

УДК 579 577.115.3 547.313.2

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* ЗА ЕТИЛЕНСИНТЕЗУВАЛЬНОЮ ЗДАТНІСТЮ ТА ЖИРНОКИСЛОТНИМ СКЛАДОМ КЛІТИННИХ ЛІПІДІВ

Л.А. ДАНКЕВИЧ, С.К. ВОЦЕЛКО, О.М. ЗАХАРОВА, В.П. ПАТИКА

*Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України*

*03608 Київ, вул. Академіка Заболотного, 154*

*e-mail: Olga\_zm@ukr.net*

Досліджено етиленсинтезувальну здатність і жирнокислотний склад клітинних ліпідів колекційних та ізолюваних нами з уражених рослин ріпаку штамів фітопатогенних бактерій роду *Xanthomonas*. Показано, що саме спектри жирних кислот ліпідів клітин є важливим хемотаксономічним показником при ідентифікації збудника бактеріозу коренів ріпаку *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

*Ключові слова:* *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, бактеріоз коренів ріпаку, етилен, жирнокислотний склад ліпідів клітин.

Фітопатогенні бактерії є постійними супутниками як культурних, так і дикорослих рослин. Вони спричиняють значні втрати у рослинництві, лісівництві, квітникарстві, помітно знижують урожайність та якість продукції. Тому назріла нагальна необхідність швидкої, точної діагностики й ідентифікації збудників бактеріальних хвороб рослин з метою подальшої ефективної боротьби з ними.

У систематиці мікроорганізмів досі використовують поліфазну таксономію бактерій, що ґрунтується на поетапному визначенні їх подібності за сукупністю морфологічних, культуральних, фізіологічних, біохімічних та генетичних ознак [6]. Проте така ідентифікація тривала й трудомістка. Крім того, багато мікроорганізмів, у тім числі й окремі фітопатогенні бактерії, споріднені за комплексом ознак фенотипу [3], і порівняльна характеристика цілої низки властивостей не дає остаточної відповіді стосовно видового статусу фітопатогенів [3]. Саме тому дуже часто для коректної експрес-ідентифікації окремих збудників бактеріальних хвороб рослин використовують їх здатність синтезувати певні речовини *in vitro*. Як правило, такими вважають фітогормони, токсини, ферменти, ліпополісахариди, ліпіди тощо, які здатні відігравати роль специфічних чинників патогенності низки збудників [2, 5, 10]. Одним із них є етилен, який, як давно відомо синтезують фітопатогенні бактерії [2, 5, 10]. Цю ознаку використовують під час таксономії окремих збудників роду *Pseudomonas* на патоваровому й видовому рівнях [2, 10]. Однак етиленсинтезувальна здатність представників роду *Xanthomonas*, зокрема виду *Xanthomonas campestris*, майже не досліджена.

На думку багатьох науковців, жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів також є важливим видовим і внутрішньовидовим хемо-

таксономічним критерієм, результати якого корелюють із даними молекулярно-генетичних досліджень [3, 4, 6, 10]. Оскільки *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* призводить до найбільших втрат урожаю озимих і ярих сортів ріпаку [1], дослідження його етиленпродукувального потенціалу й жирнокислотного складу клітинних ліпідів дуже актуальне.

У цій роботі ми поставили за мету схарактеризувати етиленсинтезувальну здатність і жирнокислотний склад клітинних ліпідів колекційних і виділених нами штамів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, щоб установити можливість їх використання при ідентифікації досліджуваного збудника.

