

А. В. Кантерова¹, У. В. Фальковская¹, В. Н. Копиця², Г. И. Новик¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

²Международный государственный экологический институт имени А.Д.Сахарова
Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

РАЗВИТИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Специализированная коллекция фитопатогенных микроорганизмов создана на базе Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Исследование биоразнообразия фитопатогенных микроорганизмов и пополнение фонда специализированной коллекции способствует разработке экологически безопасных способов защиты растений от экономически значимых болезней и значительно ускоряет селекционно-генетический процесс по выведению устойчивых сортов.

➤ **Ключевые слова:** фитопатогены, бактерии, изоляты, лиофилизация, криоконсервация, физиолого-морфологические свойства, идентификация.

Введение

Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов (БKM), является центральным депо-зитарием референтных, типовых и промышленно ценных штаммов микроорганизмов в Республике Беларусь, имеет статус объекта национального достояния. БKM – единственная государственная коллекция, зарегистрированная во Всемирной федерации коллекций культур, представленной в настоящее время 700 коллекциями из 72 стран мира. БKM включает следующие коллекции: коллекция бактерий, коллекция бактериофагов, коллекция мицелиальных грибов, коллекция дрожжевых грибов. Коллекционный фонд насчитывает более 2000 культур микроорганизмов различных таксономических групп, из которых 1070 штаммов бактерий, 70 штаммов бактериофагов, 636 штаммов мицелиальных грибов, 240 штаммов дрожжевых грибов.

Расширение экономических, торговых связей между государствами, глобальное потепление климата существенно повышают возможность распространения болезней растений. Ежегодно ухудшающаяся экологическая ситуация и фитосанитарная нестабильность в Беларуси, России, и ряде других стран требуют новых идей и подходов к разработке эффективной системы биологической защиты [1]. В современных условиях развития сельского хозяйства особую актуальность приобретает использование не только традиционных химических удобрений, но и микробиологических препаратов [2]. Продовольственная и биологическая безопасность во многом зависит от четкого и постоянного контроля над фитосанитарным состоянием не только окружающей среды в целом, но и сельскохозяйственных растений и продуктов их переработки. Для разработки эффективных мер по защите сельскохозяйственных культур от болезней необходимо знание биологической природы их возбудителей. Поэтому актуальными и практически значимыми являются исследования, направленные на генетическую идентификацию микроорганизмов, вызывающих заболевания растений. Концепция интегрированного управления фитосанитарным состоянием агроэкосистем основывается на сохранении и рациональном использовании генетических ресурсов, как полезных микроорганизмов, так и вредных – в целях создания искусственных фонов, необходимых для их изучения, а также при селекции устойчивых сортов, разработке биологических и химических средств защиты растений [3]. Для поддержания генетических ресурсов и генетического разнообразия полезных и вредных организмов созданы генофондовые коллекции, в которых маточные культуры содержатся в виде живого материала, а при длительном хранении – в криоконсервированном и лиофилизированном виде.

Сотрудниками Института микробиологии НАН Беларуси на базе БKM создана и успешно функционирует специализированная коллекция фитопатогенных микроорганизмов, насчитывающая более 100 штаммов фитопатогенных грибов и бактерий, депонированных по формам «Хранение» и «Гарантийное хранение». Штаммы являются возбудителями корневых гнилей, гнилей плодов, пятнистостей и других заболеваний основных сельскохозяйственных культур и представлены следую-

щими родами: *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Didymella*, *Diplodia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gloeosporium*, *Helmintosporium*, *Heterobasidion*, *Monilia*, *Neofabria*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora*, *Plectosphaerella*, *Pleiochaeta*, *Pleospora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sphaeropsis*, *Verticillium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Serratia*.

В 2014–2015 гг. в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» на постоянной основе выполнялась работа по поддержанию и пополнению специализированной коллекции.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования являлись культуры микроорганизмов, выделенные из клубней топинамбура с различными признаками бактериального поражения.

Микроорганизмы выращивали при 28–30 °С в течение 24 ч на стандартных питательных средах [4].

Микробиологический анализ образцов инфицированных тканей растений (№ 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9) проводили по общепринятой методике [5].

