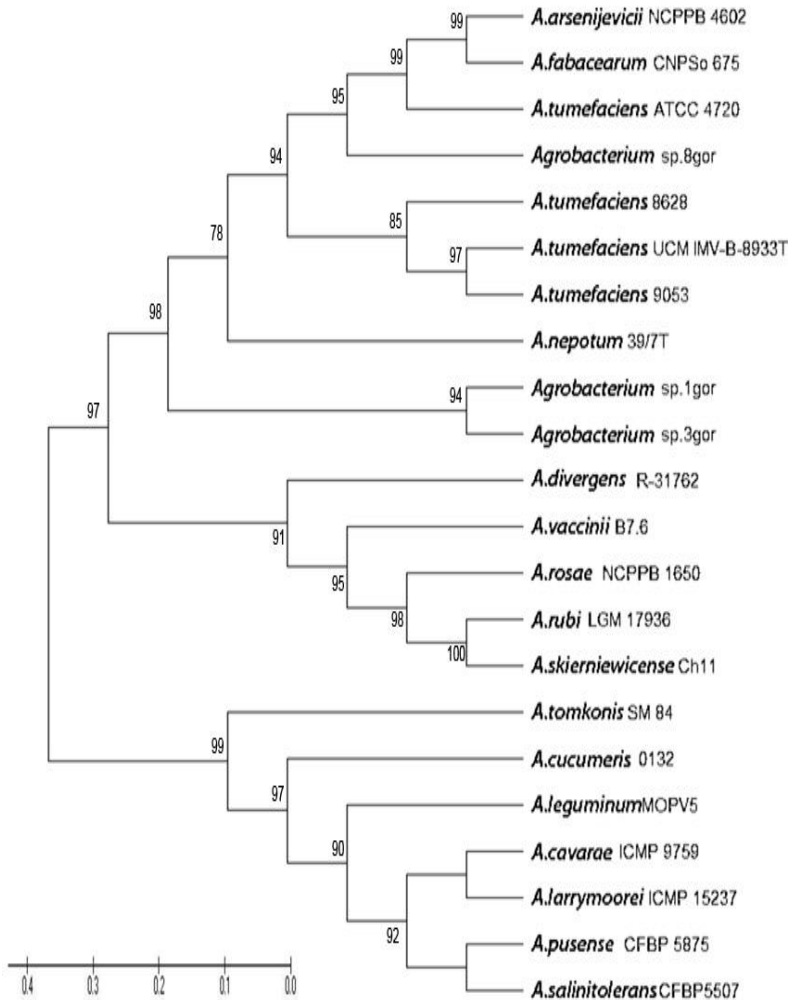


Рисунок 5. Дендрограма філогенетичних зв'язків (аналіз гену 16S рРНК) між ізолюваними штамами *Agrobacterium* sp., колекційними штамами та типовими представниками видів роду *Agrobacterium*

