УДК 575.13: 577.21

ХАРАКТЕРИСТИКА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

И.В. Кудина, А.Л. Лагоненко, А.Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Бактериальный ожог – опаснейшее некротическое заболевание растений семейства *Rosaceae*, вызываемое бактерией *Erwinia amylovora* ((Burril) Winslow et al.). *Erwinia amylovora* является карантинным объектом для Республики Беларусь и стран, входящих в Европейскую организацию защиты растений (EPPO A2 list, EU Annex II/A2). Эти бактерии поражают более чем 180 видов растений, особенно представителей подсемейства *Maloidae*. Экономически наиболее важными хозяевами для данного фитопатогена являются *Pyrus* spp., *Malus* spp., *Cydonia* spp., *Eriobotrya japonica*, *Cotoneaster* spp., *Crataegus* spp., *Pyracantha*, spp. и *Sorbus* spp. Впервые бактериальный ожог был описан еще в 1893 году в Северной Америке, а на данный момент это заболевание зарегистрировано более чем в 40 странах, включая Польшу, Украину и Литву. В 2007 году были зафиксированы вспышки бактериального ожога в яблоневых садах Республики Беларусь в Мядельском и Узденском районах Минской области. В мире ежегодные убытки от этого заболевания составляют десятки миллионов долларов. Столь серьезные потери связаны с отсутствием эффективного контроля заболевания. Стандартные методы борьбы основаны на интенсивной обрезке деревьев, обработке антибиотиками, медьсодержащими и биопрепаратами. Все эти методы успешны лишь при применении в оптимальные сроки. Для решения этой проблемы используются модели, предсказывающие на основе погодных условий вероятность и время возникновения инфекции (Maryblyt, Cougarblight). Во избежание дальнейшего распространения бактериального ожога на территории Беларуси крайне важно разработать методы быстрого выявления возбудителя и эффективные способы защиты растений.

Настоящая работа посвящена физиолого-биохимической и молекулярно-генетической характеристике штаммов *Erwinia amylovora*, выделенных на территории Беларуси, что необходимо для разработки мер борьбы с этим фитопатогеном.

Материалы и методы

Изоляцию возбудителей заболевания из растений с симптомами бактериального ожога листьев, побегов и плодов осуществляли по схеме, предложенной К. Гейдером с использованием полуселективных сред Кинг Б, MM1Cu и MM2Cu [1].

Выделенные в ходе этой работы штаммы, а также типовые штаммы *Erwinia amylovora* приведены в таблице 1.

Для подтверждения принадлежности изолятов к виду *Erwinia amylovora* использовали метод ПЦР-диагностики с праймерами к гену *hrpN Erwinia amylovora* (Eam1 5’-gaggaataccatatgagtctgaatacaagtg-3’; Eam2 5’-agcgtcgaccagcttgccaagtgccat-3’) [2]. ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Состав смеси: 10 пмоль каждого праймера, 0,2 ед. Taq ДНК-полимеразы, по 0,2 мМ дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ, 16 мМ сульфата аммония, 10 мМ Tris-HCl (pH 8.3), 1,5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 10 нг. ДНК. Параметры амплификации: 1 цикл 94ºС 5 мин.; 30 циклов 94ºС 30 сек., 55ºС 30 сек., 72ºС 1 мин. 30 сек.; 1 цикл 72ºС 5 мин.

RAPD ПЦР проводили как описано в [3]. Использовали праймеры OL9 (5’-acgccagttc-3’); OL21 (5’-accgtgccgt-3’); OL25 (5’-gacgagcagg-3’); OL42 (5’-caaacgtggg-3’); OL44 (5’-gggtctcggt-3’); C4 (5’-ccgcatctac-3’); C5 (5’-ggatgaccgcc-3’); C6 (5’-gaacggactc-3’); C13 (5’-aagcctcgtc-3’); C15 (5’-gacggatcag-3’); C16 (5’-cacactccag-3’); D1 (5’-accgcgaagg-3’); D13 (5’-ggggtgacga-3’); D15 (5’-catccgtgct-3’); D16 (5’-agggcgtaag-3’); D19 (5’-ctggggactt-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^{TM} Auto DNA Sequencing Kit (Amersham) и меченный Cy5 праймер 8F. Определение нуклеотидной последовательности осуществляли на автоматическом секвенаторе ALFexpress II (Amersham).

