УДК 577.21:632.3.01

BACILLUS PUMILIS – НОВЫЙ ФИТОПАТОГЕН СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Ю.Н. Горовик, Ю.И. Шаловило*, В.А. Ковалева*, А.Л. Лагоненко, Р.Т. Гут*, А.Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
**Национальный лесотехнический университет Украины, Львов, Украина*

Введение

Сосна обыкновенная (*Pínus sylvéstris* L.) – важная лесообразующая порода. Разнообразные заболевания этого древесного растения наносят значительный вред лесным хозяйствам во всем мире. Для эффективной борьбы с заболеваниями жизненно важным является изучение механизмов взаимодействия патогенов с растением-хозяином. Это касается не только таких аспектов патологического процесса как заражение хозяина и собственно инфекционный процесс, но и ответа растения на внедрение болезнетворного организма.

Бактериальные заболевания описаны для многих растений, однако основное внимание исследователей уделяется болезням сельскохозяйственных культур. Долгое время бактериозам лесных пород деревьев не уделялось должного внимания из-за недооценки опасности таких заболеваний для лесных массивов, а также из-за трудностей, связанных с выделением возбудителей и доказательством их патогенности [1]. К настоящему моменту описаны следующие заболевания хвойных бактериальной этиологии: бактериальная водянка, опухолевидный бактериоз, раково-язвенное заболевание, бактериальный ожог. Не для всех вышеописанных болезней точно известен возбудитель, а если известен, то описаны лишь его физиолого-биохимические свойства. Кроме того, практически вся информация о бактериозах сосны была получена в 80-е годы прошлого века в одной фитопатологической лаборатории и с тех пор исследований в этом направлении не проводилось.

Данная работа посвящена характеристике бактерий, ассоциированных с тканями сосны обыкновенной, имеющими симптомы бактериозов.

Методы исследования

Бактерии выделяли из образцов *Pínus sylvéstris* L., имеющих симптомы описанных в литературе бактериозов путем высева различными способами на картофельный агар. Из общей массы изолятов для дальнейшей работы отбирали бактерии, обладающие признаками фитопатогенов – наличием пектолитической, целлюлолитической активностей, способности вызывать реакцию гиперчувствительности при инокуляции в листья табака.

Физиолого-биохимическую характеристику отобранных штаммов (тест Хью-Лейфсона, тест Ковака на оксидазу, разжижение желатина, образование кислоты из углеводов, рост в 5%-ном NaCl, образование редуцирующих сахаров из сахарозы и др.) проводили в соответствии со стандартными протоколами [2, 3].

Амплификацию генов 16S РНК проводили с использованием универсальных праймеров 8F (5’-agagtttgatcmtggctcag-3’) и 1492R (5’-ggytaccttgttacgactt-3’), как описано в [4]. Полученный ПЦР-продукт выделяли из геля при помощи GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) и использовали в качестве матрицы при постановке секвенирующей реакции. Для определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S РНК применяли CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit (Amersham) и меченный Cy5 праймер 8F. Определение нуклеотидной последовательности осуществляли на автоматическом секвенаторе ALFexpress II (Amersham).

Для филогенетического анализа фрагменты последовательностей генов 16S РНК исследуемых штаммов совмещали при помощи программы ClustalX v. 1.81 (используя параметры по умолчанию) со сходными последовательностями генов 16S РНК полученными из GenBank. Минимальную коррекцию последовательностей проводили с использованием программы BIOEDIT v. 7.0.5.3. Филогенетическое дерево было построено с помощью

программы MEGA v. 4 на основе алгоритма ближайших соседей (neighbor-joining) [5]. Эволюционные дистанции (количество нуклеотидных замен) определяли методом K2P [6]. Для оценки достоверности топологии полученного филогенетического дерева применяли bootstrap-анализ (1000 реплик) [7].

Тестирование патогенности выделенных изолятов проводилось на отдельных ветках *Pínus sylvéstris* L. Хвою в опытах инокулировали легкими уколами в каплю суспензии односуточной культуры бактерий титром 10^8 кл/мл. На одной ветви одним изолятом инфицировали 25 – 30 хвоинок. После заражения ветви помещали в сосуды с водой и накрывали пленкой для поддержания высокой влажности. Хвою одного возраста инокулировали в вершину, среднюю часть и в основание, что необходимо для учета неодинаковой восприимчивости частей хвои к бактериальной инфекции. Результаты учитывались каждую неделю в течение трех недель. Заражение вегетирующих 2-х летних растений сосны осуществляли под кору дерева [1].

