

УДК 632(075.8)
ББК 44.7я73
Ж50

Рекомендовано Ученым советом
биологического факультета
3 ноября 2004 г., протокол № 3

Рецензенты:
кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент *В. Д. Поликсенова*;
кандидат биологических наук,
доцент *Е. А. Николайчик*

Желдакова, Р. А.
Ж50 Фитопатогенные микроорганизмы: учеб.-метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. 1-31 01 01 «Биология» / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. — Мн. : БГУ, 2005. — 116 с.
ISBN 985-485-531-7.

Рассмотрены основные группы про- и эукариотических фитопатогенных микроорганизмов, факторы их патогенности и вирулентности. Описаны методики выделения, первичной характеристики и определения физиолого-биохимических свойств фитопатогенных микроорганизмов.

Для студентов биологического факультета БГУ.

УДК 632(075.8)
ББК 44.7я73

ISBN 985-485-531-7

© Р. А. Желдакова,
В. Е. Мямин, 2005
© БГУ, 2005

ПРЕДИСЛОВИЕ

Фитопатология — наука о болезнях растений, ее основная задача — изыскание путей снижения ущерба, причиняемого сельскому хозяйству фитопатогенами.

В учебно-методическом комплексе (УМК) обобщена информация о современном состоянии одного из направлений микробиологии — изучении фитопатогенных микроорганизмов. Также приведены сведения об основных группах распространенных в Беларуси возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур, проанализированы факторы, обуславливающие их патогенность, рассмотрены общепринятые и специальные методы выделения фитопатогенных бактерий, даны прописи используемых для этого питательных сред, описана техника постановки морфологических и физиолого-биологических тестов, необходимых для идентификации бактерий.

В УМК даны программа спецкурса «Фитопатогенные микроорганизмы», список основной и дополнительной литературы, а также, согласно тематическому плану, курс лекций, методические указания к лабораторным занятиям и темы рефератов для контролируемой самостоятельной работы студентов (КСРС). Предназначен для студентов 5-го курса биологического факультета БГУ.

ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН КУРСА «ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ»

Темы	Количество часов		
	Лекции	Лабораторные работы	КСРС
Исторический очерк развития представлений о фитопатогенных микроорганизмах	2	—	—
Общая характеристика заболеваний, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами. Основные признаки заболеваний растений. Общая характеристика патологического процесса. Классификация фитопатогенных бактерий	4	4	—
Плазмиды фитопатогенных бактерий. Факторы вирулентности фитопатогенных микроорганизмов	8	6	2
Иммунитет растений и определяющие его факторы. Механизмы устойчивости растений	12	4	2
ИТОГО	26	14	4

ПРОГРАММА КУРСА

Исторический очерк развития исследований по изучению фитопатогенных микроорганизмов. Роль русских и зарубежных исследователей в установлении причин болезней растений и факторов, их вызывающих. Современный этап развития исследований по изучению фитопатогенных микроорганизмов.

Фитопатология как наука. Изучение фитопатогенных микроорганизмов — составная часть фитопатологии. Потери урожая, вызываемые фитопатогенами. Определение понятия «болезнь растения». Классификация болезней растений (инфекционные и неинфекционные, в зависимости от типов возбудителей и т. п.). Облигатные и факультативные паразиты, определение понятий «патогенность», «вирулентность», «агрессивность».

Характеристика симптомов заболеваний растений: гнили, пятнистости, язвы, хлорозы, налеты, увядания, опухоли, пустулы, мумификации, отставания в росте, кустистости, деформации. Процесс развития заболевания, его основные стадии: заражение, инкубационный период, собственно болезнь. Развитие заболеваний в зависимости от титра микроорганизмов, инфекционный титр. Факторы, определяющие распространение фитопатогенных микроорганизмов. Особенности развития заболеваний, вызываемых бактериями (бактериозов).

Современное состояние вопроса о систематике фитопатогенных бактерий. Характеристика грамположительных и грамотрицательных фитопатогенных бактерий и основных представителей семейств *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* и др. Микоплазмы, характеристика симптомов заболеваний. Диагностика и особенности развития микоплазм в растениях.

Характеристика и распространение плазмид фитопатогенных бактерий, связь с патогенностью и другие биологические особенности. Плазмиды устойчивости к меди и стрептомицину, их распространение. Продукция связанных с патогенностью соединений, де-

терминируемых плазмидными генами. Наличие мигрирующих генетических элементов на плазмидах фитопатогенных бактерий.

Характеристика факторов патогенности микроорганизмов — возбудителей заболеваний растений. Продукция экзополисахаридов различными группами фитопатогенных микроорганизмов как фактор их патогенности. Генетический контроль образования экзополисахаридов, регуляция синтеза.

Токсины микроорганизмов. Характеристика специфических и неспецифических токсинов. Токсины бактерий и механизмы их действия. Генетический контроль синтеза токсинов.

Продукция индолилуксусной кислоты и образование галлов. Генетический контроль синтеза индолилуксусной кислоты.

Деполимеризующие ферменты и их роль в патогенезе. Характеристика комплекса пектолитических ферментов (на примере бактерий рода *Erwinia*). Генетический контроль синтеза, особенности регуляции *pel*- и *Kdu*-оперонов. Дефекты в синтезе отдельных пектолитических ферментов и их связь с патогенностью. Экспрессия генов пектатлиаз в растении. Регуляция синтеза деполимеризующих ферментов с помощью сенсорных систем (сигнальных молекул). Протеазы и целлюлазы как факторы патогенности. Особенности секреции деполимеризующих ферментов.

Системы транспорта железа и их роль в патогенезе.

Образование центров кристаллизации льда как условно зависимый от температуры фактор вирулентности.

Иммунитет растений. Виды иммунитета, устойчивость, толерантность и восприимчивость к заболеваниям. Горизонтальная и вертикальная устойчивость. Теория взаимодействия между патогеном и хозяином по типу «ген-на-ген». *Aur*-гены бактерий и их продукты. R-белки растений и трансдукция сигнала.

Детерминантная и экспрессивная фазы взаимодействия между хозяином и патогеном. Специфичность узнавания между хозяином и патогеном. Элиситорно-рецепторная и модель специфического супрессора при узнавании хозяина — патоген. Поверхностные структуры хозяина и патогена, участвующие в узнавании. Характеристика глюканов картофеля как специфических супрессоров. Модель сопряженной эволюции хозяина и патогена на примере патосистемы «картофель — фитофтора». Питательно-тормозящая гипотеза фитоиммунитета.

Индукцированная устойчивость растений. Характеристика различных групп элиситоров (полисахариды, полипептиды, липидсодержащие соединения). Активированный кислород и окислитель-

ный взрыв и их возможная роль в инициации реакции сверхчувствительности. Эндогенные элиситоры.

Фитоалексины. Их роль в устойчивости растений к патогенам, синтез в растительной клетке. Фитоалексины как вторичные метаболиты с антимикробной активностью.

Защитные белки растений. PR-белки, ингибиторы протеаз, оксипролинбогатые белки. Модификация клеточных стенок растений (лигнификация, суберинизация, каллозообразование) как фактор индуцированной устойчивости к заболеваниям. Взаимосвязь между различными типами защитных реакций. Системная устойчивость растений.

Реакция сверхчувствительности как универсальный способ устойчивости растений к патогену. Общая характеристика и генетическая детерминация реакции сверхчувствительности (*hrp*-гены бактерий). Характеристика белков, участвующих в развитии реакции сверхчувствительности.

Литература

Основная

Бактериальные болезни растений. М. : ВАСХНИЛ, 1981.

Инфекционные болезни растений: физиологические и биохимические основы. М. : Агропромиздат, 1985.

Микроорганизмы — возбудители болезней растений. Киев : Наук. думка, 1988.

Определитель бактерий Берджи: в 2 т. 8-е изд. М. : Мир, 1997.

Попкова, К. В. Общая фитопатология / К. В. Попкова. М. : Агропромиздат, 1989.

Дополнительная

Борьба с болезнями растений: устойчивость и восприимчивость. М. : Колос, 1984.

Дьяков, Ю. Т. Общая фитопатология с основами иммунитета / Ю. Т. Дьяков, И. Г. Семенкова, Г. Д. Успенская. М. : Колос, 1976.

Методы исследований патологических изменений растений. М. : Колос, 1976.

Молекулярная генетика взаимодействия бактерий с растениями. М. : Агропромиздат, 1988.

Основные методы фитопатологических исследований. М. : Колос, 1975.

Проблемы экспрессии чужеродных генов в растениях // Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». 1990. Т. 23.

Фитоалексины. Киев : Наук. думка, 1985.

Bakterielle Erkrankungen der Kulturpflanzen. Jena : Gustav Fisher Verl., 1989.

КУРС ЛЕКЦИЙ

Тема 1. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК РАЗВИТИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМАХ

С болезнями растений человечество столкнулось еще в те времена, когда перешло от кочевого скотоводства к земледелию. Патогенные организмы, питающиеся за счет растений и вызывающие заболевания диких видов, перешли на культурные растения и попали в условия, благоприятные для их развития и распространения: большое количество одинаковых по восприимчивости растений на небольшой площади. Поэтому еще в древности были известны массовые заболевания растений — *эпифитотии*.

Научная основа для изучения заболеваний растений была заложена в 40-х гг. XIX в. Исследования проводились по двум направлениям: изучение циклов развития грибов; исследование паразитных видов и определение их роли в происхождении болезней растений. Особое место в исследованиях тех лет принадлежит работам братьев Луи и Шарля Тюлан во Франции, Антона де Бари в Германии и Михаила Степановича Воронина в России.

Братья Тюлан исследовали грибные заболевания растений, а именно циклы развития различных грибов (мучнисторосяных, ржавчинных и др.). Ими было установлено, что в процессе развития заболевания грибы проходят различные стадии развития с наблюдающейся морфологической плеiotропностью.

Де Бари занимался изучением фитофтороза картофеля — одним из самых массовых поражений этой культуры. В середине XIX в. этим возбудителем были поражены практически все поля картофеля в Англии, Франции и России. Де Бари установил причину заболевания, выделил возбудителя и применил метод искусственного заражения для установления инфекционной природы заболевания.

В России основоположником фитопатологии является М. С. Воронин. При изучении заболеваний капусты он показал, что паразиты этого растения способны вызывать заболевания и других представителей крестоцветных. Им были выделены и неизвестные ранее возбудители заболеваний грибной этиологии.

В 1892 г. была установлена вирусная природа возбудителя мозаичной болезни табака. Примерно в это же время Эрвин Смит доказал, что возбудителями заболеваний могут быть и бактерии. К 1915 г. для представителей 144 родов растений были найдены фитопатогенные бактерии, а в 1920-х гг. число установленных бактериозов растений превысило число обнаруженных бактериальных болезней человека и животных.

В начале XX в. в России сложились две школы фитопатологов. Одна из них — в Петербурге. Исследователи этой школы изучали низшие растения: водоросли, лишайники, а также грибы. Основное внимание уделялось возбудителям заболеваний, изучению их онтогенеза и специализации по видам растений. В 1907 г. было организовано бюро по микологии и фитопатологии, которое в 1929 г. вошло во Всесоюзный институт защиты растений. Систематически выпускался сборник по болезням культурных и дикорастущих растений. Основная организационная работа связана с именем А. А. Ячевского, который написал несколько справочников и учебников, подготовил ряд обзоров, сыгравших значительную роль в распространении фитопатологических знаний среди агрономов.

Если исследования А. А. Ячевского и его коллег (А. С. Бондарцева, Н. А. Наумова, В. Г. Траншеля) были направлены на изучение теоретических вопросов фитопатологии, то на юге России сформировалась школа, которая проводила исследования практической направленности. В указанных регионах сложилось высокоразвитое сельское хозяйство, специализирующееся на выращивании пшеницы, сахарной свеклы, табака. Однако рост урожайности часто тормозился из-за вредителей и развития на растениях болезней. В 1913 г. на Харьковской опытной станции был сформирован отдел фитопатологии, основным направлением исследований которого было изучение взаимоотношений хозяин — патоген и методов защиты растений от патогенов. Первым предложенным приемом защиты был агротехнический; было показано, что применение удобрений, варьирование сроков посадки и другие мероприятия оказывают сильное влияние на поражение злаков головней.

Нельзя не упомянуть и о формировании такого направления исследований, как изучение иммунитета растений, которое оформилось в XX в. Его основоположником является Н. И. Вавилов, который считал, что иммунитет растений связан с генетическими особенностями, а специализация паразитов является одним из решающих факторов наличия иммунитета у различных сортов и видов растений. Им были установлены закономерности в приобретении иммунитета растений к определенным заболеваниям по географическим зонам. Окружающая среда и направленность отбора способствуют тому, что в определенных эколого-географических областях концентрируются либо иммунные, либо восприимчивые к заболеваниям виды и формы растений. Так, например, в Средиземноморской зоне произрастают преимущественно иммунные формы овса, пшеницы, ячменя, зернобобовых и других культур, устойчивые к различным видам патогенов. Эти же растения, развивающиеся в Средней Европе, характеризуются умеренной восприимчивостью к инфекционным заболеваниям, а в Средней Азии отмечается преимущественное произрастание форм, восприимчивых к различным заболеваниям.

Фитопатология — наука о болезнях растений, основная задача которой — изыскание путей снижения ущерба, причиняемого сельскому хозяйству фитопатогенами. Фитопатология изучает больные растения, причины, вызывающие болезнь, влияние условий окружающей среды на ее развитие. Одно из направлений фитопатологии — исследование заболеваний, вызываемых прокариотами (эубактериями, актиномицетами, микоплазмами).

Влияние болезней растений на экономику огромно. Так, в середине XIX в. вспышка картофельной гнили (фитофтороза) в Ирландии привела к массовой эмиграции населения страны, выжившего после двух голодных лет.

Часто заболевания растений были причиной замены одних сельскохозяйственных культур другими. Известно, что основным поставщиком кофе являются страны западного полушария. Однако раньше культура кофе была широко распространена и в Юго-Восточной Азии, где ржавчина кофейного дерева в конце XIX в. полностью уничтожила его плантации и сделала невыгодным дальнейшее выращивание. Такая же участь постигла и плантации сахарного тростника: развитие вирусной мозаичной болезни прекратило его возделывание.

Во все времена вспышки новых болезней растений создавали угрозу существованию сельскохозяйственных культур. В 1890 г. в Австралии возникла эпифитотия ложной мучнистой росы табака. Затем болезнь распространилась в США, в 1958 г. она была обнаружена в Европе, в 1960 — в СССР. Поражение рассады вызывает полную гибель растений. Химические средства борьбы являются неэффективными, и только создание устойчивых к заболеваниям сортов позволяет снизить потери урожая.