Физиолого-биохимическую характеристику штаммов *Erwinia amylovora* (тест Хью-Лейфсона, тест Ковака на оксидазу, разжижение желатина, образование кислоты из углеводов, рост при 39ºС, рост в 5%-ном NaCl, образование редуцирующих сахаров из сахарозы и др.) проводили в соответствии со стандартными протоколами [5, 6].

Для оценки влияния препаратов химической защиты растений и антибиотиков на рост клеток *Erwinia amylovora* использовали чашечные тесты.

Для проверки способности вызывать реакцию гиперчувствительности в листьях табака готовили суспензии клеток *Erwinia amylovora* в физиологическом растворе, содержащие 10^9 кл/мл ($ОП_{620}$=1,0). По 10 мкл суспензии инокулировали в паренхиму листьев табака с помощью шприца. Проявление реакции гиперчувствительности оценивали визуально через 24 часа. При постановке теста Уайта незрелые плоды груши инокулировали суспензией клеток *Erwinia amylovora* в ФР (10^9 кл/мл). Плоды груши помещали во влажную камеру на 5 дней при 25º С. Результаты теста считали положительными при развитии симптомов некроза растительной ткани и выделении эксудата молочно-белого цвета в области инокуляции.

Таблица 1 – Штаммы *Erwinia amylovora*

Штамм	Источник	Место изоляции	Год	Ссылка
1/79Sm спонтанный Sm^R мутант штамма 1/79	*Cotoneaster* sp.	Германия	1979	К. Гейдер
LMG 2024	*Pyrus communis*	Великобритания	1980	Р.И. Гвоздяк
E1	*Malus* sp.	Минская обл. Мядельский р-н. Беларусь	2007	Эта работа
E2	*Malus* sp.	-//-	-//-	-//-
E3	*Malus* sp.	-//-	-//-	-//-
E4	*Malus* sp.	-//-	-//-	-//-
E5	*Malus* sp.	-//-	-//-	-//-
L3-1	*Malus* sp.	-//-	-//-	-//-
L3-2	*Malus* sp.	Минская обл. Узденский р-н. Беларусь	-//-	-//-
L3-5	*Pyrus communis*	Минская обл. Мядельский р-н. Беларусь	-//-	-//-
L3-6	*Malus* sp.	-//-	-//-	-//-
L3-8	*Malus* sp.	-//-	-//-	-//-

Для филогенетического анализа фрагменты последовательностей генов 16S РНК *Erwinia amylovor*а E3 и L 3-5 (537 п.н.), определенных в данной работе, совмещали при помощи программы ClustalX v. 1.81 [7] (используя параметры по умолчанию) с последовательностями генов 16S РНК *Erwinia amylovor*а, *Erwinia chrysanthemy* и *Erwinia carotovora*, полученными из GenBank. Минимальную коррекцию последовательностей

проводили с использованием программы BIOEDIT v. 7.0.5.3. [8]. Филогенетическое дерево было построено с помощью программы MEGA v. 4 [9] на основе алгоритма ближайших соседей (neighbor-joining) [10]. Эволюционные дистанции (количество нуклеотидных замен) определяли методом K2P [11]. Для оценки достоверности топологии полученного филогенетического дерева применяли bootstrap-анализ (1000 реплик) [12].