Додаток 8

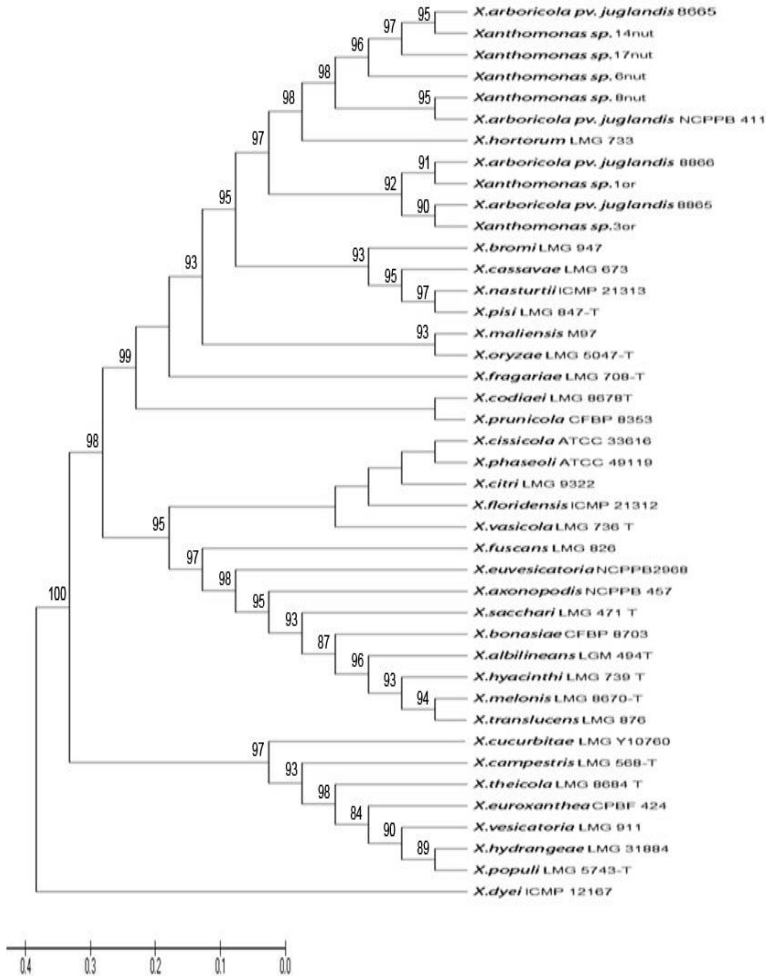


Рисунок 4. Дендрограма філогенетичних зв'язків (аналіз гену 16S рРНК) між ізолюваними штамами *Xanthomonas* sp., колекційними штамами та типовими представниками видів роду *Xanthomonas*

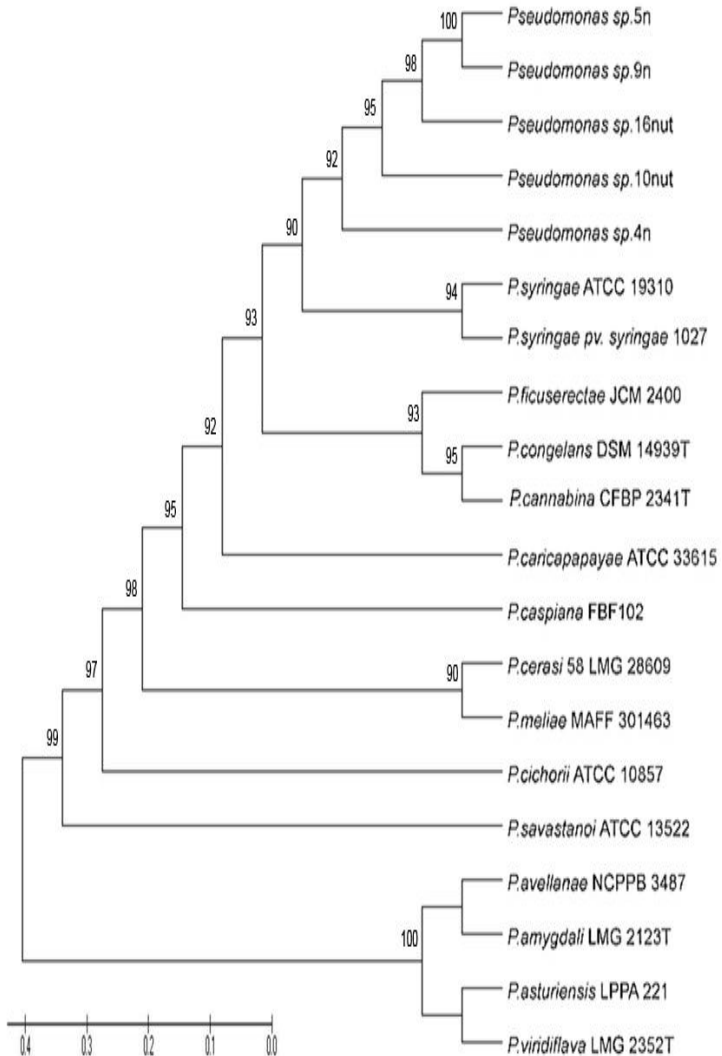


Рисунок 6. Дендрограма філогенетичних зв'язків (аналіз гену 16S рРНК) між ізолюваними штамами *Pseudomonas* sp., колекційними штамами та типовими представниками видів групи «*Pseudomonas syringae*»