Результаты и обсуждение

Выделение бактерий осуществляли из коры, хвои и семян сосны обыкновенной. Из 22 исследованных образцов первоначально было выделено 96 изолятов бактерий. Для чистых культур этих изолятов проводили описание морфологии колоний на картофельном агаре, определяли грампринадлежность и форму клеток. Для выявления среди выделенных изолятов потенциальных фитопатоегнов, применяли следующие критерии: индукция реакции гиперчувствительности на листьях табака, способность к гидролизу карбоксиметилеллюлозы и пектиновых веществ.

Целлюлазы и пектатлиазы – ферменты, широко распространенные у сапрофитных и фитопатогенных микроорганизмов и относятся у последних к факторам патогенности. Реакция гиперчувствительности, проявляющаяся в локальной гибели клеток в месте инокуляции бактерий, развивается у растений, не являющихся специфическими хозяевами для тестируемого фитопатогена. Локальная гибель клеток индуцируется самим растением в ответ на распознавание специфических белков фитопатогенных бактерий и является защитной реакцией.

По вышеназванным критериям было отобрано пять изолятов, условно обозначенных P1, P2, P10, P26 и P57. На основании результатов физиолого-биохимической характеристики (таблица 1), штаммы P1, P2 и P26 были отнесены к бактериям рода *Bacillus*, а P27 – к *Pseudomonas*. Клетки P10 обладали свойствами, соответствующими бактериям *Bacillus pumilis*. Для подтверждения полученных результатов и уточнения систематического положения исследуемых бактерий, было осуществлено определение последовательности фрагментов генов 16S РНК. Последовательность гена 16S РНК штамма P1 была на 98% идентична таковой из бактерий *Bacillus subtilis* T213BW1 (gb|AY741264.1|), P2 – 99% *Bacillus licheniformis* SCTB106 (gb|JN650272.1|), P26 – 97% *Paenibacillus xylanexedens* CCL13 (emb|HF545333.1|), P27 – 99% *Pseudomonas abietaniphila* ATCC 700689 (emb|AJ011504.1|) и *Pseudomonas graminis* KF701 (dbj|AB109886.1|). Последовательность фрагмента гена 16S РНК бактерий P10 была на 99% идентична таковой из различных штаммов *Bacillus pumilis*. Филогенетический анализ последовательности, полученной из штамма P10 позволил достоверно отнести эти бактерии к виду *Bacillus pumilis* (рисунок 1).

Выделенный нами штамм *Bacillus pumilis* P10 представлял собой несомненный интерес в качестве кандидата на роль возбудителя заболевания *Pínus sylvéstris L.* До недавнего времени считалось, что бактерии этого вида являются нормальной эпифитной микрофлорой растений и даже применялись в качестве антагониста к возбудителям различных бактериозов [8]. Сейчас описаны случаи заболеваний картофеля, фасоли, персиков и манго, вызванные *Bacillus pumilis* [9, 10, 11]. В связи с этим были проведены эксперименты по искусственному заражению растений *Pínus sylvéstris L.* клетками *Bacillus pumilis* P10. Инокуляцию проводили как под кору вегетирующих растений так и в различные участки хвои. Развитие симптомов заболевания наблюдали в течение месяца (рисунок 2).

Таблица 1 – Физиолого-биохимические свойства исследуемых бактерий

	Штамм				
Физиолого-биохимические свойства	Р1	Р2	Р10	Р26	Р57
Грампринадлежность	+	+	+	+	–
Форма клеток	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки
Спорообразование	+	+	+	+	–
Подвижность	+	+	+	–	+
O\F-тест	F	F	F	F	O
Реакция гиперчувствительности	–	+	+	–	+
Гидролиз полипектата	+	–	+	+	–
Гидролиз КМЦ	+	+	+	–	–
Разжижение желатина	+	–	+	+	–
Протеазы	+	–	+	–	–
Гидролиз крахмала	+	+	–	–	–
Оксидаза	–	–	–	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+
Восстановление нитратов	+	+	–	–	–
Продукция леванов	н/д	н/д	н/д	н/д	–
Флуоресцирующий пигмент	н/д	н/д	н/д	н/д	–
Рост на среде с NaCl:					
2%	+	+	+	+	н/д
5%	+	+	+	–	н/д
7%	+	+	–	–	н/д
Усвоение спиртов, углеводов:					
галактоза	к	–	к	кг	к
глицерин	к	к	к	к	к
глюкоза	к	к	к	кг	к
ксилоза	к	к	к	к	к
лактоза	к	к	–	к	к
мальтоза	к	к	к	кг	к
маннит	к	к	к	к	к
рамноза	к	–	–	к	к
сахароза	к	к	к	–	к
сорбит	к	к	–	к	к
фруктоза	к	к	к	к	к

Примечание: «+» – наличие признака/положительная реакция, «–» – отсутствие признака/отрицательная реакция, «к» – кислота, «г» – газ, «н/д» – нет данных.