### Методика

Об'єктами досліджень були сім ізольованих нами з уражених тканин ріпаку штамів фітопатогенних бактерій, що здатні викликати бактеріоз коренів цієї культури. У роботі також використано колекційні штами *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 80036 та 820, отримані з колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Для дослідження етиленсинтезувальної здатності та жирнокислотного складу клітин штамів культивували протягом доби на картопляному агарі. Продукування етилену цими штамми фітопатогенних бактерій визначали у шестиразовій повторності. Склад повітря над стовпчиком агаризованого середовища аналізували газовим хроматографом Chrom-5. Вірулентні властивості штамів вивчали на капусті сорту Амагер та восьми районованих сортах ріпаку вітчизняної селекції (Чорний велетень, Аріон, Марінс, Антарія, Оксамит, Марія, Микитинецький, Лужок). Штучне зараження рослин проводили загальноприйнятими методами. Вірулентність штамів обліковували за розробленою нами раніше 10-бальною шкалою [3]. Для отримання метилових ефірів жирних кислот бактеріальну біомасу гідролізували в 1,5 %-му розчині  $H_2SO_4$  у метанолі протягом 1 год при 80 °C з подальшим дворазовим екстрагуванням сумішшю ефір : гексан (1 : 1). Склад метилових ефірів жирних кислот аналізували в хроматомаспектрометричній системі Hewlett-Packard 5973 й ідентифікували їх за тривалістю утримання порівняно зі стандартами. Стандартами слугували метилові ефіри жирних кислот фірми «Supelco». Вміст жирних кислот визначали у відсотках загальної площі піків за допомогою програмного забезпечення ChemStation.

### Результати та обговорення

У ході досліджень ми виявили, що переважна більшість протестованих штамів здатна продукувати етилен *in vitro* (рис. 1). Штамів, які синтезують значні кількості етилену, не виявлено. Як правило, досліджувані штами продукували середні, малі, або слідові кількості цього фітогормону. Встановлено також, що продукування етилену штамми практично не корелювало з їх агресивністю (рис. 2), тобто ця ознака є штамовою, а не патоваровою й видовою особливістю фітопатогену, що не суперечить літературним даним [2, 10]. Зокрема, чимало дослідників довели, що гени, які контролюють синтез етилену, в більшості мікроорганізмів подібні й локалізовані в плазмідах і зазвичай піддаються горизонтально-

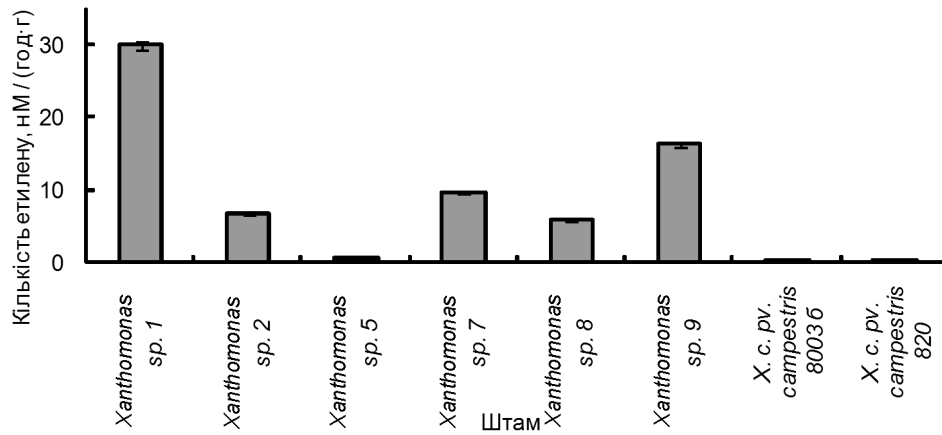


Рис. 1. Діаграма синтезу етилену колекційними *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8003b, 820 та ізольованими нами штамами *Xanthomonas* sp. in vitro

му перенесенню [8]. Отже, етиленсинтезувальна здатність досліджуваних штамів не є вирішальною ознакою при їх таксономії.