Лиофилизация бактерий

Лиофилизацию проводили на сублимационной установке Modulyo 4K («Edwards», Великобритания). Клетки бактерий, выращенные на скошенной среде МПА в течение 48 часов, смывали 2–3 мл протекторной среды, асептически разливали в стерильные ампулы для лиофилизации (по 0,2 мл). В качестве протектора применяли 10% обезжиренное молоко. Лиофилизацию проводили в две стадии. Первую стадию осуществляли при температуре рефрижератора –55 °С и глубине вакуума 8×10^{-2} mbar в течение 5 часов. Вторую стадию, досушивание клеток, проводили при температуре 20 °С и глубине вакуума 8×10^{-2} mbar в течение 2,5 часов. Ампулы с лиофилизированными культурами хранили при 4 °С.

Низкотемпературная консервация бактерий

Низкотемпературную консервацию бактерий проводили по следующей схеме: клетки бактерий, выращенные на скошенной среде МПА в течение 48 часов, смывали 2–3 мл протекторной среды, замораживали при –70 °С. В качестве криопротекторной среды использовали 10% раствор сахарозы. Криоконсервированные культуры хранили при –70 °С в ультранизкотемпературном холодильнике Revko (США).

Выживаемость культур после консервации определяли по общепринятым методикам [6].

Биохимические методы

Определение наличия каталазы проводили по следующей методике. На предметное стекло наносили каплю 1–3% раствора перекиси водорода и вносили в нее петлю с бактериальной культурой. Выделение пузырьков кислорода свидетельствует о наличии у данного вида бактерий фермента каталазы.

Тест на наличие оксидазы проводили с коммерческим набором (ErbaLachema)

Для выявления факторов патогенности у бактерий определяли наличие протеолитической, липолитической, целлюлолитической, амилолитической активности и способности мацерировать растительную ткань. Липолитическую активность исследовали на среде МПА, содержащей твин-80 или твин-20. Амилолитическую активность определяли на среде МПА с добавлением 0,2% растворимого крахмала. Для выявления целлюлолитических ферментов использовали среду МПА, содержащую целлюлозу (0,1%). Для определения протеолитических ферментов применяли кальциево-казеиновый агар (Conda) [7].

Хромосомную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, США), согласно прилагаемой инструкции.

Полимеразная цепная реакция

Для амплификации нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК использовали праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttacctgttacgactt-3'). Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 1 мкл ДНК-матрицы, 3 мкл 10×буфера для Таq-полимеразы, 3 мкл смеси дНТФ (2 мМ), по 10 пМ каждого праймера, 0,5 мкл (2,5 ед.) Таq-полимеразы. В работе использовали праймеры и реагенты производства «Праймтех» (Беларусь).

Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере Eppendorf Mastercycler epgradientS (Германия) с использованием активного точного режима регулирования и следующего температурно-временного профиля: денатурация – 5 мин. при 94 °С; 30 циклов элонгации – 94 °С – 20 сек, 50 °С – 20 сек, 72 °С – 90 сек, достройка цепи – 3 мин. при 72 °С; охлаждение до 4 °С.

Для очистки амплифицированных фрагментов генов использовали набор MinElute PCR Purification Kit (Qiagen), согласно прилагаемой инструкции.

Молекулярное типирование осуществляли с помощью ПЦР повторяющихся межгенных последовательностей (ERIC-ПЦР) с праймерами ERIC-1 (5'-atgtaagctcctggggattcac-3') и ERIC-2 (5'-aagtaagtgtactgggggtgagcg-3'), BOX-ПЦР с праймером BOX (5'-ctacggcaaggcgacgctgacg-3') с использованием активного точного режима регулирования и следующего температурно-временного профиля:

денатурация – 5 мин. при 94 °С; 35 циклов элонгации – 94 °С – 20 сек, 43–49 °С – 20 сек, 72 °С – 90 сек, достройка цепи – 3 мин. при 72 °С; охлаждение до 4 °С.