Результаты и их обсуждение

В 2007 году в яблоневых и грушевых садах Мядельского и Узденского районов Минской области были зарегистрированы случаи бактериального ожога. Для подтверждения этиологии заболевания из образцов растений с классическими симптомами ожога побегов, листьев и плодов были изолированы фитопатогенные бактерии. В чистую культуру были выделены 10 штаммов бактерий, формирующих желтые мукоидные колонии на среде MM2Cu, образующих леваны на LB с 5% сахарозы, не способных расти на среде MM1Cu, не образующих зеленый флюоресцирующий пигмент на среде Кинга Б, индуцирующих реакцию гиперчувствительности в листьях *Nicotiana tabacum* и дающих положительную реакцию в тесте Уайта. На основании этих данных изоляты были идентифицированы как фитопатогенные бактерии *Erwinia amylovora*. Полученный результат был полностью подтвержден методом ПЦР с использованием специфических праймеров к гену *hrpN Erwinia amylovora* (Рис. 1).

На следующем этапе работы была осуществлена физиолого-биохимическая характеристика выделенных штаммов в сравнении с типовыми штаммами *Erwinia amylovora* – 1/79Sm и LMG 2024 (Табл. 2).

Таблица 2 – Физиологические и биохимические свойства штаммов *Erwinia amylovora*

	1/79Sm	LMG 2024	E1	E2	E3	E4	E5	L3-1	L3-2	L3-5	L3-6	L3-8
Мукоидный рост	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Утилизация цитрата	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Тест Хью-Леифсона (o/f)	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Тест Ковака	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Рост при 39ºС	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Разжижение желатина	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Редуцир. сахара из сахарозы	±	+	±	±	±	±	+	+	+	+	±	±
Рост в 5% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Образование кислоты из:												
Глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фруктозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сахарозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактозы	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Сорбита	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Дульцита	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Мальтозы	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» - реакция положительная; «–» - реакция отрицательная; «±» - слабая положительная реакция.

Как видно из данных, приведенных в таблице 2, по своим физиолого-биохимическим характеристикам штаммы *Erwinia amylovora*, выделенные на территории Беларуси, представляют собой гомогенную группу, слабо отличающуюся от типовых штаммов.

Проверка способности ряда антибиотиков и химических препаратов, применяемых для защиты растений от фитопатогенов, подавлять рост культур клеток *Erwinia amylovora in vitro*, показала, что препараты «Байлетон», «Тилт», «Импакт», «Топаз», «Реналан» и «Делан» оказались не эффективны в концентрации 0,05 – 5%. «Азофос» подавлял рост клеток *Erwinia amylovora* в концентрации 5%, «ПСК» в концентрации 0,5%. «Изар» полностью ингибировал рост бактериальных клеток в концентрации 0,05%. Все белорусские штаммы обладали устойчивостью к ампициллину (50 мкг/мл) и не росли в присутствие рифампицина (50 мкг/мл), гентамицина (50 мкг/мл), стрептомицина (50 мкг/мл), хлорамфеникола (50 мкг/мл), канамицина (20 мкг/мл) и налидиксовой кислоты (20 мкг/мл).

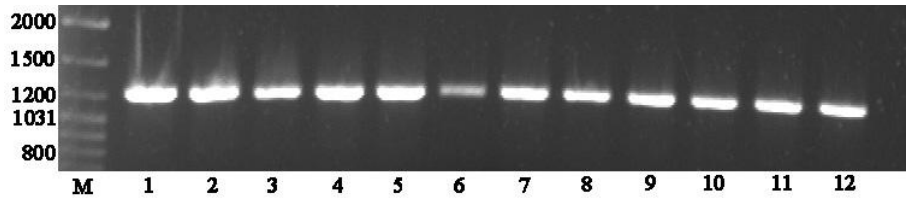

Рисунок 1 – ПЦР-фрагменты, полученные при амплификации хромосомной ДНК из штаммов 1/79 (1); LMG 2024 (2); E1 (3); E2 (4); E3 (5); E4 (6); E5 (7); L3-1 (8); L3-2 (9); L3-5 (10); L3-6 (11); L3-8 (12) с использованием праймеров, специфичных к гену hrpN Erwinia amylovora. M – ДНК маркер (GeneRuler DNA ladder mix, Fermentas)