Другим примером может служить гибель твердой пшеницы в США и Канаде в 1953—1954 гг. от новой расы стеблевой ржавчины. Эпифитотия вызывает снижение урожая пшеницы на 70—80 %. В 1976 г. экономический ущерб от болезней растений в США оценивался в 49,6 млн долл.

Различают прямые и косвенные потери урожая от болезней. *Прямые потери* можно определить по разности урожая больного и здорового растения или при подсчете погибших растений, полностью исключенных из собранного урожая. К прямым относят последствия болезней, приводящие к снижению урожая, ухудшению его качества, снижению лежкости продукции во время хранения. Такие потери могут быть вызваны прямым поражением частей растения, ради которых оно выращивается. Например, пыльная головня пшеницы вызывает полное разрушение колосьев пораженных растений, поэтому снижение урожая зерна таких растений равно 100 %. Иногда заболевание не уменьшает урожайность, но снижает вкусовые качества или ухудшает внешний вид сельхозпродукции. В зависимости от этого яблоки делятся на несколько групп, при наличии признаков поражения они переходят в другую категорию качества и их стоимость снижается.

Гораздо труднее учесть *косвенные потери*, когда сопутствующая инфекция может сопровождаться потерей устойчивости, заболевшие части растения являются очагом, способствующим распространению заболевания.

Известны болезни растений, влияющие на человека и сельскохозяйственных животных. Эти болезни вызываются бактериями и грибами, которые продуцируют специфические токсины. Например, попадание пораженных спорыньей зерен в хлеб приводит к отравлению людей. Грибы *Aspergillus* вызывают заболевания арахиса, а скармливание скоту арахисовой муки, содержащей афлатоксин, может приводить к массовому падежу животных.

Тема 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Современную фитопатологию следует рассматривать как комплексную науку, в которую в качестве самостоятельных разделов входят следующие дисциплины:

- этиология, изучающая причины развития заболеваний;
- фитоиммунология, рассматривающая механизмы устойчивости растений к болезням;
- эпифитотиология, исследующая проявления болезней, причины их массовости, прогноз развития заболеваний и другие закономерности.

Из огромного числа (более 200 тыс.) только около тысячи видов растений используется в сельском хозяйстве. При этом основной объем растительной пищи обеспечивают 15 видов (рис, пшеница, рожь, кукуруза, ячмень, сорго, сахарный тростник, картофель, батат, кассава, фасоль, арахис, соя, кокосовая пальма и банан). Среди возбудителей болезней и вредителей растений насчитывается более 600 вирусов и вирионов, около 250 видов микоплазм, бактерий, риккетсий и актиномицетов, приблизительно 20 тыс. видов грибов, более 7,5 тыс. видов вредных насекомых, около 1000 видов нематод. Только на картофеле способны паразитировать не менее 300 видов возбудителей заболеваний.

На протяжении всего периода развития фитопатологии понятие «болезнь растений» постоянно уточнялось. В начале XX в. было предложено следующее определение: *болезнь растения* — это состояние, возникающее и изменчиво развивающееся под влиянием неблагоприятно складывающихся для растений взаимосвязей с патогенными факторами и окружающей средой и обычно характеризующееся расстройством физиологии, структуры и продуктивности растения. В этом определении учитывается тот факт, что в больном растении независимо от причины заболевания проявляются сложные связи: растение — паразит — среда.

В соответствии с ГОСТ 81-21507 болезнь растения — это нарушение нормального обмена веществ, клеток и органов целого растения, возникающее под влиянием фитопатогена или неблагоприятных условий среды и приводящее к снижению продуктивности растений или к полной их гибели. Среди изменений обмена веществ можно выделить нарушение фотосинтеза, дыхательного процесса, синтеза строительных, запасных и ростовых веществ, транспорта веществ и т. п.

Существует несколько классификаций болезней растений:

- в зависимости от природы возбудителя (вирусы, бактериозы и т. д.);
- по поражаемым культурам (болезни злаков, бобовых и др.);
- по месту появления признаков болезни (местные, или локальные, и общие, или диффузные);
- по симптомам (пятнистости, гнили, некрозы и др.);
- по возрасту или фазе развития растений (болезни семян, всходов и др.);
- по поражаемым органам (листья, плоды);
- по продолжительности течения болезней (острые и хронические).

В практике сельского хозяйства используют преимущественно *этиологическую классификацию* — на основании причин возникновения заболевания. Таковыми могут быть две группы факторов: *неинфекционные*, обусловленные влиянием абиотических условий, и *инфекционные*, вызываемые живыми организмами. Возбудителями инфекционных заболеваний могут быть грибы (микозы), вирусы (вирусы), бактерии (бактериозы), водоросли (альгозы), цветковые растения-паразиты (антофитозы). *Растениеводческая классификация* учитывает видовую принадлежность поражаемой культуры, а внутри каждого вида — причину, его вызывающую.

Неинфекционные заболевания весьма разнообразны и обусловлены несоответствием биологических особенностей растений и условий окружающей среды. В эту группу входят болезни, связанные с нарушением питания (азотного, фосфорного, калийного и др.) и наличием вредных примесей в воздухе, воде и почве, а также вызванные неблагоприятным температурным, водным и световым режимом. Глубокого фенотипического различия между проявлением инфекционных и неинфекционных заболеваний нет, хотя вызывающие их причины различны. Неинфекционные болезни, ослабляя растение, снижают его жизнестойкость и повышают восприимчивость ко многим инфекционным заболеваниям.

Формы проявления заболеваний разнообразны, часто инфекционные и неинфекционные заболевания имеют одинаковые внешние признаки и проявления, в то же время один и тот же возбудитель может вызывать в больном растении изменения, различающиеся внешне, что зависит от фазы развития паразита и растения, а также от условий окружающей среды.

Местные (или локальные) поражения ограничены участками тканей или органов растения (отдельные пятна на листьях, пло-

дах). В случае *общего* (или *диффузного*) *заболевания* поражается все растение или его основные органы (проводящая система, корни), что приводит к гибели. Неинфекционные болезни бывают общими, инфекционные же могут быть как общими, так и местными. Особенностью является то, что место проявления болезни может не совпадать с местонахождением возбудителя. Например, возбудители корневых гнилей выделяют токсины, приводящие к увяданию целого растения.

Происхождение паразитарных форм, к числу которых можно отнести и фитопатогенов, в настоящее время рассматривают как результат изменения сапротрофного способа питания. На поверхности пораженных органов и тканей развиваются патогены, относящиеся к *экзопаразитам*; патогены, живущие внутри растений-хозяев, относятся к *эндопаразитам*. По типу питания микроорганизмы разделяют на *сапротрофов*, *некротрофов* и *биотрофов*. Сапрофиты извлекают питательные вещества из мертвых тканей, некро- и биотрофы — после повреждения живых (паразиты). Однако некротрофы прежде убивают растение своими токсическими выделениями, т. е. являются сапротрофами, биотрофы же извлекают питательные вещества из живых тканей.

По степени паразитизма выделяют факультативные и облигатные патогены. *Факультативные патогены* оказывают на ткани растения наиболее быстрое воздействие, что приводит к гибели клеток. На сочных органах это приводит к развитию гнилей, на листьях — пятнистостей. Основное условие существования таких возбудителей — наличие влаги в окружающей среде, так как данные патогены обладают, как правило, внеклеточными ферментами, быстро убивающими живые ткани и вызывающими появление обширных зон мертвой ткани.

У *облигатных паразитов* значительно меньше внеклеточных ферментов, контакт с растением-хозяином не приводит к быстрому разрушению клеток. Между патогеном и хозяином устанавливается прижизненный обмен в течение продолжительного времени. Постепенно развитие облигатного паразита приводит к истощению растения и снижению его продуктивности. Болезни, вызываемые облигатными патогенами, проявляются в большей степени у интенсивно растущих растений и имеют длительный период скрытого развития.

Со степенью паразитизма связаны и такие свойства возбудителей, как патогенность, вирулентность и агрессивность. Под *патогенностью* понимают способность микроорганизмов вызывать заболевание определенного вида растений и причинять ему вред.

Это свойство может изменяться в зависимости от цикла развития возбудителей и внешних условий. Факультативные формы, вызывающие гибель больших участков, могут быть более патогенными, чем облигатные, вызывающие местные поражения тканей.

Вирулентность — качественная мера патогенности. Это патогенность данного паразита по отношению к определенному виду или сорту растений-хозяев. Один и тот же возбудитель может быть вирулентным для одного сорта и авирулентным для другого. По признаку вирулентности выделяют расы возбудителя (для грибов особенно) в пределах одного и того же вида патогена.

Агрессивность — количественная мера патогенности. Это способность паразита вызывать массовое заражение восприимчивых растений (эпифитотии), преодолевая их защитные свойства. Высокоагрессивными считаются возбудители, способные вызывать заражение растений при минимальном количестве (дозе) инфекционного начала. Более агрессивными являются облигатные формы патогенов, менее агрессивными — факультативные.

Возбудители болезней приурочены к определенному типу растений-хозяев, возрастно-физиологическому состоянию растения, отдельным тканям и органам. В соответствии с этим различают следующие типы паразитической специализации патогенов.

1. *Филогенетическая* специализация проявляется в том, что возбудитель болезни поражает либо близкородственные, либо отдаленные в филогенетическом отношении растения. Такая филогенетическая специализация называется узкой или отдаленной. К монофагам относятся те фитопатогены, которые поражают один или несколько близкородственных родов; олигофаги приурочены к растениям-хозяевам в пределах одного семейства, а полифаги поражают растения многих семейств, порядков или даже классов. Характер специализации определяется различной степенью паразитизма. Облигатные патогены чаще узкоспециализированы, факультативные — более широко. С другой стороны, специализированные патогены (*R. solanacearum*, *P. syringae*, *X. campestris*) значительно лучше адаптированы к конкретному хозяину, что приводит к ограничению круга хозяев относительно небольшой группой. Пектолитические *Erwinia* способны вызывать заболевания широкого круга хозяев. Не являясь высокоэффективными на начальных стадиях инфекции из-за невозможности преодолевать поверхностные защитные покровы, они быстро размножаются, попав в растение, за счет продукции внеклеточных гидролитических ферментов.

2. *Онтогенетическая*, или *возрастно-физиологическая*, специализация избирательно проявляется не только по отношению к виду растения, но и к его состоянию. На этом основаны некоторые способы защиты и повышения устойчивости растений к болезням. Если возбудитель заболевания поражает молодые растения (т. е. в начальной фазе онтогенеза), то следует принимать меры для быстрого прохождения этой фазы. Если поражаются преимущественно стареющие растения, то для их защиты от болезней этой группы надо проводить мероприятия, замедляющие течение онтогенеза.

3. *Органотропная* специализация проявляется в приуроченности к определенным органам растения.

4. *Гистотропная*, или *тканевая*, специализация выражается в приуроченности к определенным тканям растения. Например, по тканевой специализации вирусы разделяются на паренхимные и флоэмные. Первые находятся в клетках паренхимы листа и вызывают ее поражения различной степени. Наиболее часто встречающимися среди таких поражений являются листовые мозаики: чередование участков листа темно-зеленых («зеленые островки») и более светлых, что можно связать с различным количеством в них инфекционных частиц. Развитие флоэмных вирусов (за счет локализации во флоэме) может приводить к нарушению флоэмного тока, обмена фитогормонов и скручиванию листьев, проявлению различного рода уродливостей.

Тема 3. ОСНОВНЫЕ ПРИЗНАКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАСТЕНИЙ

Развитие патологического процесса сопровождается появлением на растении признаков или симптомов болезни. Каждому заболеванию присущи свои характерные признаки или симптомы, проявление которых зависит от условий окружающей среды. В связи с этим различают типичные и нетипичные для данного заболевания симптомы. Все заболевания по проявляемым симптомам можно отнести к нескольким типам.

К одному из наиболее типичных симптомов заболевания растений относится развитие *гнилей*. Загниванию могут подвергаться все части растения, но особенно те, которые богаты водой и запасными питательными веществами (клубни, корнеплоды, луковицы), чаще при их хранении. Причиной развития гнилей могут быть и

грибы, и бактерии. В тех случаях, когда под воздействием ферментов патогена разрушается межклеточное вещество и клетки распадаются, говорят о возникновении *мягких гнилей*. Пораженная ткань превращается в бесформенную массу различных цветов. Гнили бывают также мокрыми, сухими и твердыми. *Мокрые гнили* образуются в органах и тканях, богатых водой. *Сухие гнили* образуются при разрушении межклеточных веществ и оболочек клеток, относительно бедных водой, ткани теряют структуру и превращаются в волокнистую или порошкообразную массу. Примером развития гнилей такого типа являются поражения древесины трутовиками. Известны некоторые типы заболеваний, когда клетки отмирают без существенного разрушения пектина, т. е. образуются *твердые гнили*.

Пятнистости, или *некрозы*, проявляются в виде участков отмершей ткани на пораженных органах растения — листьях, стволах, плодах. Пятна могут иметь различную форму: округлую, удлинённую, угловатую. На листьях форма некротических пятен зависит от расположения жилок. При поражениях жилок некрозы проявляются в виде штрихов. Очень часто некрозы четко отграничены от здоровой ткани, и возбудитель локализован в пораженном участке. Такое ограничение распространения возбудителя можно рассматривать как защитную реакцию растения. В других случаях некрозы обильно заселены патогеном, пораженная ткань крупная и хорошо заметна. При некоторых поражениях на границе здоровой и пораженной ткани образуется опробковевший слой, пораженные участки теряют связь со здоровыми и выпадают. Такой тип поражения называется *дырчатой пятнистостью*. Поражения типа пятнистостей характерны для микозов, бактериозов и виروزов.

Язвы (антракнозы) возникают при поражении насыщенных водой органов и тканей растений, характеризуются размягчением тканей, окружающих места заражения. В результате образуются углубления, в которых происходит спороношение паразита. Развитие язв можно рассматривать как один из случаев пятнистостей.

Хлорозы и мозаики обусловлены нарушением пигментации листьев. При хлорозах — это общее пожелтение или посветление листьев, при мозаиках пожелтение затрагивает отдельные части листа. Чаще всего причинами этого бывают нарушения питания или поражение вирусами.

Увядание, или *вилт*, — широко распространенный тип поражения растений, гибель которых происходит в результате проникновения возбудителей в корневую и проводящую системы.