Электрофоретический анализ

Образцы ДНК и продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле (AppliChem, Германия) с использованием 1×трис-ацетатного буфера при напряженности электрического поля 5 В/см. Для визуализации ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия (AppliChem, Германия) в концентрации 0,05 мкг/мл. В качестве стандартов для определения размера продуктов ПЦР применяли маркеры молекулярной массы фрагментов ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix, GeneRuler DNA Ladder 1Kb Plus, GeneRuler DNA Ladder 1Kb (Fermentas, Литва). Анализ продуктов ПЦР и расчет длин фрагментов ДНК осуществляли с помощью системы документирования гелей и программного обеспечения INFINITY (Vilber Lourmat, Германия).

Для определения концентрации ДНК к 198 мкл 1-кратного раствора интеркалирующего красителя ZUBR Green-1 («Праймтех», Беларусь) в ТЕ-буфере (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) добавляли 2 мкл раствора ДНК, интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин. Измерение проводили с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen», США), согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей

Реакцию секвенирования проводили по методу Сэнгера с использованием набора реагентов для секвенирования USB Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Li-COR) согласно прилагаемой инструкции. Разделение и анализ продуктов секвенирования проводили с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer. Компьютерная обработка результатов секвенирования, их редактирование и предоставление в форматах FASTA, Genbank, Plain text осуществляли с помощью программы e-Seq™ Software.

Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей проводили с использованием базы данных GenBank и программы BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Принадлежность исследуемого микроорганизма к определенному виду устанавливается при уровне гомологии его нуклеотидной последовательности с референтными нуклеотидными последовательностями микроорганизмов данного вида 97% и более. Определение родства микроорганизмов и построение филогенетических деревьев проводили при помощи компьютерной программы, находящейся на сайте (Ribosomal Database Project II (RDB II) (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)).

Результаты исследований и их обсуждение

С целью пополнения коллекционного фонда фитопатогенными бактериями, циркулирующими на территории Беларуси, из клубней топинамбура с признаками бактериального поражения выделена 21 чистая культура бактерий, предположительно являющихся возбудителями инфекционного заболевания.

Изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных культур показало, что они представляют собой грамотрицательные неспорообразующие палочки, аэробы, с окислительным типом метаболизма. Тринадцать штаммов продуцировали каталазу и оксидазу, у семи из них выявлена продукция внеклеточных диффундирующих в среду желто-зеленых и коричневых пигментов, что позволило отнести данные культуры к семейству *Pseudomonadaceae*. Восемь штаммов являлись оксидазоотрицательными, каталазоположительными, внеклеточных пигментов не образовывали, и на основании перечисленных признаков были идентифицированы как представители семейства *Enterobacteriaceae*.

С целью выявления факторов патогенности у бактериальных культур, выделенных из пораженных клубней топинамбура, исследованы их протеолитическая, липолитическая, амилолитическая и целлюлолитическая активность. Результаты представлены в табл. 1.

По наличию определенной ферментативной активности анализируемые штаммы были разделены на следующие группы:

- штаммы, обладающие протеолитической активностью: 1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 3н-1, 3н-2, 3н-3, 3к-3, 4-2, 4-3, 5-2, 5-3, 5-4, 8-1, 8-3, 8у-1, 9-3, 9-4;
- штаммы, характеризующиеся наличием целлюлолитической активности: 4-2, 4-3, 5-4;
- штаммы, обладающие липолитической активностью (твин-20): 1-2, 1-3, 2-к, 3н-1, 3н-3, 4-2, 4-3, 3к-3, 5-2, 5-4, 8у-1, 9-1, 9-2;
- штаммы, обладающие липолитической активностью (твин-80): 1-2, 1-3, 2-к, 3н-1, 3н-3, 3к-3, 5-2, 5-3, 5-4;
- штаммы, обладающие амилолитической активностью: 1-3, 8-1, 9-3.

Физиолого-биохимическая характеристика изолятов,
выделенных из клубней топинамбура с признаками Бактериозов

Изолят	Протеолитическая активность, см	Амилолитическая активность, см	Целлюлолитическая активность	Липолитическая активность (твин-20)	Липолитическая активность (твин-80)
1-1	0,7	—	—	—	—
1-2	1,0	—	—	+	+
1-3	1,5	1,0	—	+	+
2-1	0,5	—	—	—	—
2-к	—	—	—	+	+
3н-1	0,5	—	—	+	+
3н-2	1,0	—	—	—	—
3н-3	2,5	—	—	+	+
3к-3	1,2	—	—	+	+
4-2	1,0	—	+	+	—
4-3	1,0	—	+	+	—
5-2	1,0	—	—	+	+
5-3	2,0	—	—	—	+
5-4	1,0	—	+	+	+
8-1	0,5	1,5	—	—	—
8-3	0,5	—	—	—	—
8-у	1,0	—	—	+	—
9-1	—	—	—	+	—
9-2	—	—	—	+	—
9-3	1,0	1,2	—	—	—
9-4	1,0	-	—	—	—