У ліпідах клітин колекційних штамів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* і виділених нами штамів *Xanthomonas* sp. виявлено жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга  $C_{10}$ – $C_{18}$ , а саме: ненасичені — гексадецену ( $C_{16:1}$ ), *cis*-9-гексадецену ( $C_{16:1 cis 9}$ ), *cis*-11-оксадецену ( $C_{18:1 cis 11}$ ) *cis*-9-оксадецену ( $C_{18:1 cis 9}$ ); насичені — 9-метилдеканову ( $C_{11:0 iso}$ ), тетрадеканову ( $C_{14:0}$ ), 12-метилтридеканову, пентадеканову ( $C_{15:0}$ ), 13-метилтетрадеканову ( $C_{15:0 iso}$ ), 12-метилтетрадеканову ( $C_{15:0 anteiso}$ ), гексадеканову ( $C_{16:0}$ ), 14-метилпентадеканову ( $C_{16:0 iso}$ ), 15-метилгексадеканову ( $C_{17:0 iso}$ ), 14-метилгексадеканову ( $C_{17:0 anteiso}$ ), *cis*-9-гептадеканову кислоти. У спектрах жирних кислот проявляється циклопропанова кислота з 17 атомами вуглецю ( $C_{17:0 cyclo}$ ) (табл. 1).

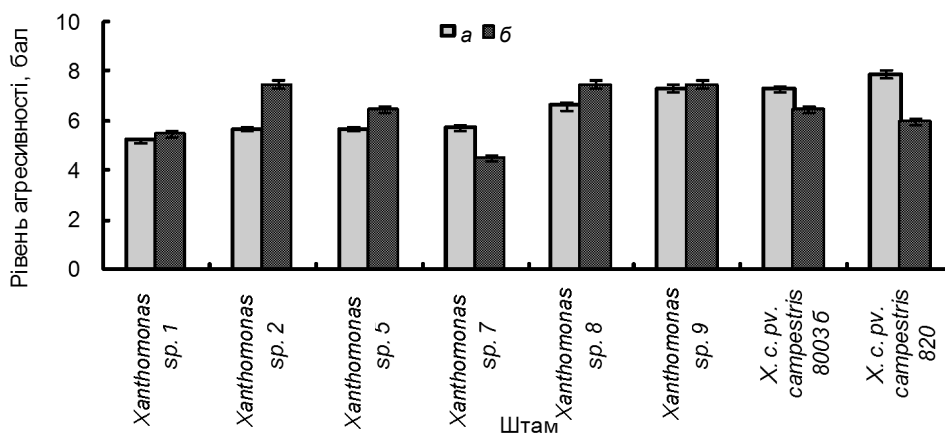


Рис. 2. Діаграма агресивності досліджуваних штамів фітопатогенних бактерій для окремих рослин родини капустяних:

a — районовані сорти ріпаку; b — капуста сорту Амагер

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS*

ТАБЛИЦЯ 1. Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів колекційних та ізолюваних нами штамів фітопатогенних бактерій роду *Xanthomonas*