Додаток 10

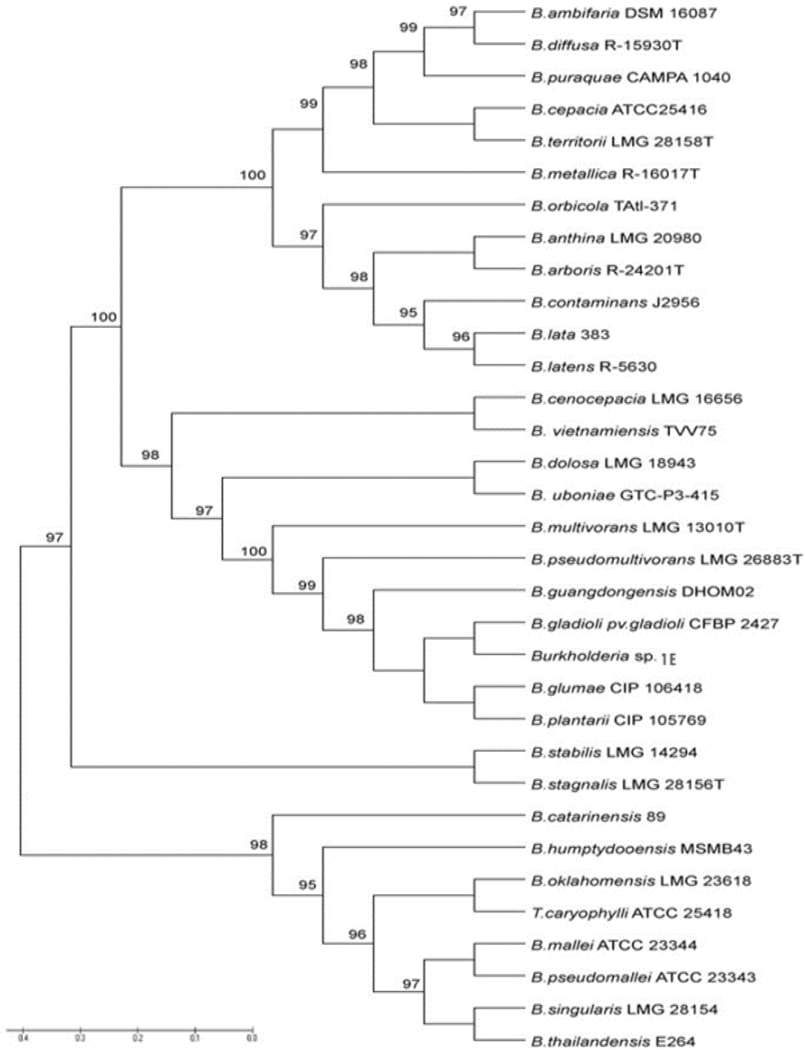


Рисунок 7. Дендрограма філогенетичних (аналіз гену 16S рРНК) зв'язків між ізольованим штамом *Burkholderia* sp., колекційними штамми та типовими представниками родів *Burkholderia* і *Trinickia*.

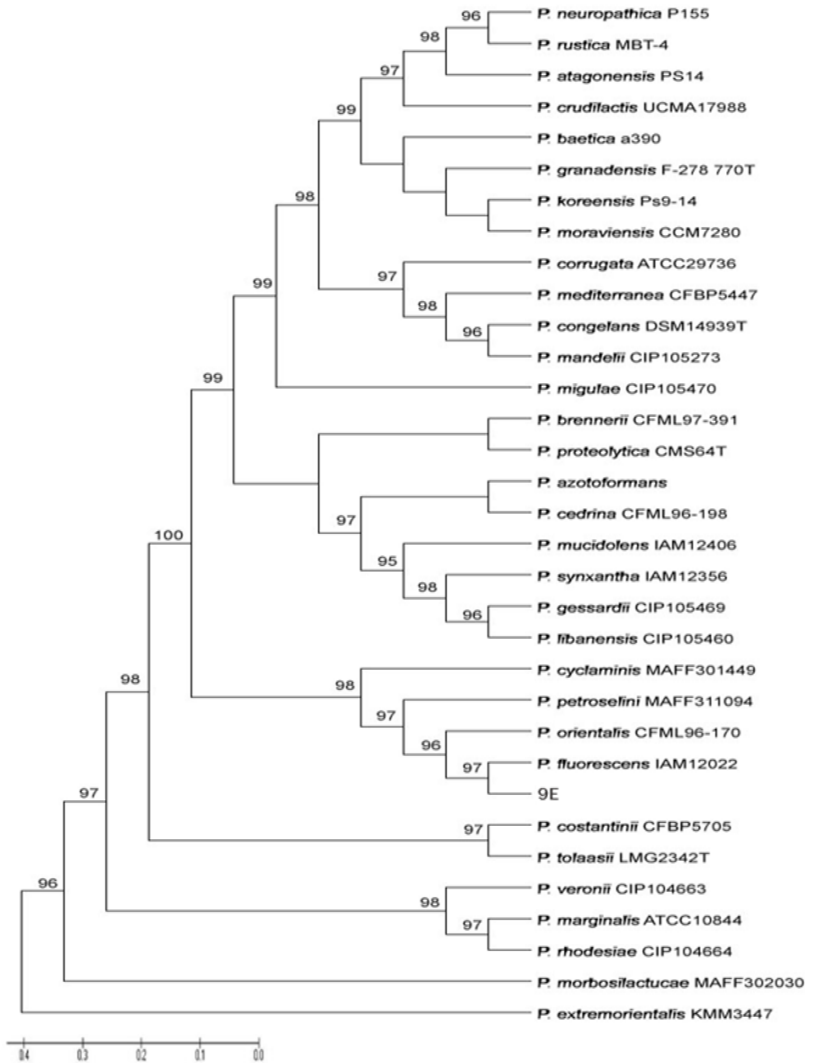


Рисунок 8. Дендрограма філогенетичних (аналіз гену 16S рРНК) зв'язків між ізольованим штамом *Pseudomonas* sp., колекційними штамми та типовими представниками видів групи “*Pseudomonas fluorescens*”.

ДЛЯ ПОДАТОК