Примечание: «+» – положительная реакция, «–» – отрицательная реакция

Следует отметить, что штаммы 1-3, 4-2, 4-3, 5-4 продуцировали наиболее широкий спектр внеклеточных ферментов, участвующих в развитии симптомов бактериозов у растений, – протеазы, целлюлазы, липазы, амилазы.

Способность выделенных бактериальных культур продуцировать комплекс ферментов, участвующих в развитии заболеваний у растений, подтверждает, что они являются фитопатогенными.

Проведена молекулярно-генетическая идентификация выделенных культур фитопатогенных бактерий на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

В результате амплификации на матрице геномной ДНК исследуемых культур с праймерами 8f и 1492г получены ПЦР-продукты размером ~1500 п.н., что соответствует полной нуклеотидной последовательности целевого гена. С помощью секвенирования определена нуклеотидная последовательность проксимального участка (~800 п.н.) амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК, содержащего вариабельную V1–V3 область. С использованием программы BLAST и информационных ресурсов международной базы данных GenBank проведен филогенетический анализ секвенированных последовательностей. Результаты представлены в табл. 2.

Установлено, что 10 штаммов относятся к виду *Pseudomonas* sp., 5 штаммов – виду *Stenotrophomonas* sp., 2 штамма – виду *Serratia* sp., 2 штамма – виду *Ewingella americana*, 1 штамм – виду *Xanthomonas* sp., 1 штамм – *Rahnella* sp. Полученные результаты согласуются со сведениями литературы о том, что бактерии родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* являются наиболее распространенными и вредоносными фитопатогенными микроорганизмами, поражающими широкий круг сельскохозяйственных и декоративных культур [4]. Имеются данные, что некоторые представители рода *Serratia*, обитающие в почве, например *Serratia marcescens* и *Serratia rubidaea*, могут вызывать бактериозы лукович тюльпана [8]. Недавние исследования показали, что бактерии вида *Ewingella americana*, долгое время считавшиеся возбудителями заболеваний человека, могут вызывать бактериозы лука и тюльпана [9].

Результаты молекулярно-генетической идентификации бактерий,
выделенных из клубней топинамбура с признаками бактериозов

Изолят	Результаты идентификации
1-1	<i>Pseudomonas grimontii</i> (99%); <i>Pseudomonas marginalis</i> (99%); <i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
1-2	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)
1-3	<i>Xanthomonas</i> sp. (99%)
2-1	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)
2-к	<i>Rahnella</i> sp. (99%)
3н-1	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (98%); <i>Pseudomonas</i> sp. (98%); <i>Pseudomonas umsongensis</i> (98%); <i>Pseudomonas fluorescens</i> (98%)
3н-2	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (97%); <i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> (97%)
3н-3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (99%)
3к-3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (94%)
4-3	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)
5-2	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (97%)
5-3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (97%); <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (97%)
5-4	<i>Serratia</i> sp. (99%); <i>Serratia plymuthica</i> (99%)
8-1	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)
8-3	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
8-у	<i>Serratia plymuthica</i> (97%); <i>Serratia</i> sp. (97%)
9-1	<i>Ewingella americana</i> (99%)
9-2	<i>Ewingella americana</i> (99%)
9-3	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> (99%); <i>Pseudomonas grimontii</i> (99%); <i>Pseudomonas marginalis</i> (99%); <i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
9-4	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)

Для выявления генетической гетерогенности бактериальных культур, выделенных из пораженных клубней топинамбура, выполнено их молекулярное типирование с использованием методов ER-IC-ПЦР и BOX-ПЦР.