Наблюдается закупоривание проводящих сосудов, под действием образующихся токсинов происходит некроз стенок. В результате нарушается транспорт воды в растении, и оно увядает. Причиной развития вилта могут быть и грибы, и бактерии. В случае грибной инфекции увядание называется *трахеомикозом*, в случае бактериальной — *трахеобактериозом*. Однако увядание может быть связано и с неблагоприятными условиями окружающей среды.

Опухоли, или *наросты*, проявляются как разрастание пораженной ткани под влиянием возбудителя болезни. Могут образовываться на различных частях растения: на корнях (кила капусты), клубнях (рак картофеля), корнеплодах (рак корня свеклы). Возникновение наростов происходит в результате увеличения размеров пораженных клеток (гипертрофия) или их количества (гиперплазия). Иногда оба процесса протекают одновременно. Поражения такого типа свидетельствуют о том, что патогены выделяют гормональные вещества, способные нарушить рост растения, привести к разрастанию отдельных тканей. Наросты, галлы, опухоли — характерные признаки болезней, вызываемых грибами, бактериями и вирусами.

Налеты появляются на поверхности пораженных органов и представляют собой мицелий и спороншение возбудителя болезни — гриба. Особенности — окраска и расположение налета — могут служить диагностическими признаками возбудителя, например настоящие и ложные мучнистые росы.

Пустулы представляют собой участки пораженной ткани с признаками спороншения грибов, вначале прикрытые эпидермисом, который впоследствии разрушается и разрывается. Образование пустул является наиболее типичным признаком поражения ржавчинными грибами.

Парша — заболевание, развивающееся на покровных тканях, приводящее к их растрескиванию и образованию струпьев. Обычно возбудитель заболевания не проникает глубоко внутрь ткани, но при сильном поражении может вызвать деформацию плодов. Встречается парша на клубнях картофеля, плодах, семечках.

Мумификация выражается в почернении и ссыхании пораженных органов растения. Чаще всего мумифицируются пораженные мицелием паразитирующего гриба богатые питательными веществами органы. Пораженный плод превращается в твердое образование — склеротий, кроющие ткани которого темноокрашены. Характерные примеры таких поражений — спорынья злаков, мумификация плодов яблони.

Головня проявляется в разрушении и превращении пораженных органов и тканей растения в черную плотную или пылящуюся массу, состоящую из спор паразита, образующуюся на колосе, зерновке и других генеративных органах растения:

Отставание в росте может быть связано с болезнями как местного, так и общего характера. Наблюдается обычно в виде очень сильной инфекции и не является симптомом, характерным для какого-либо конкретного заболевания.

Израстание связано с чрезмерным ростом растения за счет выделения патогеном ростовых веществ. С избыточным выделением ростовых веществ связана также и *чрезмерная кустистость*. В этом случае образуется большое количество стеблей, такие растения называют «ведьмины метлы». На такой процесс расходуется много энергии, поэтому растения плохо плодоносят, имеют мелкие листья и тонкие побеги. Считают, что часто этот симптом является признаком вирусного поражения.

Деформации представляют собой изменения формы пораженного органа. Например, некоторые грибные и вирусные болезни связаны с деформациями листьев: скручиванием, морщинистостью, курчавостью. Скручивание листьев является результатом их переполнения крахмалом (из-за нарушения его оттока при поражении проводящей системы). Морщинистость и курчавость являются следствием неравномерного роста мезофилла и жилок, а нитевидность — результатом роста только жилок. Деформации цветков — пролиферации и махровость — это результат вирусных поражений.

Тема 4. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Инфекционное заболевание растения представляет собой сложный процесс взаимодействия возбудителя и растения-хозяина. Характер развития этих взаимоотношений зависит от факторов окружающей среды, поэтому каждый патологический процесс может возникать и развиваться при наличии:

- восприимчивого к определенному патогену растения-хозяина;
- патогенного организма и достаточного количества инфекционного материала;
- контакта патогена и растения-хозяина при соответствующих условиях внешней среды.

Если хотя бы одно из этих условий отсутствует, инфекционный процесс не развивается. Определяющая роль отводится также патогенности, вирулентности и агрессивности патогена. Этапы инфекционного процесса: заражение; инкубационный период; проявление заболевания или собственно болезнь.

Заражение — совокупность нескольких последовательных процессов:

- 1) попадание инфекции на поверхность органов растения;
- 2) прорастание спор грибов, семян цветковых паразитов;
- 3) внедрение паразита внутрь тканей.

Эти процессы практически не разобщены во времени и поэтому весьма сложно установить границы между ними. При заражении бактериальные или вирусные паразиты сразу же попадают внутрь тканей.

Для большинства патогенов свойствен поведенческий ответ на концентрацию химических веществ, выделяемых растением и хемотаксисом. *Хемотаксис* регулирует ряд специфических реакций: распознавание выделяемых хемотаксических субстратов рецепторными белками, локализованными в мембране клеток; перенос стимулирующего сигнала на основание жгутика растворенными сигнальными белками; активизация жгутикового мотора и индукция подвижности бактериальных клеток на аттрактанты. Для бактериального хемотаксиса оптимальными условиями считаются: температура на 5 °C ниже температуры роста и нейтральные значения кислотности среды. Для *Erwinia amylovora* показан положительный хемотаксис на фумарат, малат, сукцинат. При этом следует учесть, что изменение химической структуры указанных соединений (замещение амидной на карбоксильную или другие группы) ингибирует реакцию, что свидетельствует о наличии нескольких (4—5) хеморецепторов для различных аттрактантов.

Развитие инфекционного процесса в значительной мере зависит от инфекционной нагрузки, или числа клеток возбудителя. *Максимальная инфекционная нагрузка* — число клеток возбудителя, которые в наиболее короткий срок вызывают развитие инфекционного процесса; *минимальная* — это число клеток возбудителя, которые способны инфицировать растение. Инфекционная нагрузка для разных видов микроорганизмов различна и колеблется от единичных до нескольких десятков и сотен клеток.

Для возникновения поражения при заражении микроорганизмами, сохраняющимися в почве, имеет значение *плотность популяции* возбудителя: число единиц клеток в 1 г почвы или 1 г заселяемого субстрата — органа растения. Увеличение плотности

популяции патогенов в почве обычно коррелирует с увеличением потенциала инокулюма. *Потенциал инокулюма* — это число изотопов в популяции, обладающих фитопатогенными свойствами по отношению к одному или нескольким видам растения (или их сортам), что связано с формированием специализированных рас возбудителя. Плотность популяции и потенциал инокулюма зависят от многих факторов: корневых выделений растений, устойчивости или чувствительности к ним возбудителей, длительности культивирования растения, фунгицидных свойств почвы, наличия в ней растительных остатков и др.

В зависимости от вида патогенных организмов под инокулюмом понимают либо целый организм, либо его отдельные части, способные вызывать заболевания. У фитопатогенных грибов это могут быть споры и части вегетативного мицелия, у бактерий — клетки и споры, у вирусов — инфекционные частицы.

Количество (плотность) клеток патогенов, способных вызывать заболевания растений, в почве или на поверхности листьев может служить и критерием вирулентности в случае проведения микробиологического титрования, которое включает четыре этапа: приготовление бактериальной суспензии и серии ее разведений, инокуляция растений определенными дозами клеток, учет состояния растений через определенные промежутки времени и обработка результатов зависимости доза — эффект.

Для введения в растение строго определенного количества клеток используют различные методы. Наиболее точным является инокуляция с помощью шприца; другие методы инокуляции: опрыскивание, обрезание кончиков листьев ножницами, смоченными в бактериальной суспензии, или укол препарировальной иглой. Также может быть использована инфильтрация, или введение клеток патогена шприцем под давлением.

К количественным характеристикам, с которыми приходится иметь дело при измерении инфекционного титра, относится и *срок ответа*, т. е. промежуток времени между введением возбудителя и появлением первых симптомов поражения (количество больных растений, диаметр зон поражения, количество пятен на листьях, их размер, длина полос и т. д.) или гибелью растения.

Для объяснения количественных эффектов действия бактериальных клеток в системе хозяин — патоген существуют две гипотезы: независимого и кооперативного действия. В соответствии с первой гипотезой заражение может произойти независимо от числа введенных клеток, поскольку достаточно, чтобы подействовала любая эффективная из них. Вторая гипотеза предполагает, что

бактериальные клетки только в том случае могут вызывать заражение растения, если они действуют совместно. При этом предполагается, что для каждого объекта требуется индивидуальная эффективная доза.

По различным данным для заражения растений томата с последующим развитием рака (*Clavibacter michiganensis*) в лабораторных условиях достаточно 10 клеток. При изменении условий заражения порог значительно повышается. На примере бактерий *Erwinia carotovora* показано, что в естественных условиях достаточная доза заражения составляет приблизительно 1000 клеток, в лабораторных — около 30.

Пути распространения инокулюма в природе весьма разнообразны: в водной среде — *гидрохория*, животными — *зоохория*, по воздуху — *анемохория* и т. д. Насекомые обычно разносят инокулюм на ограниченные расстояния, лишь во время их миграций эти расстояния могут быть более значительными. Следует указать на то, что насекомые могут создавать дополнительные входные ворота для инфекции за счет сосущо-колющего ротового аппарата. Например, *Erwinia amylovora* разносятся пчелами и другими опылителями и попадают в ранки на растениях, сделанные этими насекомыми. Фитопатогенные бактерии, вирусы и микоплазмы по воздуху, как правило, не распространяются. Таким путем они могут разноситься только с мельчайшими частицами пораженной ткани растений на незначительные расстояния.

Один из основных путей распространения бактерий — посадочный материал: семена, клубни и др. Обычно бактерии локализуются между семенной оболочкой и эндоспермом, проникают в зародыш (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* и др.). Фитопатогенные бактерии способны сохраняться в почве, семенах и на растительных остатках. Однако чем быстрее происходит минерализация этих продуктов, тем меньше сохраняются бактерии. При сохранении фитопатогенных бактерий на поверхности растений или в их тканях говорят о *поверхностной контаминации*.

В период заражения большинство фитопатогенных бактерий нуждается в повышенной влажности (от 50 до 100 %). Считают также, что бактерии сильно подвержены действию света. В связи с этим следует отметить, что пигментированные бактерии чаще поражают надземные, а непигментированные — подземные части растений.

Проникновение возбудителя в ткани растения-хозяина происходит различными путями. Споры грибов способны проникать как в неповрежденные, так и в поврежденные ткани через естест-

венные или искусственные отверстия. Бактерии не могут проникать в растения непосредственно через покровную ткань, заражение происходит только через естественные отверстия — устьица, чечевички или поврежденную покровную ткань. Например, мандарин более устойчив к поражению возбудителем бактериального рака *Xanthomonas citri*, чем грейпфрут; наружные стенки устьиц мандарина устроены таким образом, что препятствуют проникновению в устьичную щель капле жидкости с клетками бактерий, а у грейпфрута таких приспособлений нет. Особое значение имеет наличие каплевно-жидкой влаги или высокая влажность на поверхности растений, что способствует размножению патогенов.

Инкубационный период — период времени от заражения до проявления внешних признаков болезни. Продолжительность инкубационного периода зависит от температуры, влажности, освещенности и других факторов внешней среды. Например, у *Xanthomonas campestris* инкубационный период может быть от 2 до 8 сут. При этом если возбудитель проникает через устьица, последующий срок развития заболевания удлиняется, а если через механически поврежденную ткань — укорачивается.

На этапах заражения и инкубационного периода через обязательное распознавание и размножение патогена в тканях реализуются два возможных типа взаимоотношений между ними: *совместимые* и *несовместимые*. Совместимые взаимоотношения (реакции) — развитие инфекционного процесса в результате размножения клеток микроорганизмов и продукции ими факторов патогенности, несовместимые — продукция организмом-хозяином факторов устойчивости к патогену.

Проявление заболевания определяется скоростью распространения возбудителя по проводящей системе или другими способами. В случае развития бактериозов могут отмечаться как диффузные, так и местные поражения. При *диффузных бактериозах* возбудитель проникает в сосудистую систему, распространяется в проводящих пучках и прилегающих к ним тканях. Нарушается нормальное поступление воды, и растение погибает. Основным симптомом является увядание. Например, развитие *Clavibacter michiganensis* на растениях томатов вначале проявляется лишь на листьях, затем — на побегах, в итоге увядают все растения. Гибель растения — одна из основных причин высокой вредоносности возбудителей диффузных бактериозов.

Местные бактериозы проявляются в поражении паренхимных тканей, отдельных органов растений, плодов и побегов. Их основные

симптомы — некрозы, хлорозы, гнили и опухоли. Некрозы бактериальной этиологии представляют собой участки отмершей ткани, черной или бурой окраски, которые могут возникать на всех надземных частях растения. Например, некрозы, вызванные *Xanthomonas campestris* и *Erwinia amylovora*, приводят к уменьшению ассимиляционной поверхности, отмиранию отдельных побегов, гибели завязей и в итоге к существенному уменьшению урожая. Поражение сочных, богатых углеводами тканей приводит к появлению гнилей. Под действием ферментов бактериальных клеток разрушается межклеточное вещество (мацерация ткани), что типично для бактерий *Erwinia*. Относительно редко встречается образование опухолей, что свойственно бактериям рода *Agrobacterium*.

При заражении некоторыми видами бактерий могут проявляться одновременно несколько симптомов поражения. Хлорозы часто сопровождают развитие некрозов, а зоны их могут сливаться. Возбудитель бактериального рака томатов вызывает увядание, растрескивание стеблей растений и пятнистость плодов; возбудитель «черной ножки» — увядание стеблей в период вегетации и гниль клубней в период вегетации и при хранении.

Таким образом, для бактериозов характерны следующие свойства:

- патогены бактериальной природы не способны проникать в растительные организмы через неповрежденные покровные ткани;
- заражение растений зависит от наличия капельно-жидкой влаги;
- перенос на значительные расстояния по воздуху ограничен;
- системный характер инфекции, т. е. наблюдается пассивное распространение бактерий в тканях растения через сосудистую систему, заселение соседних тканей, проникновение в семена и т. д.;
- отсутствие для большинства представителей покоящихся форм и неспособность длительное время выживать в почве.

При диагностике бактериальных заболеваний необходимы:

- тщательный анализ симптомов заболевания;
- выделение возбудителя из пораженной ткани в чистую культуру;
- изучение его биологических свойств;
- повторное заражение растения с целью получения характерных симптомов заболевания;
- повторное выделение возбудителя из искусственно зараженной ткани;
- сравнение свойств выделенных в обоих случаях культур.

Тема 5. КЛАССИФИКАЦИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

5.1. Характеристика грамотрицательных фитопатогенных бактерий

В настоящее время фитопатогенные представители обнаружены среди бактерий отделов: грамотрицательных, грамположительных и микоплазм. Фитопатогенные бактерии обладают следующими характерными особенностями: палочковидной формой клеток, отсутствием способности к спорообразованию, аэробностью или факультативной анаэробностью.

Среди грамотрицательных палочек и кокков фитопатогенные представители обнаруживаются в нескольких родах бактерий.

Род *Acidovorax* — подвижные грамотрицательные палочки с одним жгутиком, аэробы, не образуют флюоресцирующих пигментов, но образуют желтые или коричневые пигменты. Ранее представители рода рассматривались как нефлюоресцирующие псевдомонады. Основной вид — *Acidovorax avenae*, вызывающий пятнистость фруктов; широко распространен в США.

Род *Ralstonia* включает единственного представителя — *Ralstonia solanacearum* (ранее классифицировался как нефлюоресцирующий вид псевдомонад). Вид на основе патогенных свойств разделяется на три расы: патогены пасленовых, патогены триплоидных бананов (болезнь Моко), патогены только томатов и картофеля с относительно низкой патогенностью по отношению к другим растениям. *Ralstonia solanacearum* плохо поддерживается в лабораторных условиях, быстро теряет патогенность, что коррелирует с образованием коричнево-черного пигмента. Характерный симптом заболевания — увядание листьев. Патоген очень вредоносен, поражает около 200 видов растений, а потери урожая достигают 75 % у картофеля и до 20 % у перца.

Род *Pseudomonas* — многочисленная, широко распространенная в природе группа бактерий, большинство видов которой являются сапрофитами, обитателями почвы и водоемов, где им принадлежит огромная роль в минерализации органического вещества. Наряду с сапрофитами в состав рода включены и очень вредоносные фитопатогены и патогены животных. Представители данного рода являются аэробными палочками с полярно расположенными жгутиками. Хемоорганогетеротрофы способны к росту на самых простых по составу средах. Характерным признаком *Pseudomo-*

nas является способность к продукции пигментов, хотя данный признак не всегда является диагностическим.

Для фитопатогенных представителей характерно образование желто-зеленых и синих флюоресцирующих пигментов. Такие пигменты традиционно называют флюоресцеинами, хотя в последнее время употребляют и термин «пиовердины». В зависимости от способности выделять пигменты все фитопатогенные представители рода делятся на две группы. В первую группу объединены флюоресцирующие виды, вторая группа представлена нефлюоресцирующими представителями (всего пять видов). Предложена система для разделения фитопатогенных псевдомонад на группы по пяти основным биохимическим тестам. Последовательно проводят следующие реакции (LOPAT-тест) и определяют:

- способность к образованию левана (L);
- наличие оксидазы (O);
- способность к мацерации растительной ткани (P);
- наличие аргининдигидролазы (A);
- развитие реакции гиперчувствительности на табаке (T).

В группу I (L+, O-, P-, A-, T+) входят 50 патоваров *P. syringae*, 3 патовара *P. savastanoi* (pv. *glycinea*, pv. *savastanoi*, pv. *phaeolicola*).

P. syringae, относящийся к сложным видам, представители которого являются возбудителями ряда заболеваний у примерно 180 видов растений. В их числе все виды сливы, груши, дуба и других древесных растений, а также пасленовых. Характер вызываемых заболеваний определяется видом растения. Между собой патовары различаются по биохимическим тестам (наличию ряда гидролитических ферментов).

P. syringae pv. *syringae* паразитирует на растениях сирени. Первые симптомы заболевания в виде коричневых мокрых пятен на листьях появляются ранней весной. Инфекция может распространяться вокруг веток, опоясывая их. В результате ветки обламываются и погибают. У косточковых плодовых вызывают бактериальный рак, при этом чернеют и отмирают листья, почки и цветки. Естественная обсемененность плодовых деревьев может достигать 4 %.

P. syringae pv. *lachrymans* вызывает угловатую пятнистость огурцов — одно из наиболее вредоносных заболеваний этой культуры. Заражение происходит через семена. В результате развития патогена продырявливаются листья, на уродливой формы плодах образуются язвы.

P. syringae pv. *tabaccae* вызывает заболевание растений табака, известное как бактериальная рябуха, или дикий ожог табака. На молодых растениях по краям листьев появляются маслянистые мокнущие пятна. Днем они подсыхают и приобретают бурую или черную окраску. Развитию и распространению заболевания способствует дождливая, влажная погода. Возбудитель является полифагом, способен поражать многие бобовые растения.

К группе II (L⁻, O⁻, P⁺, A⁻, T⁺) относят *P. viridiflava*, которые являются сапрофитами, но при определенных условиях могут быть и потенциальными патогенами для многих растений (тыквенных, томатов, хризантем, винограда и персиков). Часто вызывают заболевания после инфицирования другими псевдомонадами или ксантомонадами, а также у поврежденных заморозками растений.

Группа III (L⁻, O⁺, P⁻, A⁻, T⁺) включает два основных фитопатогена: *P. cicchorii* и *P. agarici*, вызывающих некротические повреждения капусты или паразитирующих на грибах.

Группа IV (L⁺, O⁺, P⁺, A⁺, T⁻) включает 3 патовара *P. marginalis*.

Группа V (L⁻, O⁺, P⁻, A⁺, T⁻) включает бактерии *P. talaasii*, поражающие грибы.

Бактерии рода *Pseudomonas* способны вызывать у растений пятнистости, некрозы, опухоли и гнили, которые обусловлены изменением метаболизма растительной клетки под влиянием веществ (ферменты, гормоны, токсины), выделяемых патогенами.

Род *Burkholderia* выделен из рода *Pseudomonas* и включает нефлюоресцирующих его представителей, основные признаки данных бактерий те же, что и для псевдомонад. Представители этого рода относительно немногочисленны — включают пять видов. Наиболее распространенными являются *B. gladioli* (пятнистость листьев), *B. cepacia* (заболевания кожицы лука), *B. caryophylli* (вилт гвоздики). Заболевание проявляется в пожелтении и увядании листьев, а возбудитель относится к категории карантинных объектов.

Бактерии рода *Xanthomonas*, которые являются строго аэробными грамотрицательными подвижными палочками, характеризуются образованием вязких слизистых колоний на агаризованной среде и продукцией особого желтого пигмента — ксантомонадина, не растворимого в воде. Продукция этого пигмента является таксономическим признаком, позволяющим отличать ксантомонады от других желтопигментированных бактерий. Другим отличительным признаком представителей рода является зависимость от таких факторов роста, как витамин B₁ и метионин.

Ранее бактерии этого рода были включены в состав 130 патоваров вида *X. campestris*. В настоящее время в составе рода выделены 20 отдельных видов. Основным видом является *X. campestris*, вызывающий сосудистый бактериоз у различных растений. *X. campestris* pv. *campestris* поражает растения семейства крестоцветных, которые отстают в росте, на их листьях появляются желтые пятна, наблюдается почернение сосудов.

X. campestris pv. *orysae* вызывает ожог или увядание листьев риса, приводящее к засыханию листьев или целых растений.

X. campestris pv. *vesicatoria* относится к полифагам, поражающим картофель, морковь, перец и вызывающим черную бактериальную пятнистость томатов — заболевание, которое поражает все растение и характеризуется появлением пятен на листьях.

X. ampelina — возбудитель рака стеблей винограда, размножаясь в слое камбиальных клеток, вызывает их гиперплазию.

Бактерии рода *Xylophilus* являются желтопигментированными, медленно растущими клетками. В составе рода выделяют только один вид *Xylophilus ampelinus*, вызывающий ожог винограда.

Бактерии рода *Agrobacterium* относятся к непигментированным фитопатогенам, клетки которых снабжены 1—6 жгутиками. Среди основных видов патогенов выделяют *A. tumefaciens* (3 биовара), *A. rhizogenes* и *A. radiobacter*, являющийся сапрофитом. Один из биоваров *A. tumefaciens* выделен в новый вид *A. vitis*.

Бактерии рода *Agrobacterium* вызывают заболевания практически у всех представителей двудольных и некоторых голосеменных растений, в числе которых 643 вида из 91 семейства. Однодольные растения практически не поражаются. Отличительной особенностью бактерий этого рода является связь между развитием заболеваний и наличием в клетках крупных Ti- и Ri-плазмид, т. е. патогенность агробактерий определяется наличием плазмид. Штаммы, несущие Ti-плазмиду, вызывают развитие корончатых галлов или рака, наследующие Ri-плазмиду — волосатость корня.

В Австралии был разработан наиболее успешный метод биологического контроля развития корончатых галлов. Для этих целей использовали штамм *A. radiobacter* K84. Клетки данного штамма образуют бактериоцин Агроцин 84, который вызывает гибель фитопатогенных *A. tumefaciens*. Было предложено обрабатывать саженцы растений суспензией клеток *A. radiobacter* K84 в концентрации $1 \cdot 10^8$ кл/мл. В результате этого образование корончатых галлов снижалось на 31 % по сравнению с кон-

тролем. Среди возможных механизмов, обеспечивающих такое снижение, рассматриваются несколько. Во-первых, это бактерицидный эффект Агроцина 84 на клетки возбудителя корончатых галлов. Во-вторых, конкурентное ингибирование продуцентом Агроцина 84 процессов прикрепления *A. tumefaciens* к рецепторным сайтам на поверхности растительных клеток. В-третьих, снижение скорости роста фитопатогена в присутствии *A. radiobacter* К84 за счет использования одних и тех же источников питания.

Все известные факультативно-анаэробные палочки, которые являются фитопатогенами, относятся к представителям семейства *Enterobacteriaceae*. Все фитопатогенные бактерии этой группы (за исключением *Pantoea stewartii*) являются подвижными клетками с перитрихально расположенными жгутиками и ферментативным типом метаболизма. Фитопатогенные представители сгруппированы в два рода: *Erwinia* и *Pantoea*.

Среди представителей рода *Erwinia* практически все из 15 известных видов являются фитопатогенами, хотя некоторые виды способны вызывать заболевания человека и животных. Род был образован в 1917 г. Представители этого рода встречаются как на поверхности растений, так и в почве, особенно хорошо сохраняются на растительных остатках, способны вызывать гнили, увядания, некрозы, язвы.

Внутри рода выделяют две группы: группу бактерий «мягкой гнили» и группу бактерий, вызывающих увядание растений. Для бактерий, вызывающих гнили, характерна продукция пектолитических и других мацерирующих ферментов; чаще загниванию подвержены овощные культуры. Среди бактерий этой группы выделяют три подвиды:

- *E. carotovora* subsp. *atroseptica* поражает преимущественно картофель, на клубнях которого образуются мягкие гнили или «черная ножка» стебля;

- *E. carotovora* subsp. *carotovora* также вызывает мягкие гнили у многих растений;

- *E. chrysanthemi* является гетерогенным видом, состоящим из 7 патоваров с четко выраженной специализацией по отношению к растениям-хозяевам, вызывает мягкие гнили, увядания, хлорозы и другие заболевания.

Бактерии, вызывающие увядания, включают два вида *E. amylovora* и *E. tracheiphila*. *E. amylovora* вызывает ожог у представи-

телей семейства розоцветных, *E. tracheiphila* — бактериальное увядание огурцов. *E. amylovora* относится к наиболее вредоносным патогенам, пораженные им деревья имеют вид обгоревших; повреждаются также цветки, которые высыхают, чернеют, но остаются на деревьях, и плоды, которые коричневеют и сморщиваются. Считают, что никакая другая болезнь плодовых не причиняет такого ущерба — возбудителем поражается около 180 видов растений. Бактерии являются карантинным объектом.

Представители рода *Pantoea* ранее образовывали группу «*herbicola*» внутри рода *Erwinia*. Это желтопигментированные бактерии. Один из видов *P. herbicola* ранее не относили к фитопатогенам, а считали ассоциированным с растениями и сопутствующим фитопатогеном видом. В последние годы доказана способность бактерий *P. herbicola* pv. *gypsophylae* вызывать заболевания. Более значимым патогеном является *P. stewartii* — возбудитель бактериального увядания кукурузы. Бактерии являются карантинным объектом.

Среди фитопатогенных бактерий, которые относятся к грам-отрицательным, следует отметить возбудителей заболеваний ананаса (*Acetobacter acetii* и *Gluconobacter oxydans*), моркови (*Rhizobacter daucus*), люцерны (*Serratia marcescens*). Данные виды были выделены относительно недавно, их полного описания в литературе нет.

Описаны возбудители заболеваний растений, которые первоначально относились к риккетсиоподобным бактериям, а затем были выделены в отдельный род *Xylella*. Это грамотрицательные неподвижные, строго аэробные, медленно растущие палочки, способные сохраняться и размножаться в ксилеме растений. Бактерии имеют очень сложные пищевые потребности и для их выделения используются специальные среды. Считают, что они являются внутриклеточными паразитами, и в пораженных растительных клетках их может накапливаться до нескольких десятков. Бактерии относят к возбудителям системных поражений растений. В природе основным переносчиком этих бактерий являются насекомые, которые питаются соком ксилемы. Заболевания проявляются в приостановке роста и увядании растений. Например, *X. fastidiosa*, вызывающая болезнь фони персиков, обуславливает преждевременный весенний рост растений с последующей его полной приостановкой. Побеги виноградной лозы, пораженные бактериями, увядают и теряют способность закрепляться на опоре.

5.2. Характеристика грамположительных фитопатогенных бактерий

Среди грамположительных бактерий фитопатогенные представители обнаружены в группе коринеформных бактерий и в семействе стрептомицетов (сем. *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*).

В группе коринеформных бактерий три рода бактерий имеют фитопатогенных представителей.

Наиболее значимыми и распространенными являются бактерии рода *Clavibacter*. Клетки бактерий являются неподвижными плейоморфными палочками, строгими аэробами, нуждающимися в некоторых факторах роста. Спор не образуют. Бактерии продуцируют большое количество разнообразных пигментов. Ранее представителей этого рода относили к роду *Corynebacterium*, из которого они были выделены в 1988 г. на основании особенностей патогенности и содержания в клеточной стенке 2,4-диаминобутирата.