Жирна кислота	Штам, вид, патовар							
	<i>Xanthomonas</i> sp. 1	<i>Xanthomonas</i> sp. 2	<i>Xanthomonas</i> sp. 5	<i>Xanthomonas</i> sp. 7	<i>Xanthomonas</i> sp. 8	<i>Xanthomonas</i> sp. 9	<i>X.campestris</i> pv. <i>campestris</i> 80036	<i>X.campestris</i> pv. <i>campestris</i> 820
C <sub>11:0</sub>	0,88	1,07	1,25	1,05	1,17	0,96	0,73	1,02
C <sub>14:0 iso</sub>	1,11	1,88	1,51	1,87	1,73	1,25	0,98	1,90
C <sub>14:0</sub>	1,0	1,59	1,57	1,34	1,39	1,09	1,40	1,48
C <sub>15:0 iso</sub>	17,23	18,55	14,11	17,78	20,66	16,92	15,94	16,50
C <sub>15:0 anteiso</sub>	15,60	14,40	9,84	14,52	14,07	16,12	18,44	13,90
C <sub>15:0</sub>	6,76	6,76	2,22	7,46	7,62	6,71	0,86	5,53
C <sub>16:0 iso</sub>	7,95	8,88	14,44	10,15	8,61	7,79	11,44	11,12
C <sub>16:1 cis 9</sub>	1,77	2,24	3,95	1,88	1,67	1,64	1,27	2,04
C <sub>16:1</sub>	24,44	25,27	29,24	23,10	22,42	25,18	30,24	28,01
C <sub>16:0</sub>	9,45	9,14	10,12	7,39	6,87	9,08	8,37	8,35
C <sub>18:1 cis 9</sub>	4,46	3,18	4,08	3,59	3,72	4,07	4,89	3,25
C <sub>17:0 iso</sub>	5,18	3,65	2,92	4,31	4,08	5,00	3,73	3,17
C <sub>17:0 anteiso</sub>	2,89	1,56	2,48	1,84	1,86	2,59	0,92	—
C <sub>17:0 cyclo</sub>	—	—	0,92	—	—	—	0,80	1,45
C <sub>17:0 cis 9, 10</sub>	—	—	0,50	0,73	0,80	—	—	0,42
C <sub>18:1 cis 11</sub>	—	—	—	—	—	—	—	0,40

Примітка. Вміст жирних кислот вказано у відсотках загальної площі піків.

Згідно з літературними даними, особливістю складу клітин представників роду *Xanthomonas* є велика кількість насичених і ненасичених жирних кислот (iso- й anteiso-форми) з розгалуженими ланцюгами [6, 9]. Зокрема у праці [9] зазначено, що серед розгалужених жирних кислот у представників роду *Xanthomonas* домінують 13-метилтетрадеканова (C<sub>15:0 iso</sub>) та 12-метилтетрадеканова (C<sub>15:0 anteiso</sub>) кислоти. У результаті порівняльного аналізу отриманих нами й літературних даних [6, 9] також виявлено, що жирнокислотні профілі *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* і споріднених видів відрізняються від решти представників роду *Xanthomonas* саме вмістом 13-метилтетрадеканової кислоти. Так, для штамів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* її вміст у ліпідах клітин менший за 30 % і переважно коливається в межах 20—25 % загальної площі піків. Крім того, у спектрах жирних кислот досліджуваних штамів вміст 15-метилгексадеканової (C<sub>17:0 iso</sub>) кислоти значно вищий, ніж 14-метилгексадеканової (C<sub>17:0 anteiso</sub>). Ще однією особливістю складу клітинних ліпідів є вміст тетрадеканової кислоти (C<sub>14:0</sub>), який у представників виду *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* становить близько 1,5 % загальної площі піків, а в решти споріднених видів і патоварів дещо відрізняється. Згідно з даними праці [9], співвідношення гексадеканової й гексадеценнової жирних кислот у *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* і близькоспоріднених видів коливається від 0,3 до 0,4. Це цілком підтверджено от-

ТАБЛИЦЯ 2. Подібність окремих показників жирнокислотних профілів колекційних та ізольованих нами штамів фітопатогенних бактерій роду *Xanthomonas*

Штам	Вміст		
	C <sub>15:0 iso</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub> /C <sub>16:1</sub>
Колекційні штами <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	16,22±0,50	1,44±0,08	0,29±0,01
Виділені нами штами <i>Xanthomonas</i> sp.	17,54±1,8	1,33±0,19	0,35±0,02