При проведении BOX-ПЦР для анализируемых культур бактерий получены штаммоспецифичные фингерпринты, содержащие от 2 до 9 фрагментов размером 360–3000 п.н. (рис. 1). Для штамма 3н-1 BOX-фингерпринт был нечетким, для штаммов 4-2, 4-3, 8-3, 9-4 и 5-4, 8-у – идентичными. Для других анализируемых штаммов получены уникальные фингерпринты, содержащие набор отличающихся ПЦР-продуктов и отражающие генетическую гетерогенность культур.

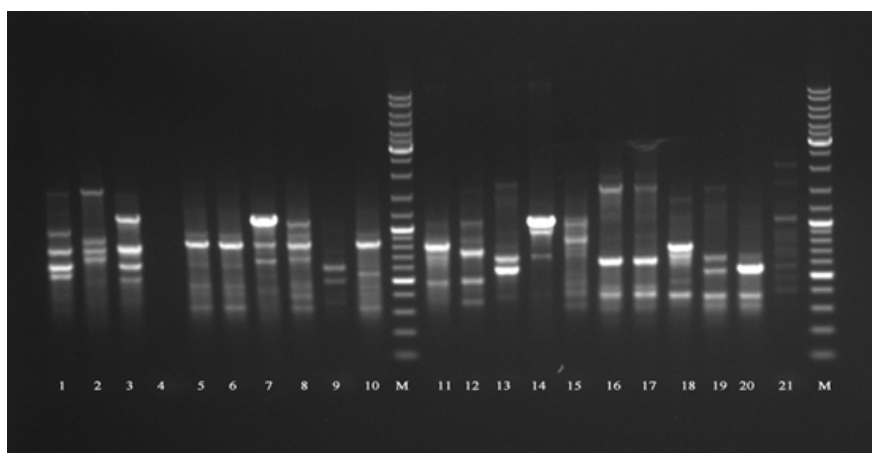


Рисунок 1 – Электрофореграмма BOX-ПЦР фингерпринтов бактериальных культур, выделенных из клубней топинамбура с признаками бактериоза; 1 – *Pseudomonas* sp. 1-1, 2 – *Pseudomonas* sp. 1-2, 3 – *Pseudomonas* sp. 2-1, 4 – *Pseudomonas* sp. 3н-1, 5 – *Pseudomonas* sp. 4-2, 6 – *Pseudomonas* sp. 4-3, 7 – *Pseudomonas* sp. 8-1, 8 – *Pseudomonas* sp. 8-3, 9 – *Pseudomonas* sp. 9-3, 10 – *Pseudomonas* sp. 9-4, 11 – *Stenotrophomonas* sp. 3н-2, 12 – *Stenotrophomonas* sp. 3н-3, 13 – *Stenotrophomonas* sp. 3к-3, 14 – *Stenotrophomonas* sp. 5-2, 15 – *Stenotrophomonas* sp. 5-3, 16 – *Serratia* sp. 5-4, 17 – *Serratia* sp. 8-у, 18 – *Rahnella* sp. 2-к, 19 – *Ewingella americana* 9-1, 20 – *Ewingella americana* 9-2, 21 – *Xanthomonas* sp. 1-3, M – маркер молекулярной массы ДНК 0'GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use

В ERIC-фингерпринтах анализируемых штаммов также присутствовало 2–9 фрагментов размером 100–2200 п.н. (рис. 2). Для штаммов 8-4, 9-1 ERIC-фингерпринты были не четкими, для штаммов

4-2, 4-3, 8-3, 9-4 и 5-4, 8-у – идентичными. ERIC–фингерпринты других штаммов отличались по количеству и размеру ПЦР-фрагментов и позволяли их дифференцировать.