Представители данного рода вызывают увядания растений, на ранних стадиях болезни поражаются сосуды, а на более поздних — и другие части растений. Больные растения отстают в росте, становятся карликовыми с большим количеством стеблей. Листья постепенно теряют зеленую окраску и коричневеют. Темнеют и пораженные сосуды, что особенно хорошо заметно на срезах. Типовым видом является *C. michiganense*, который подразделяется на ряд подвидов.

C. michiganense subsp. *michiganense* вызывает бактериальный рак томатов и относится к широко распространенным возбудителям. Поражаться могут листья, стебли, плоды.

C. michiganense subsp. *nebraskensis* вызывает увядания и ожог листьев кукурузы.

C. michiganense subsp. *insidiosum* — возбудитель увядания люцерны, поражаются сосуды растений. Развитию заболевания способствует пониженная температура в период вегетации.

C. michiganense subsp. *sepedonicum* — возбудитель кольцевой гнили картофеля. На срезе клубня поражение имеет вид кольца, часто пораженные клубни растрескиваются; на пораженных растениях листья желтеют, покрываются пятнами, скручиваются и засыхают. Очень вредоносный возбудитель в северном полушарии; в отдельные годы ущерб достигает 40 % урожая.

Представители рода *Curtobacterium* являются подвижными палочками плейоморфной формы (от удлиненных до слабоизогнутых), формирующими мелкие колонии в течение 4—5 сут. Забо-

левания растений вызывает один вид — *C. flaccumfaciens*, имеющих несколько патоваров. Наиболее часто заболеванию подвержены бобовые растения (вилт), свекла, тюльпаны.

К роду *Rathayibacter* относят возбудителей болезней хлопчатника.

Наиболее характерным признаком фитопатогенных представителей рода *Streptomyces* является образование воздушного мицелия, в составе которого имеются цепочки из трех и более спор. Колонии складчатые, кожистые или морщинистые. Наиболее экономически значимым из-за причиняемого ущерба является возбудитель парши картофеля *S. scabies*.

5.3. Характеристика фитопатогенных микоплазм

Роль микоплазм как возбудителей заболеваний растений была впервые доказана в 1967 г. при проведении электронно-микроскопического анализа некоторых пораженных растений. До этого времени часто из-за сходства симптомов смешивали заболевания, вызываемые вирусами и микоплазмами. Однако в развитии таких заболеваний существует ряд различий:

- микоплазмы переносятся только насекомыми (главным образом цикадками), а период их инкубации и размножения в переносчике довольно продолжителен: от 2 недель до 1,5 месяцев. Видовое разнообразие для каждого возбудителя достаточно широко и практически соответствует кругу питающих переносчика растений;
- возбудители термолabileльны как в растении, так и в переносчике, а повышением температуры можно добиться их аттенуации;
- инокуляция соком больного растения стерильной особи насекомого переносчика приводит к заражению последнего, при этом в ткани переносчика появляются частицы, превосходящие по размерам известные вирусы.

Фитопатогенные представители обнаруживаются в трех семействах микоплазм: *Acholeplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*.

В настоящее время известно более 200 видов растений из 59 семейств, поражаемых микоплазмами. Общим для этих заболеваний является распространение в зонах с умеренным и теплым климатом, благоприятствующим развитию сосущих насекомых — их основных переносчиков. Наиболее вредоносными являются микоплазмозы пшеницы, пасленовых, винограда и некоторых древесных культур. Микоплазмозы относятся к заболеваниям катас-

трофическим, часто принимающим характер эпифитотий. Урожай пшеницы может снижаться на 80—90, томатов — на 25—35, картофеля — до 20 %.

При заселении микоплазмами проводящей системы растений и выделении ими продуктов жизнедеятельности обычно происходит усиленное образование дегенеративных клеток флоэмы, в результате больные растения становятся карликовыми, желтушными и увядают. Известны и прямо противоположные случаи — астры и табак, зараженные микоплазмами, живут намного дольше, так как у них задерживается начало репродукции растений. Обычно в пораженных микоплазмами растениях нарушаются процессы регуляции роста и изменяется габитус — в избытке образуются придаточные почки и побеги, нарушается доминирование верхушки. Растения приобретают вид «ведьминой метлы» из-за образования дополнительных боковых побегов. У них уменьшается размер междоузлий (карликовость) и листьев, изменяются генеративные органы, что приводит к бесплодию. После поражения прекращается плодоношение.

Первыми признаками желтухи является просветление сосудов инфицированного листа, который постепенно утрачивает зеленую окраску, процесс пожелтения распространяется и на другие листья, т. е. желтуха — это системное заболевание.

Из 40 наиболее известных микоплазмозов пасленовых самыми вредоносными считаются «ведьмины метлы» картофеля и столбур томатов. У пораженных растений картофеля образуется множество тонких стеблей, мелких клубней, которые прорастают ветвящимися побегами. Микоплазмы обнаруживаются во флоэме и ситовидных трубках стеблей и листьев. При столбуре томатов через 20—30 сут после инфицирования листья становятся хлоротичными, края их приподнимаются. Микоплазмы обычно выявляются в ситовидных трубках, крайне редко в клетках мезофилла или корня. Количество клеток микоплазм в одной растительной достигает 100.

Наиболее простым способом диагностики микоплазмозов является обработка больных растений антибиотиками тетрациклинового ряда. Если после такой обработки растение выздоравливает, то делают вывод о микоплазменной природе заболевания. Для растений, находящихся на последних стадиях вегетации, такой способ неэффективен. В данном случае возможно использование электронной микроскопии или других микроскопических методов с последующим окрашиванием срезов.

В связи с тем, что микоплазмы весьма трудно культивируются и выделяются в чистую культуру, для доказательства их патогенных свойств используют следующий прием: соком больных растений заражают стерильных насекомых-переносчиков, а затем скармливают им здоровые растения. Поскольку различные возбудители могут индуцировать на растениях сходные симптомы, для идентификации могут использоваться и индикаторные растения. В качестве индикаторных используют барвинок, определенные сорта томатов, табака и другие растения. Различные формы заболеваний проявляются на индикаторных растениях по-разному, в зависимости от видовой принадлежности возбудителя.

При определении видовой принадлежности микоплазм используют серологические методы, а также методы, основанные на исследовании их уникальных свойств: потребности в стеринах, способности к гидролизу мочевины и синтезу каротиноидов.

Микоплазмы могут иметь как специфических, так и неспецифических хозяев. При исследовании особенностей их поведения и в тех и в других оказалось, что размножение и рост происходят по-разному. Обычным местом обитания микоплазм являются ситовидные элементы флоэмы больных растений. Количество их клеток сильно колеблется (от нескольких до полного заполнения объема растительной клетки). Часто микоплазмы располагаются вдоль цитоплазматической мембраны.

Вероятно, степень проявления такого симптома, как хлоротичность листьев, и определяется количеством клеток микоплазм. Когда их немного, то транспорт пластических веществ происходит относительно нормально, если микоплазм много, то закупориваются сосуды и хлоротичность листьев выражена сильнее.

На специфических растениях-хозяевах взаимодействие микоплазм с их клетками происходит в три этапа.

1-й этап — проникновение микоплазм в молодые паренхиматозные клетки флоэмы, где они взаимодействуют с мембранными элементами клетки. Реакция клетки-хозяина проявляется в образовании отдельных выростов мембраны, направленных в сторону клеток микоплазм. Мембранные структуры растительных клеток разбухают и сливаются с мембранными структурами микоплазм.

2-й этап — дальнейшее развитие инфекции. Характеризуется нарушением нормального метаболизма растительной клетки. На

3—4-е сутки цитоплазма инфицированных молодых клеток темнеет от насыщения рибосомами и полисомами, что свидетельствует об усилении метаболизма пораженных клеток.

3-й этап. В хлоропластах содержится повышенное количество крахмала, что приводит к развитию хлороза и разрушению клеток.

В клетках неспецифических растений-хозяев подобные явления не наблюдаются, в таких клетках микоплазмы не проявляют тропизма к мембранам растительных клеток. Предполагается, что при адсорбции на мембранных элементах клеток-хозяев микоплазмы получают возможность извлекать из них необходимые питательные субстраты (жирные кислоты, холестерин).

Считается, что основные факторы патогенности у большинства микоплазм те же, что и у других бактерий, за исключением тех, которые определяются наличием клеточной стенки. К числу наиболее часто встречающихся у микоплазм факторов патогенности можно отнести продукцию фитотоксинов и ферментов. *Spiroplasma citri* образует два типа токсинов, которые вызывают увядание растений и задерживают прорастание семян. Одним из факторов патогенности можно также считать конкуренцию микоплазм с растениями-хозяевами за определенные продукты метаболизма (сахара, аминокислоты).

Тема 6. ПЛАЗМИДЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Плазмиды обнаруживаются в клетках большинства известных фитопатогенных представителей. Они различаются по размерам, количеству в клетке, молекулярной массе. Известны бактерии (*Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*), наследующие в клетках крупные мегаплазмиды; необычно много (до 10—13) плазмид обнаружено в клетках *Pantoea stewartii*, у спироплазм обнаруживаются плазмиды размерами до 40 кб, что составляет до 10 % от размера генома (табл. 1).

Исследование плазмид у фитопатогенных бактерий необходимо для изучения свойств, связанных с вирулентностью; их наличие может служить таксономическим признаком и использоваться для создания коллекций, а также должно учитываться при изучении эколого-географического распространения бактерий.

Таблица 1

Плазмиды фитопатогенных бактерий

Бактерии	Количество плазмид	Размеры, Мд
<i>Clavibacter michiganense</i>	несколько	23—75
<i>Curtobacter flaccumfaciense</i>	»	44—68
<i>Erwinia amylovora</i>	1—3	неизвестны
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	2	5—50
<i>Erwinia carotovora</i>	несколько	неизвестны
<i>Erwinia uredovora</i>	3—5	5—170
<i>Pantoea stewartii</i>	8—13	3—210
<i>Pantoea herbicola</i>	несколько	100—350
<i>Burkholderia cepacia</i>	»	9—120
<i>Ralstonia solanacearum</i>	»	300
<i>Pseudomonas syringae</i>	»	3—100
<i>Xanthomonas campestris</i>	2	0,2—0,6; 17

Из особенностей, которые могут детерминироваться плазмидными генами, можно выделить те, которые определяют колонизацию растений-хозяев и связаны с вирулентностью. К числу таких характеристик относят способность продуцировать бактериоцины и определять питательные потребности. Следует также отметить свойства, обеспечивающие выживание клеток в неблагоприятных условиях окружающей среды (устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, УФ-свету и др.).

Способность к продукции бактериоцинов обнаруживается у всех фитопатогенных бактерий, но связь этого признака с плазмидами доказана только у *E. carotovora* и *P. herbicola*. Классическим примером наследования катаболических плазмид являются Ti- и Ri-плазмиды, которые обуславливают использование нопалинов и октопинов. Другим примером является плазида рАМВ1 *R. solanacearum*, которая обеспечивает использование таннинов как единственный источник для роста.

Для бактерий рода *Erwinia*, продуцирующих каротиноидные пигменты (*E. uredovora*, *P. herbicola*, *P. stewartii*), обнаруживается детерминированность этого признака плазмидами. При элиминации плазмид утрачивается и способность к синтезу пигмента. Размеры плазмид в зависимости от вида и штамма изменяются от 260 до 500 кб. Каротиноидные пигменты защищают клетки эпифитных бактерий от УФ-света. Защитный эффект подтвердился

после клонирования генов биосинтеза каротиноидов в клетках *E. coli*. Было показано, что в результате введения плазмид в клетки *E. coli* они приобрели повышенную устойчивость к некоторым токсинам растений, которые синтезируются на свету.

Указанные плазмиды сообщали клеткам также способность к синтезу витамина В₁. Способность к синтезу витамина В₁, детерминируемая плазмидой, обнаружена и у бактерий *E. amylovora*.

Изучение плазмид фитопатогенных бактерий может быть полезно и с точки зрения исследования такого их потенциального свойства, как способность придавать клетке устойчивость к используемым человеком химическим средствам защиты. Одним из известных свойств такого рода является придание клетке устойчивости к ионам меди. Соединения меди используются для борьбы с заболеваниями растений уже более 100 лет, а первые сообщения о выделении плазмид устойчивости появились в 1980-х гг. Считается, что устойчивость к ионам меди возникает относительно редко (по сравнению с другими металлами), среди фитопатогенных бактерий она известна у *X. campestris* pv. *vesicatoria* и *P. syringae* pv. *tomato*.

У *X. campestris* pv. *vesicatoria* обнаружена конъюгативная плаزمида, обозначенная рХvCu, с размерами около 200 кб. Помимо устойчивости к ионам меди, данная плазмида несет ген *avrBs*₁, т. е. ген авирулентности. Кроме указанного у *X. campestris* pv. *vesicatoria*, выявлены еще два гена авирулентности, один из них также локализован на плазмиде, а другой — ген *avrBs*₂ — хромосомально. Данные гены запускают в растениях реакцию сверхчувствительности. Этот факт не представляется удивительным, поскольку в природе в условиях постоянного селективного давления, вызванного использованием соединений меди, в одном репликоне содержатся и гены, определяющие развитие несовместимых взаимоотношений. У *X. campestris* pv. *vesicatoria* обнаружена плазмида другого типа, определяющая устойчивость к меди, но имеющая другие (100 кб) размеры и являющаяся неконъюгативной.

У *P. syringae* pv. *tomato* устойчивость к ионам меди детерминировалась плазмидой рРТ23D (неконъюгативная, 35 кб). Передача этой плазмиды между клетками обеспечивалась другой плазмидой рРТ23С (60 кб). Кроме того, в клетках штамма была выявлена и третья плазмида рРТ23А (101 кб), которая определяет синтез фитотоксина коронатина.

Гены устойчивости к ионам меди локализованы в участке размером 4,5 кб, состоящем из 4 генов (*corA*, *corB*, *corC*, *corD*). Бел-

ки CopA и CopC локализованы в периплазматическом пространстве, белок CopB, вероятно, связан с внутренней мембраной. В данном случае при устойчивости показано, что ионы меди не изменяют заряд и не удаляются из клеток, а накапливаются в них. В устойчивых клетках внутриклеточная концентрация меди в 2—4 раза выше, чем в клетках бактерий дикого типа. Считают, что основную роль в устойчивости играют белки. По крайней мере для белков данной системы отмечено повышенное содержание метионина и гистидина, третичная структура белка соответствует структуре спираль — клубок — спираль и, возможно, связывает ионы меди. Белки CopA и CopC связывают ионы меди (две молекулы — один ион Cu^{2+}) в периплазме и препятствуют его поступлению в цитоплазму клетки. Cop-оперон обнаружен у большинства патоваров *P. syringae*.