Оценка генетического разнообразия штаммов *Erwinia amylovora* имеет важное значение для эпидемиологии, селекции, контроля заболевания и карантина. Данные молекулярной дифференциации могут быть применены для выяснения возможных источников инфекции, маркирования определенного штамма, а также при изучении популяционной генетики патогена и молекулярной филогении. Нами была осуществлена дифференциация выделенных штаммов *Erwinia amylovora* методом RAPD ПЦР. В результате были проверены 16 декамерных праймеров, дававших в ходе амплификации ДНК *Erwinia amylovora* от 1 до 10 фрагментов ДНК. При использовании праймеров OL9, OL21, OL25, OL42, OL44, C4, C5, C6, C15, C16, D1, D13, D15, D16, D19, RAPD-профили были идентичными для всех штаммов, включая 1/79Sm и LMG 2024. Различия были выявлены только между RAPD паттернами, полученными с праймером C13 (Рис. 2).

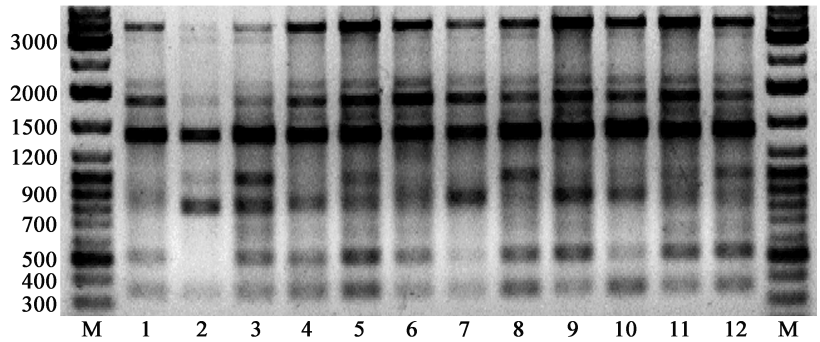

Рисунок 2 – RAPD паттерны штаммов Erwinia amylovora 1/79 (1); LMG 2024 (2); E1 (3); E2 (4); E3 (5); E4 (6); E5 (7); L3-1 (8); L3-2 (9); L3-5 (10); L3-6 (11); L3-8 (12), полученные с использованием праймера C13. M – ДНК маркер (GeneRuler DNA ladder mix, Fermentas)

На основании полученных ДНК фингерпринтов были рассчитаны коэффициенты генетического сходства по методу Nei и Li (1979) [13] и генетические дистанции между изучаемыми изолятами *Erwinia amylovora*, что позволило разделить анализируемые изоляты на три RAPD группы. К первой группе были отнесены белорусские изоляты E1, E3, L3-1, L3-6, L3-8, ко второй – E2, E4, E5, L3-2, L3-5 и германский штамм 1/79. В третью группу был включен штамм LMG 2024.

Другим наиболее часто применяемым методом молекулярной дифференциации штаммов микроорганизмов является сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S РНК. Поэтому на следующем этапе работы было осуществлено секвенирование фрагментов генов 16S РНК белорусских изолятов *Erwinia amylovora* E3 и L3-5. Сопоставление полученных последовательностей с 16 известными последовательностями генов 16S РНК различных штаммов *Erwinia amylovora* (выделенных на территории Англии, Франции, Нидерландов, Германии, Швейцарии, Канады, США, Египта, Японии) позволило построить филогенетическое дерево (рис. 3).