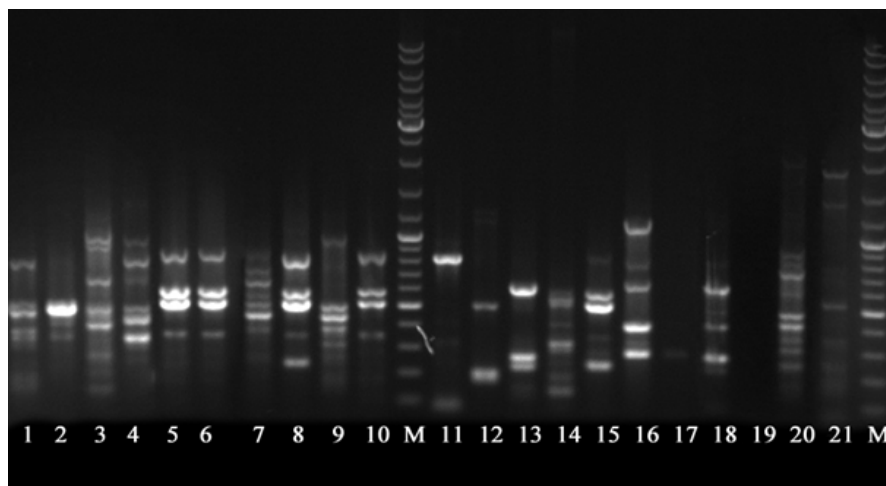


Рисунок 2 – Электрофореграмма ERIC–ПЦР фингерпринтов бактериальных культур, выделенных из клубней топинамбура признаками бактериоза, 1 – *Pseudomonas* sp. 1-1, 2 – *Pseudomonas* sp. 1-2, 3 – *Pseudomonas* sp. 2-1, 4 – *Pseudomonas* sp. 3н-1, 5 – *Pseudomonas* sp. 4-2, 6 – *Pseudomonas* sp. 4-3, 7 – *Pseudomonas* sp. 8-1, 8 – *Pseudomonas* sp. 8-3, 9 – *Pseudomonas* sp. 9-3, 10 – *Pseudomonas* sp. 9-4, 11 – *Stenotrophomonas* sp. 3н-2, 12 – *Stenotrophomonas* sp. 3н-3, 13 – *Stenotrophomonas* sp. 3к-3, 14 – *Stenotrophomonas* sp. 5-2, 15 – *Stenotrophomonas* sp. 5-3, 16 – *Serratia* sp. 5-4, 17 – *Serratia* sp. 8-у, 18 – *Rahnella* sp. 2-к, 19 – *Ewingella americana* 9-1, 20 – *Ewingella americana* 9-2, 21 – *Xanthomonas* sp. 1-3, М – маркер молекулярной массы ДНК 0'GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use

Идентичность BOX– и ERIC–фингерпринтов культур 4-2, 4-3, 8-3, 9-4 свидетельствует, что, не смотря то, что они выделены из различных образцов, это один штамм. Аналогичное заключение можно сделать для культур 5-4 и 8-у.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования методов ERIC– и BOX–ПЦР для выявления внутривидового генетического полиморфизма фитопатогенных бактерий с целью мониторинга и контроля бактериальных инфекций сельскохозяйственных и декоративных культур.

С целью обеспечения длительного хранения выделенных штаммов фитопатогенных бактерий выполнена лиофилизация и низкотемпературная консервация культур.

Контроль жизнеспособности фитопатогенных бактерий после хранения методами лиофилизации и низкотемпературной консервации показал, что в целом для всех штаммов микроорганизмов характерен высокий уровень жизнеспособности (10^8 – 10^9 КОЕ/мл).

Штаммы выделенных фитопатогенных бактерий депонированы в БКМ по форме «гарантийное хранение». Депонированным штаммам бактерий присвоены регистрационные номера в БКМ (табл. 3).

Таблица 3

Коллекционные номера депонированных культур

Культура	Номер по БИМ
<i>Pseudomonas</i> sp. 1-1	<i>Pseudomonas</i> sp. БИМ В–962
<i>Pseudomonas</i> sp. 1-2	<i>Pseudomonas</i> sp. БИМ В–963
<i>Pseudomonas</i> sp. 2-1	<i>Pseudomonas</i> sp. БИМ В–949
<i>Pseudomonas</i> sp. 3н-1	<i>Pseudomonas</i> sp. БИМ В–964
<i>Pseudomonas</i> sp. 4-2	<i>Pseudomonas</i> sp. БИМ В–952
<i>Pseudomonas</i> sp. 8-1	<i>Pseudomonas</i> sp. БИМ В–956
<i>Pseudomonas</i> sp. 9-3	<i>Pseudomonas</i> sp. БИМ В–967
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 3н-2	<i>Stenotrophomonas</i> sp. БИМ В–965
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 3н-3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. БИМ В–966
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 3к-3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. БИМ В–951
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 5-2	<i>Stenotrophomonas</i> sp. БИМ В–953
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 5-3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. БИМ В–954
<i>Serratia</i> sp. 5-4	<i>Serratia</i> sp. БИМ В–955
<i>Rahnella</i> sp. 2-к	<i>Rahnella</i> sp. БИМ В–950

Выделенные и охарактеризованные культуры фитопатогенных бактерий введены в фонд специализированной коллекции фитопатогенных микроорганизмов.