Другими соединениями, использовавшимися для контроля развития заболеваний, являются антибиотики. В частности, для борьбы с *P. syringae* применяли стрептомицин. После выделения природных Sm^r -штаммов оказалось, что они наследовали конъюгативную плазмиду rCPP501, которая не обнаруживалась в чувствительных клетках. На различных плаزمидках локализовались гены устойчивости к стрептомицину и у бактерий *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

У природных изолятов фитопатогенных бактерий антибиотикорезистентность встречается относительно редко; описана устойчивость к триметоприму — у *P. glycinea*, а также устойчивость к эритромицину и продукция бактериоцина — у *E. carotovora*.

Продукция гормонов, связанная с наличием плазмид, обнаружена у бактерий двух видов: *Agrobacterium tumefaciens* и *Pseudomonas savastanoi*.

Тема 7. ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Фитопатогенные бактерии, растущие в межклеточном пространстве, продуцируют такие факторы вирулентности, как токсины, ферменты, растительные гормоны, внеклеточные полисахариды, что приводит к развитию различных симптомов: хлорозы, мягкие гнили, гиперплазию клеток, некрозы и увядания. Однако для многих бактерий природа факторов вирулентности не определена.

7.1. Характеристика ферментов, участвующих в деградации полимеров клеточных стенок бактерий

Erwinia chrysanthemi и *Erwinia carotovora* являются энтеробактериями, способными вызывать различные заболевания у широкого круга дикорастущих и возделываемых растений. Биохимические исследования показали, что их патогенные свойства являются результатом продукции ряда деполимеризующих ферментов, таких как пектиназы, целлюлазы, протеазы, фосфолипазы и ксиланазы, вызывающих деградацию компонентов клеточных стенок растений.

Наиболее широко и разнообразно представлены ферменты, деградирующие пектиновые вещества срединных пластинок клеточных стенок растений. Пектин — это гетерополисахарид, который состоит из молекул галактуроната, связанных в линейную цепь посредством α -1,4-гликозидных связей. Природные пектины имеют, как правило, высокий процент (от 40 до 65 %) метилированных карбоксильных групп галактуронатных остатков. Остатки галактуроновой кислоты могут также содержать некоторое количество ацетил-эстерифицированных гидроксильных групп.

Совместное действие различных ферментов приводит к эффективной деградации пектиновых веществ и последующему использованию образующихся пектиновых олигомеров в качестве источника углерода для роста бактерий. Пектиназы классифицируют по природе атакуемых связей на две группы: эстеразы (пектинметилэстеразы и пектинацетилэстеразы) и деполимеразы (пектатлиазы, пектинлиазы и полигалактуронатлиазы). Деполимеразы, в свою очередь, различаются по предпочитаемому ими субстрату — пектин (пектинлиазы) или полигалактуроновая кислота (пектат- и полигалактуронатлиазы) и, кроме того, по механизму действия на α -1,4-гликозидные связи в молекулах пектина или полигалактуроновой кислоты — β -элиминация (пектатлиазы и пектинлиазы) либо гидролиз (полигалактуронатлиазы). По типу атаки полимерной молекулы субстрата (терминальный или неупорядоченный) деполимеразы принадлежат к экзо- или эндотипу.

Пектатлиазы относятся к важнейшим пектолитическим ферментам, продуцируемым бактериями рода *Erwinia*, и играют основную роль в развитии симптомов заболевания у растений. Они действуют на внутренние α -1,4-гликозидные связи в молекулах пектиновых веществ путем β -элиминации, что приводит к образованию

4,5-ненасыщенных на невосстанавливающем конце олигомеров. Пектатлиазы у продуцирующего их вида бактерий представлены несколькими изоформами ферментов, отличающимися друг от друга кинетическими и физико-химическими свойствами. Подавляющее число изоферментов пектатлиаз секретируется клетками в окружающую среду, где они проявляют свою активность в отношении пектиновых полимеров и олигомеров, однако описаны пектатлиазы, имеющие внутриклеточную локализацию.

Так, большая часть пектолитической активности бактерий *Erwinia chrysanthemi*, выявляемая на синтетических средах, является результатом совместного действия пяти основных изоферментов, различающихся по значению изоэлектрической точки: PelA, PelB, PelC, PelD и PelE. Однако бактерии, имеющие мутации во всех пяти основных генах пектатлиаз, еще обладают мацерирующей активностью на растительных тканях. Это привело к обнаружению пяти новых изоформ пектатлиаз, которые вносят меньший вклад в суммарную пектолитическую активность бактерий *Erwinia chrysanthemi*, поэтому они получили название минорных.

Описано не менее шести изоферментов пектатлиаз, продуцируемых различными штаммами *Erwinia carotovora*. Причем бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* и *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* синтезируют практически одинаковые «наборы» пектатлиаз. Отмечаются лишь некоторые штаммовые вариации в количественном содержании различных форм этого фермента. Кроме того, если у различных штаммов бактерий *Erwinia chrysanthemi* наблюдаются существенные различия в значениях рI изоферментов, то у представителей двух подвидов *Erwinia carotovora* они незначительны.

Несмотря на многообразие изоферментов, продуцируемых бактериями рода *Erwinia*, имеется ряд особенностей, присущих всем изоферментам.

Все секретируемые эндопектатлиазы реакционноспособны только в комплексе с ионами Ca^{2+} , другие тестируемые ионы либо не оказывали существенного влияния (Cu^{2+} , Mg^{2+}), либо сильно ингибировали (Zn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+}) активность изоферментов пектатлиаз. Показано, что связывание ионов Ca^{2+} с пектатлиазами увеличивает их стабильность в реакционной среде. Оптимальным для действия выделенных изоферментов является слабощелочная или щелочная реакция среды.

Однако субстратная специфичность и характер образуемых продуктов сильно различаются при действии изоферментов разных форм пектатлиаз. Использование пектинов, имеющих различную степень метилирования карбоксильных групп, показало, что только некоторые изоферменты можно назвать истинными пектатлиазами, наилучшим субстратом для которых является полигалактуроновая кислота. Большинство пектатлиаз проявляет максимальную активность на пектинах с определенной степенью (10—45 %) метилирования карбоксильных групп.

В результате ферментативной реакции секретируемые изоферменты эндопектатлиаз *Erwinia chrysanthemi* и *Erwinia carotovora* образуют олигомеры пектиновых веществ различной длины — преимущественно ненасыщенные ди- и тригалактуроновые кислоты в равных количествах, а также тетра- и пентамеры. Внутриклеточные экзопектатлиазы проявляют максимальную активность на тетра- и тримерах, в результате чего достигается полная деполимеризация пектиновых веществ, начальные стадии которой протекают во внеклеточной среде.

Полигалактуроназы отличаются от пектатлиаз гидролитическим механизмом расщепления пектиновых веществ, в результате чего из полимерных молекул образуются насыщенные олигомеры. Бактерии *Erwinia carotovora* (подвиды *carotovora* и *atroseptica*) продуцируют секретируемые эндополигалактуроназы, образующие олигомеры различной длины. В то же время у бактерий *Erwinia chrysanthemi* описаны и секретируемые, и внутриклеточные экзополигалактуроназы, образующие в результате деструкции пектиновых веществ только один продукт — насыщенную ди-галактуроновою кислоту. Характерной чертой полигалактуроназ является то, что субстратом для этих ферментов является только полигалактуроновая кислота и ее олигомеры, тогда как на пектинах даже с низкой степенью метилирования они неактивны.

В отличие от полигалактуроназ, пектинлиазы разрушают пектины с высокой степенью метилирования (до 98 %), тогда как на полигалактуроновою кислоте они не проявляют активности. Описанные ферменты относятся к эндопектинлиазам. Показано, что их активность значительно выше у штаммов *Erwinia carotovora*, чем у *Erwinia chrysanthemi*.

Совместно с группой деполимеризующих ферментов на природные пектины воздействует ряд ферментов, относящихся к эстеразам. Так, у бактерий *Erwinia chrysanthemi* описаны две пектинметилэстеразы и пектинацетилэстераза.

Пектинметилэстеразы деметилируют пектины с образованием метанола и полигалактурановой кислоты. Показано, что пектины с высокой степенью метилирования являются менее предпочтительными субстратами для пектинметилэстераз, чем частично метилированные. Степень ацетилирования природных пектинов может быть выше 20 %.

Пектинацетилэстераза деацетилирует пектины с образованием ацетата и полигалактурановой кислоты. Активность пектинметилэстераз и пектинацетилэстераз возрастает после предварительной деполимеризации пектинов пектатлиазами. В свою очередь, в результате действия эстераз после удаления метильных и ацетильных групп активность пектатлиаз возрастает.

Таким образом, в результате внеклеточной деградации пектиновых веществ комплексом ферментов образуются олигогалактуронаты различной длины с преобладанием ди- и тримеров (рис. 1). Далее с помощью специфических транспортных систем (TogM_{NAB} и TogT) они поступают в цитоплазму, хотя олигомеры, содержащие четыре и более остатков галактурановой кислоты, могут укорачиваться до ди- и тримеров за счет действия периплазматических экзопектатлиаз и экзополигалактуроназ. В цитоплазме тримеры расщепляются до дигалактурановых и галактурановых кислот (пектатлиаза PelW бактерий *Erwinia chrysanthemi*), которые катаболизируются до пирувата и 3-фосфоглицеральдегида двумя независимыми путями с образованием общего промежуточного соединения 2-кето-3-дезоксиглюконата.

Бактерии рода *Erwinia* способны использовать в качестве источника углерода и другие полимерные компоненты клеток растений. К таким компонентам относится целлюлоза, структурный компонент клеточных стенок, представляющая линейный гомополимер, состоящий из остатков D-глюкозы, связанных между собой β -1,4-глюкозидными связями. Целлюлазы, принадлежащие к большому семейству гликозилгидролаз, продуцируются рядом фитопатогенных и сапрофитных бактерий и грибов. В соответствии с механизмом ферментативной реакции они делятся на экзо- и эндогидролазы. *Эндогидролазы* (эндоглюконазы) действуют на внутренние β -1,4-глюкозидные связи в молекулах целлюлозы, что приводит к образованию смеси целлоолигосахаридов. *Экзогидролазы* (экзоглюконазы) действуют со стороны невозстанавливающего конца цепи целлюлозы, что сопровождается образованием глюкозы или целлобиозы. β -Глюкозидазы отщепляют остат-

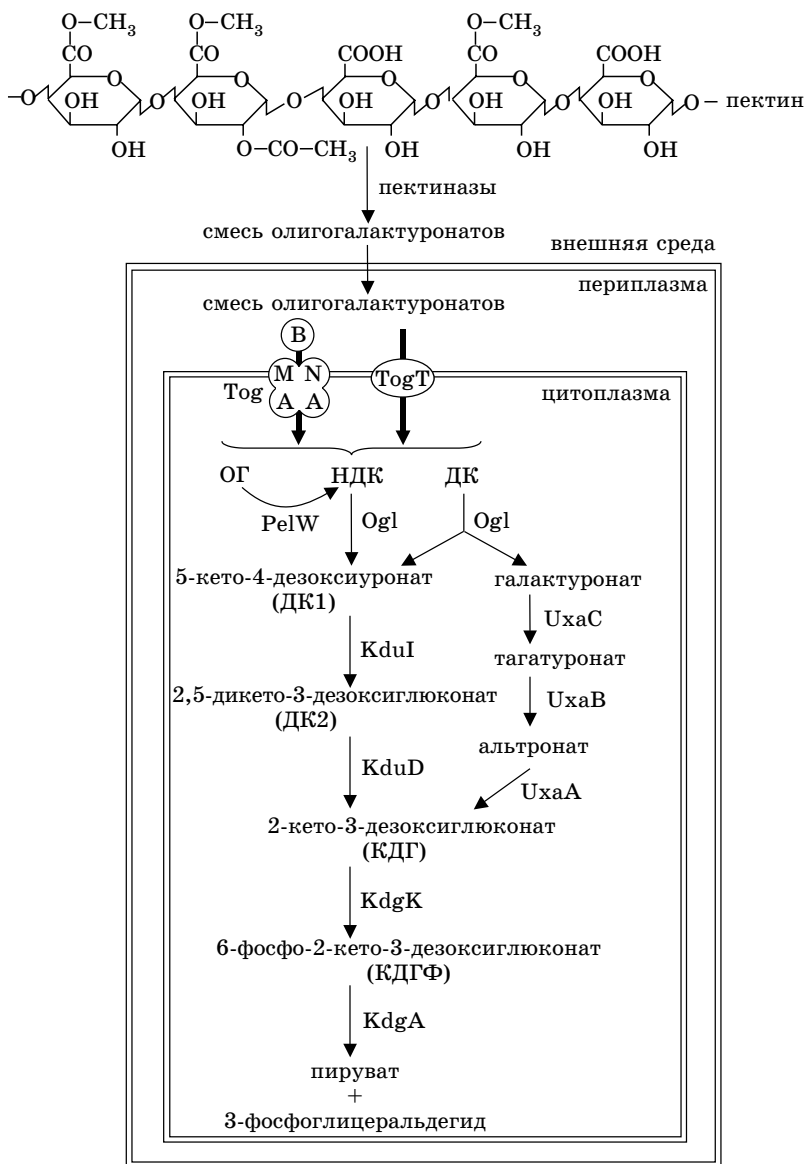


Рис. 1. Катаболизм пектинов у бактерий рода *Erwinia*

ки глюкозы с невосстанавливающего конца коротких целлоолигосахаридов. Многие бактерии и грибы, использующие целлюлозу, продуцируют комплекс целлюлолитических ферментов, который может насчитывать до десяти различных белков. Однако у бактерий рода *Erwinia* число выявленных ферментов, характеризующихся целлюлолитической активностью, весьма ограничено.

Описанные для бактерий *Erwinia chrysanthemi* и *Erwinia carotovora* целлюлазы относятся к классу эндоглюконаз. Так, бактерии *Erwinia chrysanthemi* продуцируют как минимум две различные эндоглюконазы — CelZ и CelY. Фермент CelZ является главной эндоглюконазой бактерий этого вида и обеспечивает в среднем 95 % общей целлюлолитической активности, тогда как только 5 % суммарной активности связано с белком CelY.