риманими нами результатами для досліджених штамів *Xanthomonas* sp. (табл. 2). Найвірогідніше вони є представниками однойменного патовару виду *Xanthomonas campestris*. Показано [9], що для представників роду *Xanthomonas* і споріднених видів визначальною є наявність у складі клітинних ліпідів 3-гідрокси-9-метилдеканової (C<sub>11:0 iso 3-OH</sub>), 3-гідроксидодеканової (C<sub>12:0 3-OH</sub>), 3-гідрокси-11-метилдодеканової кислот. Однак в останньому виданні визначника бактерій Берджи при описі характерних ознак бактерій цього роду, зокрема жирнокислотних профілів клітин, саме якісний і кількісний склад оксикислот не зазначені [6]. Згідно з літературними даними, наявність і вміст цих кислот у жирнокислотних профілях клітин — найлабільніша ознака, що значною мірою залежить від методу виділення, середовища культивування й навіть екологічної ніші, з якої ізольовано штам [7]. Крім того, представникам роду *Xanthomonas* властиво багато інших особливостей жирнокислотних спектрів клітин, стійкіших до зовнішніх чинників [6, 9].

Отже, в результаті порівняльного дослідження етиленсинтезувальної здатності збудника бактеріозу коренів ріпаку і жирнокислотного складу його клітин доведено, що для коректної хемотаксономії та ідентифікації цього фітопатогену на видовому й патоваровому рівнях вирішальною є саме композиція жирних кислот клітинних ліпідів.

1. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М. та ін. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В.П. Патики. — К.: ТОВ «НВП Інтерсервіс», 2011. — 444 с.
2. Данкевич Л.А. Продукування етилену патогенними для бобових патоварами роду *Pseudomonas* in vitro // Матеріали Міжнар. конф. daRostim. Мікробні технології: актуальність і майбутнє (19—22 листопада 2012). — К.: Нічлава, 2012. — С. 105—106.
3. Данкевич Л.А. Фенотипні та генотипні властивості збудника бурої бактеріальної плямистості люпину // Мікробіол. журн. — 2006. — 68, № 6. — С. 20—27.
4. Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных / З.П. Васюренко, А.Ф. Фролов, В.В. Смирнов, Н.М. Рубан. — К.: Наук. думка, 1992. — 253 с.
5. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. — 2006. — 42, № 3. — С. 261—268.
6. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. — N.Y.: Springer, 2005. — 2. — 1108 p.
7. Dookum A., Stead D.E., Autrey L.J. Variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* from Mauritius and other countries based on fatty acid analysis // Syst. Appl. Microbiol. — 2000. — 23, N 1. — P. 148—155.
8. Nagahama K., Yoshino K., Matsuoka M. et al. Ethylen production by strains of plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presense of indigenous plasmids carrying homologouse gene for the ethylene-forming enzyme // Microbiology. — 1994. — N 140. — P. 2309—2313.
9. Stead D.E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* ssp. by using cellular fatty acid profiles // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1992. — 42, N 2. — P. 281—295.
10. Weingart H., Volksch B. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars in vitro and on planta // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — 63, N 1. — P. 156—161.

Отримано 11.04.2013

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* ПО  
ЭТИЛЕНСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ И ЖИРНОКИСЛОТНОМУ СОСТАВУ  
КЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ

Л.А. Данкевич, С.К. Воцелко, О.М. Захарова, В.Ф. Патыка

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины, Киев

Исследована этиленсинтезирующая способность и жирнокислотный состав клеточных липидов коллекционных и изолированных нами из пораженных растений рапса штаммов фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*. Показано, что именно спектры жирных кислот липидов клеток являются важным хемотаксономическим показателем при идентификации возбудителя бактериоза корней рапса *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

IDENTIFICATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* BY ETHYLENE  
SYNTHESIZE ABILITY AND FATTY ACID COMPOSITION OF CELL LIPIDS

L.A. Dankevich, S.K. Votselko, O.M. Zakharova, V.Ph. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine  
154 Akad. Zabolotny St., Kyiv, 03608, Ukraine

The ethylene synthesise ability and fatty acid composition of cell lipids of collection and isolated from the diseased rape plants strains of pathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* have been investigated. It has been shown that the fatty acid spectrum of cell lipids is an important marker for identification of the rape roots bacteriosis agent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

*Key words:* *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, rape roots bacteriosis, ethylene, fatty acid composition of cell lipids.