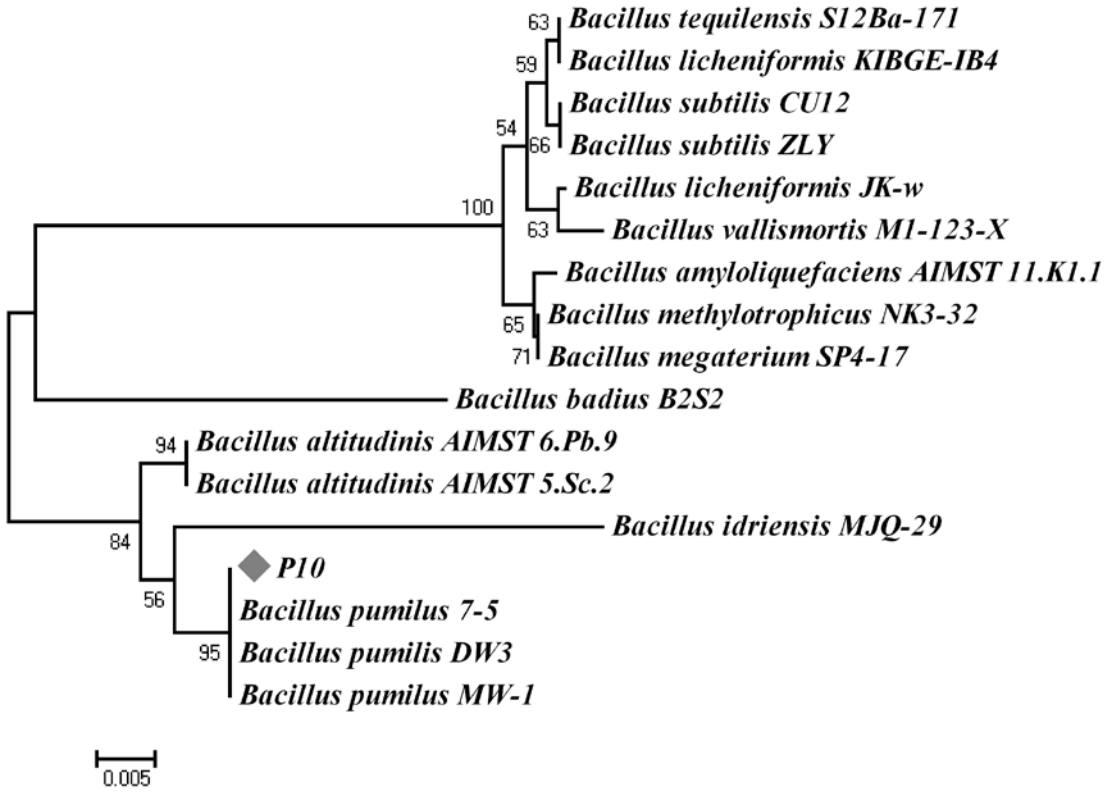
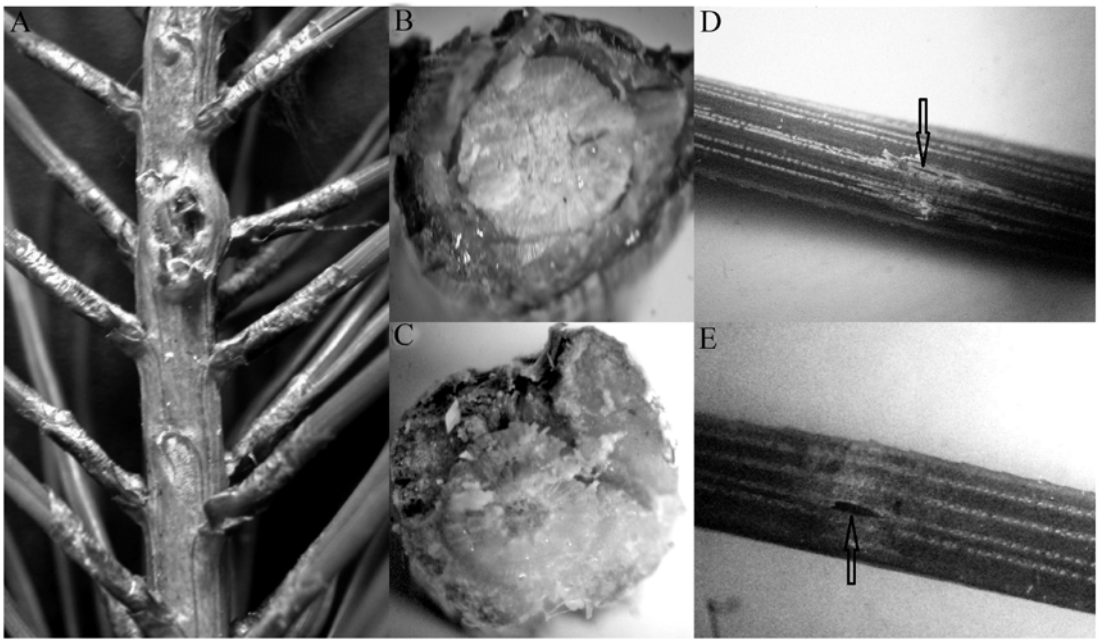