Полученные препараты целлюлаз характеризуются некоторыми общими свойствами. Значения рI очищенных препаратов белков целлюлаз находятся в области рН ниже 7,0, максимальную активность ферменты проявляют при слабокислой или нейтральной реакции среды и температуре 40—50 °С. Изучение локализации целлюлаз показало, что они секретируются клетками в окружающую среду. Предпочтительным субстратом для целлюлаз является аморфная форма целлюлозы и ее синтетический аналог — карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ). В то же время активность ферментов на кристаллической целлюлозе очень низкая.

Недавно проведенные исследования установили синергизм действия эндоглюконаз CelZ и CelY *Erwinia chrysanthemi* при гидролизе КМЦ и аморфной целлюлозы. Он основан на различиях в субстратной предпочтительности этих ферментов. Эндоглюконаза CelY неспособна гидролизовать растворимые целлоолигосахариды (целлотетрозу и целлопентозу), но эффективно гидролизует КМЦ и аморфную целлюлозу с формированием олигомеров, содержащих в среднем 10,7 остатков глюкозы. В то же время CelZ лучше гидролизует целлотетрозу, целлопентозу и аморфную целлюлозу с образованием целлобиозы и целлотриозы. При гидролизе КМЦ этой целлюлазой образуются олигомеры, содержащие в среднем 3,6 остатка глюкозы. При совместном действии на КМЦ обоих эндоглюконаз обеспечивается ее эффективный гидролиз с образованием продуктов, содержащих в среднем 2,3 остатков глюкозы. Исследование комбинации действия этих ферментов показало, что наиболее результативная деструкция молекул целлюлозы достигается в случае использования в качестве первого фермента CelY, продукты реакции которого далее эффективно гидро-

лизуются CelZ. Таким образом, можно предположить, что при гидролизе целлюлозы первоначально действует эндоглюконаза CelY. Образующиеся олигомеры в дальнейшем гидролизуются до целлобиозы и целлотриозы эндоглюконазой CelZ. Ди- и тримеры затем транспортируются в клетки с помощью фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы для целлобиозы и гидролизуются в цитоплазме фосфо-β-глюкозидазой. Образующиеся продукты, глюкоза и глюкоза-6-фосфат, претерпевают дальнейшие превращения в цикле гликолиза.

Внеклеточные пектиназы и целлюлазы транспортируются из клеток с помощью системы секреции II типа, выполняющую основную роль в секреции факторов вирулентности у бактерий рода *Erwinia*. Этот тип секреции протекает с участием специфических белковых факторов в два этапа и требует наличия типичной N-концевой сигнальной последовательности у секретируемых белков.

В дополнение к пектолитическим и целлюлолитическим ферментам ряд эрвиний и псевдомонад, вызывающих мягкие гнили у растений, продуцируют также протеолитические ферменты.

Протеазы бактерий *Erwinia chrysanthemi* и *Erwinia carotovora* проявляют свою активность вне клеток синтезирующих их бактерий. Транспорт белков из клеток осуществляется с помощью системы секреции I типа. Ферменты относятся к группе металлопротеаз, проявляющих активность в присутствии ионов двухвалентных металлов: Zn^{2+} и Ca^{2+} . Так, у бактерий *Erwinia chrysanthemi* описаны четыре металлопротеазы — PrtA, PrtB, PrtC и PrtG. Значения pI очищенных белков находятся в области $pH < 7,0$, активность же ферменты проявляют при $pH > 7,0$. Протеазы проявляют свою активность на таких субстратах, как азоказеин и желатин. Хотя об их участии в деградации растительных белков известно немного, тем не менее показано, что протеазы *Erwinia carotovora* в экспериментах *in vitro* способны деградировать картофельный лектин — гликопротеин, участвующий в защите растения от патогенов. Функция деградации была описана и для металлопротеаз *Xanthomonas campestris*. Кроме того, протеазы PrtA и PrtC бактерий *Erwinia chrysanthemi* участвуют в процессинге пектатлиазы Pell, протекающем как в культуральной среде, так и *in planta* после секреции пектатлиазы. Образующийся короткий продукт, Pell-3, вызывает ярко выраженную реакцию гиперчувствительности на листьях табака. Таким образом, протеазы *Erwinia chrysanthemi* принимают участие во взаимодействии патогенных бактерий с растениями. Некоторые исследователи считают,

что внеклеточные протеазы *Erwinia* могут также участвовать в деградации растительных белков и способствовать использованию образующихся аминокислот для биосинтеза микробных белков.

Высокие уровни продукции и специфической активности индивидуальных ферментов на пектиновых полимерах, наблюдаемые у бактерий на синтетических средах, не обязательно свидетельствуют об их значимости в процессах патогенеза, что и было показано в экспериментах *in planta*.

Различия в активности индивидуальных ферментов, наблюдаемых в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, имеют объяснение. Так, более высокую мацерирующую способность очищенных пектатлиаз PelD и PelE по сравнению с ферментами PelB и PelC объясняют различием оптимальных значений кислотности среды, необходимых для проявления их активности. Пектатлиазы PelD и PelE способны проявлять активность в широком диапазоне значений pH, максимальные значения которой соответствуют pH 8,0—8,5. Пектатлиазы PelB и PelC активны в более узком диапазоне значений pH, пик активности наблюдается при pH 9,2. Эти различия могут сказаться в растительных тканях, имеющих «кислые» значения pH. Степень метилирования и ацетилирования пектиновых веществ также сказывается на активностях индивидуальных ферментов. Размер предпочтительного для фермента субстрата, степень экспрессии конкретного гена в растительных тканях сильно различаются. Очевидно, что характеристики индивидуальных белков, полученные в экспериментах *in vitro*, не отражают их участия в патогенезе при совместном действии множества ферментов.

Роль индивидуальных ферментов в развитии симптомов заболевания изучали на различном растительном материале с использованием мутантных по определенным генам бактерий. Делеция генов главных пектатлиаз у бактерий *Erwinia chrysanthemi* приводила к снижению вирулентности на растениях-хозяевах. Однако и мутации в генах минорных пектатлиаз также снижали вирулентность бактерий на растениях-хозяевах, что свидетельствовало о важной роли минорных пектатлиаз в развитии заболевания.

Таким образом, можно сделать вывод о различном участии ферментов, продуцируемых бактериями рода *Erwinia*, во взаимодействии с растениями-хозяевами и протекании инфекционного процесса. Вклад индивидуальных ферментов в патологический процесс зависит от биохимических характеристик белка, которые

можно оценить в экспериментах *in vitro*. Однако способность проявлять активность в тканях различных растений и участвовать в совместном действии с другими ферментами в процессе протекания инфекции может отличаться для разных ферментов. Кроме того, степень экспрессии для индивидуальных генов в растительных тканях также сильно варьирует. Неодинаково и участие различных классов ферментов в обеспечении вирулентных свойств бактерий. Так, у бактерий *Erwinia chrysanthemi* для проявления вирулентных свойств необходимы только гены пектиназ, тогда как участие целлюлаз и протеаз в процессах патогенеза незначительно. В то же время для системного инфицирования растений-хозяев бактериями *Erwinia carotovora* необходимо совместное участие как пектиназ, так и комплекса ферментов, включающего целлюлазы и протеазы.

Способность адаптироваться к различным условиям требует координированной экспрессии бактериальных генов, обеспечивая глобальную регуляцию процесса патогенеза. Общая регуляция контролируется множеством факторов, часть из которых являются внешними, а часть — внутренними, находящимися под контролем самого патогена. Внешние (экологические) факторы сильно влияют как на рост бактериальной популяции, так и на продукцию факторов вирулентности. Как правило, продукция факторов вирулентности стимулируется в стрессовых по сравнению с благоприятными для роста растений условиях.

Температура является важным внешним фактором, влияющим на вирулентность пектолитических *Erwinia*. Продукция пектиназ возрастает при низких температурах выращивания и снижается при благоприятных температурных условиях.

Анаэробные условия снижают резистентность растений к патогенам и увеличивают продукцию бактериями факторов патогенности, но неблагоприятно сказываются на росте бактерий. Показано, что суммарная пектатлиазная активность у бактерий *Erwinia chrysanthemi* возрастает в анаэробных условиях, хотя экспрессия генов индивидуальных пектатлиаз проявляется в этих условиях по-разному. Эффективность анаэробного дыхания бактерий зависит от присутствия альтернативных акцепторов электронов, роль которых успешно могут выполнять нитраты, присутствующие в достаточных количествах в растительных тканях. Действительно, высокие концентрации нитратов повышают вирулентность бактерий *Erwinia*, тогда как при дефиците азота ингибируется продукция таких факторов вирулентности, как пектатлиазы.

На продукцию деградирующих клеточные стенки ферментов влияет осмотическое давление среды. Показано, что и скорость роста, и продукция пектиназ у *Erwinia chrysanthemi* снижаются в условиях высокой осмолярности среды. При этом фиксируется ингибирование секреции пектатлиаз и накопление ферментов в периплазматическом пространстве.

Изучение продукции ферментов на различных стадиях роста бактериальной популяции показало, что индукция синтеза пектиназ и целлюлаз у бактерий *Erwinia* происходит в поздней экспоненциальной и ранней стационарной фазах роста. Исключением являются протеазы, продукция которых индуцируется в ранней экспоненциальной фазе роста.

Несмотря на воздействие неспецифических внешних факторов, зачастую именно присутствие компонентов растительных тканей вызывает наиболее сильную экспрессию генов факторов патогенности.

Установлено, что синтез ферментов, деполимеризующих компоненты клеточных стенок, индуцируется в присутствии растительного экстракта и, в частности, пектиновых веществ. Уровни экспрессии генов пяти основных пектатлиаз у *Erwinia chrysanthemi* были достаточно высоки в условиях отсутствия индукции и в значительной степени индуцировались растительным экстрактом. В то же время минорные пектатлиазы *Erwinia chrysanthemi*, базальный уровень экспрессии которых очень низкий, реагировали на присутствие полигалактуроновой кислоты лишь небольшим (3—5 раз) увеличением экспрессии генов.

Необходимо отметить, что о реальной продукции индивидуальных ферментов наиболее достоверно можно судить по результатам экспериментов, полученным *in vivo*, поскольку данные, полученные в искусственных условиях, не всегда отражают истинную картину патологического процесса.

Уже отмечалось, что минорные пектатлиазы *Erwinia chrysanthemi*, характеризующиеся низкими уровнями продукции на синтетических средах, тем не менее существенны для проявления вирулентных свойств бактерий. Оказалось, что экспрессия этих изоферментов в растительных тканях очень высока и существенно отличается от их продукции в условиях *in vitro*. Экспрессия генов основных пектатлиаз в растительных тканях, как правило, сопоставима с продукцией этих ферментов на синтетических средах в условиях индукции или даже может быть ниже.

Таким образом, при взаимодействии патогена с растением на экспрессию бактериальных генов действует группа внешних факторов, суммарное влияние которых проявляется на клеточном уровне. В результате такого влияния изменяется экспрессия регуляторных генов бактерий, участвующих в инфекционном процессе, что и обеспечивает изменение уровня продукции бактериями мацерующих растительный материал ферментов.

7.2. Продукция токсинов и их роль в патогенезе

Токсины, которые продуцируются фитопатогенными микроорганизмами и являются факторами, вызывающими развитие заболеваний, могут быть условно разделены на два типа: неспецифические (или *вивотоксины*) и специфические (или *патотоксины*). Вивотоксины рассматриваются как вещества, мигрирующие по растению и обеспечивающие дальнейшее развитие биотрофных патогенов. Это название было предложено в 1953 г. Даймондом и Ваггонером для веществ, которые:

- имеют микробное происхождение;
- воспроизводят симптомы заболевания не только у хозяев данного патогена, но и у нехозяйских растений;
- обнаруживаются не только в системе *in vitro*, но и в зараженном данным патогеном растении (*in planta*).

В настоящее время описано около 150 грибных и бактериальных вивотоксинов, которые неспецифически нарушают дыхание, проницаемость мембран и общий метаболизм. Некоторые имеют относительную избирательность действия, нарушая биосинтез хлорофилла или транспорт воды, что приводит к развитию хлорозов или увяданию. Сравнительная характеристика устойчивости и восприимчивости растений к заболеваниям, которая определяется продукцией патогеном токсинов, приведена в табл. 2.

По *химической структуре* вивотоксины могут быть:

- органическими кислотами (щавелевая кислота);
- циклическими ароматическими соединениями (кумарины, алкалоиды, альтерналиевая и фузариевая кислоты);
- циклическими пептидами (фазеолотоксин, тентоксин);
- гликопептидами (бактериальный рак томатов);
- полисахаридами;
- полипептидами.

Таблица 2

**Проявление устойчивости или чувствительности
в присутствии токсинов**

Устойчивость приводит	Чувствительность зависит
к ограничению развития или подавлению патогена в растении-хозяине при действии физических или химических факторов	от количества вырабатываемого токсина, достаточного для повреждения тканей и нарушения механизма устойчивости, препятствующего росту патогена
отсутствию распознавания токсина или высокой степени толерантности к нему	наличия рецептора для токсина на клеточной стенке или низкого порога устойчивости к нему
отсутствию индукции или подавлению образования токсина	наличия индукторов синтеза или предшественников образования токсинов
распаду токсина	отсутствия детоксификации

По механизму действия грибные и бактериальные токсины делят на две группы: ингибиторы определенных ферментов растений и мембраноактивные вещества.

Среди ингибиторов растительных ферментов хорошо изученным является *табтоксин* — токсин *P. syringae* pv. *tabacci*, или токсин бактериальной рябухи табака. Молекула представляет собой дипептид, соединенный с лактамным кольцом. В растении за счет активности протеаз происходит отщепление активного фрагмента молекулы — *табтоксинин-β-лактама*. Действие этой активной формы связывают с необратимым ингибированием активности глутаматсинтетазы, что приводит к накоплению аммония и разрушению мембранных структур, разобщению фотофосфорилирования, ингибированию дыхания и фотосинтеза. Данные нарушения выражаются как хлороз и задержка роста.

Фазеолотоксин — циклический трипептид *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, возбудителя угловатой пятнистости огурца. Токсин может существовать в активной и неактивной формах. В растении с участием протеаз образуется активная форма — *фазеотоксин орнитидин*. В тканях растений, пораженных возбудителем или обработанных токсином, концентрация орнитина возрастает в 100 раз, а аргинина падает на 50 %. Следовательно, токсин специфически ингибирует активность фермента орнитилкарбомаил трансферазы, который катализирует конверсию орнитина в цитруллин и аргинин. Такое подавление ведет к снижению скорости синтеза белка, в том числе и ферментов биосинтеза хлорофилла. Развивающийся хлороз может быть остановлен за счет обработки растений цитруллином и аргинином. Мутанты по продукции ток-

сина были способны размножаться в тканях, но не ингибировали активность фермента.