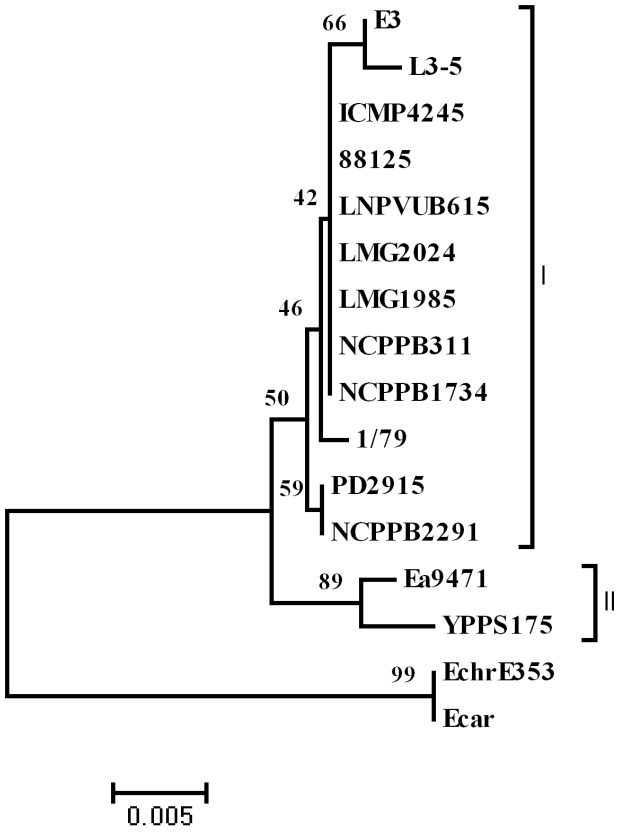

Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения фрагментов последовательностей генов 16S РНК различных изолятов Erwinia amylovora, Erwinia chrysanthemi и Erwinia carotovora методом Neighbor-joining. Генетические дистанции определены по методу K2P. Числа показывают процент величин bootstrap (1000 репликаций)

В 2000 г. Mizuno и соавт. на основании бактериологического анализа и ДНК-ДНК гибридизации предложили разделение природных штаммов *Erwinia amylovora* на четыре биовара [14]. Штаммы, выделенные из *Pyrus ussuriensis* (Mishirazu) (Груша уссурийская) были отнесены к биовару 4, из *Rubus idaeus* (Малина обыкновенная) – к биовару 3. Изоляты из растений *Malus sylvestris* (Яблоня дикая), *Pyrus communis* (Груша), *Cotoneaster melanocarpus (*Кизильник черноплодный*)*, *Crataegus monogyna* (Боярышник однопестичный), *Mespilus germanica* (Мушмула обыкновенная) – к биоварам 1 и 2. К биовару 4 относятся штаммы *Erwinia amylovora* Ea 9471 и YPPS 175, к биовару 3 – PD 2915 и NCPPB 2291, к биоварам 1 и 2 – 1/79, NCPPB 1734, NCPPB 771, NCPPB 1951, LMG 2024, NCPPB 311, NCPPB 2213, LMG 1985, ICMP 4245, 88125, LNPVUB 615.

Филогенетический анализ фрагментов генов 16S РНК позволил разделить 14 штаммов *Erwinia amylovora* на две группы. Штаммы, относящиеся к биоварам 1, 2 и 3 были объединены в первую группу, а штаммы, относящиеся к биовару 4 - во вторую. Эти результаты не противоречат данным, ранее полученным Takayuki Matsuura и соавт. [15]. Белорусские изоляты Е3 и L3-5, также как и типовые штаммы 1/79 и LMG 2024, попадают в пределы первой группы, однако занимают в ней обособленное положение.

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что фитопатогенные бактерии *Erwinia amylovora*, выделенные на территории Беларуси, представляют собой довольно однородную группу, близкую по своим характеристикам к типовым штаммам, изолированным на географически удаленных территориях. Незначительные отличия между изолятами были выявлены методом RAPD ПЦР с использованием праймера С13. На основании филогенетического анализа изоляты *Erwinia amylovora* Е3 и L3-5 могут быть отнесены к биоварам 1/2. Наиболее эффективным ингибитором роста бактерий *Erwinia amylovora* в экспериментах *in vitro* является препарат «Изар» (активный компонент - полигексаметиленгуанидина хлорид).