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения фрагментов последовательностей генов 16S РНК различных штаммов бактерий рода *Bacillus* методом Neighbor-joining. Генетические дистанции определены по методу K2P. Числа показывают процент величин bootstrap (1000 репликаций)



A – развитие опухоли и некроза на стебле 2-х летнего растения сосны. B, C – поперечные срезы стеблей контрольного и инокулированного растений сосны. D, E – внешний вид участков хвои, инокулированных соответственно физиологическим раствором и клетками *Bacillus pumilis* (стрелки указывают на место инокуляции)

Рисунок 2 – Симптомы заболевания, развивающиеся при искусственном заражении растений *Pínus sylvéstris L.* бактериями *Bacillus pumilis* P10

Как видно из рисунка, введение в различные ткани сосны обыкновенной клеток *Bacillus pumilis* P10 приводило к развитию явных признаков заболевания. Наблюдались такие симптомы, как деформация и некроз стеблей, некроз и хлороз хвои. Из пораженной растительной ткани легко выделялись бактерии, по своим физиолого-биохимическим свойствам соответствующие *Bacillus pumilis*. Таким образом, нами впервые выделен в чистую культуру фитопатогенный штамм *Bacillus pumilis* P10, вызывающий симптомы бактериоза *Pínus sylvéstris L*.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ «Изучение молекулярных взаимодействий в системе сосна обыкновенная (*Pínus sylvéstris L.*) – фитопатогенные бактерии» № Б11К-112.

Список литературы:

1.Рыбалко, Т. Бактериозы хвойных Сибири / Т. Рыбалко, А. Гукасян. Новосибирск: Изд. Наука, 1986. – 83 с.

2.Bergey's Mannual of determinative bacteriology // Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1974. – 8th ed. – 1268 p.

3.Goszczynska, T. Introduction to practical phytobacteriology / T. Goszczynska, J.J. Serfontein, S. Serfontein // Safrinet, 2000. – 92 p.

4.16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W.G. Weisburg [et al.] // Journal of Bacteriology. – 1991. – Vol. 173, № 2. – P. 697–703.

5.*MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – Vol. 24. – P. 1596–1599.

6.Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Molecular Biology and Evolution. – 1987. – Vol. 4. – P. 406–425.

7.Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // JME. – 1980. Vol. 16. – P. 111.

8.Choudhary, D.K. Interactions of Bacillus spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR) / D.K. Choudhary, B.N. Johri // Microbiological Research. – 2009. – Vol. 164, № 5. – P. 493–513.

9.Galal, A. *Bacillus pumilus*, A New Pathogen on Mango Plants / A. Galal, A. El-Bana, J. Janse // Egyptian Journal of Phytopathology. – 2006. – Vol. 34, № 1. – P. 17–29.

10.First report of *Bacillus pumilus* on Phaseolus vulgaris in Spain / M.I. Font [et al.] // New disease reports. – 2009. – Vol. 19. – P. 54

11.Saleh, O.I. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt / O.I. Saleh, P.Y. Huang, J.S. Huang // Journal of Phytopathology. – 1997. – Vol. 145. – P. 447–453.

BACILLUS PUMILIS – A NEW PHYTOPATHOGEN ON SCOTCH PINE

Y.N. Gorovik, Y.I. Shalovilo*, V.A. Kovalyova*, A.L. Lagonenko, R.T. Gut*, A.N. Evtushenkov

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
**Ukrainian National Forestry University, Lviv, Ukraine*

Five potentially pathogenic bacterial isolates were isolated in pure culture from Scoth pine tissue samples with symptoms of bacterial diseases. Based on the physiological and biochemical properties and sequence analysis of 16S rRNA genes isolated bacteria were attributed to the genera *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Pseudomonas*. A cellulolytic, rod-shaped, Gram positive, endo-spore forming bacterial strain, designated P10 was identified as belonging to the species *Bacillus pumilis* based on phenotypic and chemotaxonomic characteristics and the 16S rRNA gene sequence. *Bacillus pumilis* P10 showed strong pathogenicity to *Pínus sylvéstris L*. plants. According to literature review, this is the first report on the occurrence of *B. pumilis* as a causal agent of Scoth pine bacteriosis