Выводы

Из клубней топинамбура с признаками бактериального поражения выделена 21 чистая культура бактерий, предположительно являющихся возбудителями инфекционного заболевания. С целью выявления факторов патогенности у бактериальных культур, выделенных из пораженных тканей, исследованы их протеолитическая, липолитическая, амилалитическая и целлюлолитическая активность. Способность выделенных бактериальных культур продуцировать комплекс ферментов, участвующих в развитии заболеваний у растения, подтверждает, что они являются фитопатогенными.

На основании изучения морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также данных анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рНК 10 штаммов идентифицированы как *Pseudomonas* sp., 5 штаммов – *Stenotrophomonas* sp., 2 штамма – *Serratia* sp., 2 штамма – *Ewingella americana*, 1 штамм – *Xanthomonas* sp., 1 штамм – *Rahnella* sp. С помощью молекулярного типирования (BOX– и ERIC–ПЦР) исследована внутривидовая (штаммовая) генетическая гетерогенность выделенных культур. Контроль жизнеспособности вновь выделенных фитопатогенных бактерий после хранения методами лиофилизации и низкотемпературной консервации показал, что, в целом, все штаммы микроорганизмов сохранили высокую жизнеспособность (10^8 – 10^9 КОЕ/мл).

Исследование биоразнообразия фитопатогенных микроорганизмов и пополнение фонда специализированной коллекции способствует разработке экологически безопасных способов защиты растений от экономически значимых болезней и значительно ускоряет селекционно-генетический процесс по выведению устойчивых сортов.

Список литературы

1. Stewart, A. Commercial biocontrol – reality or fantasy? / A. Stewart // Australasian Plant Pathology. – 2001. – № 30. – Pp. 127–131.
2. Biological control of root pathogens in soilless culture using bacteria / R. Grosch [et al.] // Acta Hort. (ISHS). – 2001. – Vol. 548. – Pp. 393–400.
3. Патыка, В. Ф. Роль микроорганизмов в формировании устойчивых агро-экосистем / В. Ф. Патыка // Микробиология и биотехнология XXI столетия: Материалы междунар. конф., Минск, 2002 г. / НАН Беларуси, И-т микробиологии; редкол.: У.И. Коваль [и др.]. – Минск, 2002. – С. 257–259.
4. Plant pathology / G. Agrios [et al.] – 5th ed. – New York: Elsevier Academic Press, 2004. – 922 p.
5. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы: учеб.-метод. комплекс для студентов биологич. специальностей / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин // Минск: БГУ. – 2006. – С. 23–69.
6. Луста, К. А., Фихте, Б. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов // Научный центр биологических исследований АН СССР в Пущине. – 1990. – 186 с.
7. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. / Edited by John G. Holt et al. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994. – 787 p.
8. Stoyanova, M. Phytopathogenic *Serratia rubidaea* isolated from tulips / M. Stoyanova, N. Bogatzevska // Sci. Technol. – 2011. – Vol. 1, № 6. – Pp. 20–24.
9. Stoyanova, M. Occurrence of phytopathogenic bacteria of *Enterobacteriaceae* family in bulbs of cultural and ornamental plants // M. Stoyanova, P. Moncheva, N. Bogatzevska // Sci. Technol. – 2012. – Vol. 2, № 6. – Pp. 39–44.

A. V. Kanterova, U. V. Falkouskaya, V. N. Kapitsa, G. I. Novik

DEVELOPMENT OF SPECIALIZED COLLECTION OF PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS

Specialized collection of phytopathogenic microorganisms was set up as part of Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. These cultures may be used in research to study progress mechanisms of bacterial diseases, to develop diagnostic kits for express identification of plant pathogen and for elaboration of crop biological control agent.