Авторы выражают благодарность профессору Р.И. Гвоздяку (отдел фитопатогенных бактерий института микробиологии и вирусологии НАН Украины) и профессору К. Гейдеру (Max-Planck-Institut für Zellbiologie, Germany) за предоставление штаммов *E. amylovora* LMG 2024 и 1/79Sm, доктору с-х. наук Н.В. Кухарчик (зав. отделом биотехнологии Института плодоводства НАН РБ) за предоставление праймеров для RAPD-ПЦР, доценту кафедры микробиологии В.Е. Мямину за предоставление праймеров для секвенирования генов 16S РНК.

Литература

1. Geider K. // Molecular detection of fire blight and differentiation of *Erwinia amylovora* strains // Phytopathol. Pol., – 2005. – V.35. – P. 57 – 68.
2. Николайчик Е.А., Потапович М.И., Игнатенко Е.И., Евтушенков А.Н. // Разработка методики молекулярной диагностики *Erwinia amylovora* на основе ПЦР-ПДРФ анализа // Агроэкология: сборник научных трудов / Учреждение образования "Белорусская государственная сельскохозяйственная академия". – Горки, - 2006. – Вып.4. − С. 114-117.
3. Волосевич Н.Н., Лагоненко А.Л., Кухарчик Н.В. // Молекулярное маркирование признака устойчивости к коккомикозу у вишни с использованием RAPD-PCR // Плодоводство. – 2007. – Т.19. – С. 117 – 123.
4. Lane D.J. // 16S/23S rRNA sequencing. // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. - 1991. - P. 115 – 175.
5. Bergey's Mannual of determinative bacteriology // Baltimore: Williams and Wilkins Company. - 1974. - 8th ed. 1268 p.
6. Goszczynska T., Serfontein J.J., Serfontein S. Introduction to practical phytobacteriology // Safrinet. - 2000. - 92 p.
7. Thompson J.D., Gibson T. J., Plewnak F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. // The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. // Nucleic Acids Res. - 1997. – V. 25. - P. 4876 – 4882.
8. Hall T. A. // BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. // Nucleic Acids Symposium Series. - 1999. – V.41. - P. 95 – 98.
9. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (*2007*). // *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // Molecular Biology and Evolution V.24 – P. 1596-1599.
10. Saitou N., Nei M. // The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. // Molecular Biology and Evolution. – 1987. – V.4. - P. 406 – 425.

11. Kimura M. // A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. // JME. - 1980. – V.16. - P. 111.
12. Felsenstein J. // Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. // Evolution. - 1985. – V.39. - P. 783-791.
13. Nei M., Li W.H.// Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. – V.76. - P. 5269 – 5273.
14. Mizuno A., Sato S., Kawai A. and Nishiyama K. // Taxonomic position of the causal pathogen of bacterial shoot blight of pear. // J. Gen. Plant. Pathol. - 2000. – V.66. - P. 48 – 58.
15. Matsuura T., Shinohara H., Inoue Y., Azegami K.,·Tsushima S., Tsukamoto T., Mizuno A. // Erwinia isolates from the bacterial shoot blight of pear in Japan are closely related to Erwinia pyrifoliae based on phylogenetic analyses of gyrB and rpoD genes. // J. Gen. Plant. Pathol. - 2007. – V.73. - P. 53 – 58.

CHARACTERISATION OF BELARUSIAN ISOLATES OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA*

I.V. Kudina, A.L. Lagonenko, A.N. Evtushenkov
Belarusian State University, Minsk, Belarus

In these work we report the characterization of *Erwinia amylovora* isolates from pears and apples with fire blight symptoms from Belarus. All isolates as well as the type *Erwinia amylovora* strains 1/79Sm and LMG 2024 have the same biochemical and physiological characteristics. RAPD analysis was used to study the genetic variability of the Belarusian isolates. The phylogenetic relationships of two stains from Belarus and *Erwinia amylovora* isolates from different geographical regions were investigated by performing a comparative analysis of the partial sequences of the 16S rRNA genes.