Многие патовары *P. syringae* (pv. *coronafaciens*, pv. *glycinea*) продуцируют токсин *коронатин*. Этот токсин имеет уникальную химическую структуру, напоминающую жасмоновую кислоту, которая участвует в передаче сигналов по растению. Токсин вызывает пожелтение и хлороз листьев, ингибирует рост корней, вызывает гипертрофию клубней картофеля. Механизм действия обусловлен снижением синтеза хлорофилла за счет ингибирования синтеза аминокислотной кислоты. Гипертрофия клубней связана с продукцией индолилуксусной кислоты (ИУК). В зависимости от количества образуемого токсина изменяется и степень выраженности симптомов заболевания: от образования мелких хлоротичных до появления крупных пятен, приводящих к остановке роста.

Тагетитоксин вызывает апикальный хлороз на растениях подсолнечника, циннии, артишока. Хлороз наблюдается на ранней стадии роста, из этого следует, что механизм действия токсина связан с ингибированием образования хлоропластов. В обработанных токсином хлоропластах нарушается структура гран и ламелл, снижается количество рибосом, изменяется активность некоторых ферментов.

Мембраноактивные вещества обнаруживаются у грибов и среди токсинов бактерий рода *Clavibacter*. Такие токсины индуцируют потерю метаболитов из клетки и некроз растения, влияют на трансмембранный перенос ионов и открывают устьица, вызывая увядание растений.

Сирингомицин и *сиринготоксин* рассматривают как пептидные антибиотики, действующие также и на микроорганизмы. При исследовании митохондрий было показано, что сирингомицин вызывает нарушение структуры и впоследствии их полное разрушение. Нарушаются процессы окислительного фосфорилирования и образования АТФ.

Фузикокцин является токсином, вызывающим рак и увядание персика и миндаля, обладает свойствами гормоноподобных веществ (ауксинов и цитокининов) и стимулирует в тканях растений ряд процессов, контролируемых ими. Это проявляется в повышенной транспирации пораженных растений из-за сильного раскрытия замыкающих клеток устьиц и изменения их формы. Предполагают, что фузикокцин связывается с белковыми рецепторами на плазмалемме растительных клеток и стимулирует систему трансмембранного переноса веществ за счет нарушения обмена ионов калия

и водорода. Фузикокцин индуцирует растяжение ткани, прерывание периода покоя у семян.

Следует также указать, что клетки многих фитопатогенов способны образовывать одновременно несколько различных токсинов с разными механизмами действия.

Патотоксинами называют вещества, повреждающие только определенные виды или даже сорта растений. Часть из них относится к единственным факторам патогенности, которые определяют развитие заболевания (специфичные для хозяев патогены), другие рассматриваются как вторичные факторы, которые резко усиливают патогенность на определенных видах или сортах (селективные для хозяев). Участие патотоксинов в патологическом процессе установлено не менее чем для 13 болезней, как правило, грибной этиологии и продуцируемых примерно 10 видами грибов.

Химическая структура патотоксинов. Молекулы патотоксинов могут содержать циклические пептиды, которые образуются в процессах нематричного синтеза: НV-токсин (викторин), НС-токсин, АМ-токсин. В составе таких пептидов имеются как обычные, так и необычные (например, дихлорлецин, оксизин) для белков аминокислоты. Т-токсин и РМ-токсин — линейные поликетолы, которые различаются длиной поликетидной цепи. Гликозидную структуру имеют НS-токсины, у которых два остатка галактозы соединены с сесквитерпеновым агликоном. На примере НS-токсина показано, что терпеновая часть молекулы отвечает за токсичность, а сахарные остатки выполняют рецепторную функцию в молекуле.

Характерными особенностями патотоксинов являются низкая летальная доза и высокая селективность их действия. Кроме того, предполагают, что главная функция специфических токсинов заключается в подавлении защитных реакций растений, поэтому их можно рассматривать как специфические супрессоры.

Считают, что *механизм действия* патотоксинов связан с рецепторной специфичностью; устойчивые растения не имеют сайтов связывания токсина, поскольку после обработки токсинами происходит утечка метаболитов и электролитов, инвагинация мембраны и ее деполаризация. Некоторые токсины связываются с цитоплазматической мембраной (НS-токсин), мембраной митохондрий (Т-токсин), плазмалеммой и мембраной хлоропластов (АМ-токсин).

Наиболее активно действие токсинов и их продукция изучались на примере грибов *Alternaria* (в Японии) и *Helminthosporium* (в Новом Свете). Для *Helminthosporium* показана высокая специализация, выражающаяся в том, что в зависимости от вида растения-хозяина могут образовываться четыре различных токсина.

HV-токсин (*H. victoriae*, овес) связывается с двумя рецепторными белками Р и Н, которые являются разными формами фермента глициндекарбоксилазы, участвующего в фотодыхании. *In planta* в присутствии викторина наблюдается подавление активности Р и Н.

НС-токсин (*H. carbonum*, кукуруза) является тетрапептидом. В восприимчивых клетках под его действием увеличивается активность пероксидазы, эстеразы и лейцинаминопептидазы, наблюдается стимуляция поглощения ионных, особенно катионов калия, и неионных веществ, что приводит к гиперполяризации мембран.

Т-токсин (*H. maydis*, кукуруза) повреждает мембраны митохондрий сортов с цитоплазматической мужской стерильностью. В результате наблюдается разобщение окислительного фосфорилирования, потеря электролитов и катионов. Ответственным за это считают белок, который имеется в мембранах митохондрий с цитоплазматической мужской стерильностью, но отсутствует у нормальных сортов. В присутствии токсина между ним и белком происходит полимеризация и образуются трансмембранные каналы, через которые происходит утечка электролитов.

HS-токсин (*H. sacchari*, сахарный тростник) имеет гликозидную структуру, в которой два остатка галактозы соединены с сесквитерпеноидным агликоном. Сахарные остатки отвечают за рецепторные свойства, а агликоновая часть — за токсичность. В результате действия токсина наблюдается утечка ионов из клетки.

При исследовании патотоксинов АК грибов *Alternaria* показано, что при их действии наблюдается два пика активности: первый — через 4 ч за счет прорастающих спор, второй — через 9 ч в результате прорастания мицелия. При этом отмечено, что в первом случае концентрация токсина достаточна для подавления иммунного ответа в зоне внедрения, во втором — для гибели клеток.

Для викторина показано, что в одних и тех же растениях, при низких его концентрациях взаимодействующий с ним ген выступает как ген устойчивости, а викторин — как элиситор иммунного ответа, при высоких концентрациях — как ген восприимчивости, а патотоксин вызывает гибель клеток.

Заключение о том, что одно и то же соединение в зависимости от концентрации может выступать в качестве как элисатора, так и супрессора подтверждается и другими примерами: *avr*- и *vir*-гены некоторых штаммов и видов бактерий имеют гомологичные последовательности ДНК.

7.3. Продукция экзополисахаридов как фактор патогенности

Основные представители бактерий, которые вызывают увядание растений в результате закупоривания сосудов, представлены в табл. 3.

Бактерии проникают в растения пассивно через повреждения корня или с помощью насекомых в раны или нектарники цветков. Для *R. solanacearum*, продуцирующих пектаттлазы, возможен еще один способ проникновения: через гидролиз паренхиматозных клеток, которые окружают место отхождения корней, что способствует проникновению бактерий в ксилему.

Классические симптомы увядания, выражающиеся в снижении тургора листьев большинства травянистых растений, пораженных патогенами, зависят от вирулентности изолята, возраста, особенностей питания и условий окружающей среды для хозяина. Васкулярные бактерии продуцируют сложные гетеро- или экзополисахариды (ЭПС), которые, окружая бактериальные клетки, защищают их от быстрого обезвоживания и способствуют концентрированию в клетке питательных веществ и внутриклеточных ферментов.

Таблица 3

Основные бактериальные патогены проводящей системы

Патоген	Растение-хозяин
<i>Clavibacter subsp. michiganense</i>	Томаты
subsp. <i>insidiosum</i>	Люцерна
subsp. <i>nebrascensis</i>	Кукуруза
subsp. <i>sepedonicum</i>	Картофель
<i>Curtobacterium</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Фасоль, вигна
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Хризантемы
pv. <i>dianthicola</i>	Томаты, картофель, бегония
<i>Pantoea stewartii</i>	Кукуруза
<i>Pantoea tracheiphila</i>	Цитрусовые, тыквенные
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Пасленовые

Относительно механизмов развития увядания существуют две принципиально различные гипотезы. В соответствии с первой, основанной на токсичности ЭПС, постулируется, что низкомолекулярные токсины необратимо повреждают мембраны растительной клетки, включая потерю тургора. Вторая гипотеза — теория механического блокирования — предполагает, что смесь бактерий и ЭПС приводит к дисфункции проводящей водной системы. Кроме того, может наблюдаться образование мельчайших частиц ЭПС, которые не могут проникать через ямные поры мембран.

Доказательства роли продукции ЭПС в патогенезе следующие:

- транспорт воды в зараженных растениях значительно снижается;
- только вирулентные штаммы образуют ЭПС;
- ЭПС образуются в ксилеме только растений-хозяев;
- очищенный ЭПС вирулентных штаммов в низких концентрациях индуцирует те же симптомы на поврежденных растениях, что и патоген;
- в больных растениях изменения фотосинтеза и транспирации такие же, как и у растений в условиях искусственного дефицита воды.

В 1958 г. была показана связь между продукцией ЭПС и патогенностью *R. solanacearum* для табака. О роли продукции ЭПС свидетельствует и тот факт, что шероховатые мутанты, утратившие ЭПС или изменившие его структуру, являются авирулентными и связываются с поверхностью растительных клеток-хозяев (в отличие от высоковирулентных гладких).

ЭПС, продуцируемый *R. solanacearum*, секретируется в окружающую среду, почву или ткани растения, откуда легко выделяется при центрифугировании с последующим осаждением этанолом. Именно он рассматривается как основной индуцирующий увядание агент, помимо образования таких факторов патогенности, как внеклеточные ферменты.

ЭПС содержит обычные сахара: глюкозамин, глюкозу, фруктозу, рамнозу, рибозу, ксилозу. Качественное и количественное содержание этих сахаров может варьировать в зависимости от условий культивирования. Изучение различных по вирулентности мутантов у данных бактерий сильно облегчается тем, что еще в 1954 г. был предложен достаточно простой и надежный способ их обнаружения. Он заключается в том, что на среде с ТТХ (трифенилтетразолиум хлорид) авирулентные мутанты образуют плотные колонии с темно-красным центром, вирулентные — слизистые неправильной формы колонии с розовым центром.

Потеря способности продуцировать ЭПС и изменять морфологию колоний на ТТХ-среде сопровождается изменением ряда свойств: потерей вирулентности, способности индуцировать реакцию сверхчувствительности на листьях табака, снижением продукции целлюлазы, увеличением подвижности, дефектами в ЛПС и др.

Для *R. solanacearum* описан и ряд других мутантов по вирулентности, полученных путем транспозонового (Tn5) мутагенеза. Мутанты одного типа были неотличимы от спонтанных мутантов (ЭПС⁻), другого — имели морфологию колоний бактерий дикого типа, были авирулентными, но сохраняли способность к продукции некоторого количества ЭПС (они обозначены ЭПС¹) и приводили к гибели растений, но в течение более продолжительного времени.

Для *P. stewartii*, возбудителя увядания кукурузы, другие факторы патогенности, кроме продукции ЭПС, неизвестны. Возникающее заболевание может проявляться по-разному: на первой стадии бактерии способны расти в межклеточном пространстве молодых листьев, где за счет продукции кислого и гигроскопичного гетерополисахарида активно поглощают воду из растительных клеток, что, с одной стороны, обеспечивает их рост, с другой — нарушает функционирование клеточной мембраны и вызывает накопление жидкости в межклеточном пространстве. Такие симптомы обозначают Wts (water soaking). Их развитие рассматривают как предшествующую увяданию стадию.

При характеристике различных типов мутантов и бактерий дикого типа оказалось, что вирулентные штаммы способны вызывать и развитие Wts-симптомов, и увядание; не вызывающие ни тех, ни других симптомов мутанты являются полностью авирулентными, а Wts⁺EPS⁻-мутанты рассматриваются как частично вирулентные. Wts⁻-мутанты обладают такой же скоростью роста в растениях, как и бактерии дикого типа, что прямо указывает на их способность повреждать растительные ткани.

ЭПС *P. stewartii* состоит из глюкозы, галактозы и глюкуроновой кислоты, в его составе выделяют две фракции: капсульную и слизь. Предполагают, что они имеют одинаковый состав, но капсульный слой продуцируется конститутивно, а слизистый — только в присутствии легкоферментируемых сахаров. Помимо обеспечения вирулентных свойств, ЭПС может играть защитную роль против фитоагглютининов и при колонизации переносчиков.

Продукция ЭПС детерминируется пятью генами (размер 10 кб), обозначенными *epsA-D*. Подчеркивается, что размеры данного

кластера достаточны для того, чтобы кодировать все трансферазы, полимеразы и белки для транспорта из клетки, необходимые для образования ЭПС; в расположении на хромосоме *eps*-генов имеется большое сходство с локализацией ЭПС-генов энтеробактерий, а также сходного *E. coli* механизма регуляции работы с помощью Rcs-белков.

Wts-гены отнесены к генам специфической патогенности. Их функционирование необходимо и для развития Wts-симптомов, и для увядания. Данные гены организованы в три группы. Учитывая наличие двух групп генов, предполагается, что факторами патогенности у данных бактерий могут быть ЭПС, неизвестный фактор, выделяющийся из клеток, и набор продуктов каких-то генов, аналогичных *hrp*.

7.4. Образование гормонов как фактор патогенности

К бактериям, индуцирующим гиперплазию или образование галлов, относят *A. tumefaciens*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *E. milletiae* и др. Продукция гормонов свойственна и здоровым растениям, однако при бактериальном поражении их потоки изменяются в направлении инфекции, задерживают старение клеток, стимулируют их деление и растяжение, образование опухолей и пролиферацию. Гиббереллин был выделен впервые из гриба, вызывающего израстание риса. Выделение цитокининов установлено при инфекциях мучнисторосяных и ржавчинных грибов, приводящих к израстанию и потере апикального роста. На растениях развивается множество коротких тонких побегов с деформированными листьями, развивающихся в нижней части стебля.

Регуляция галлообразования наиболее подробно изучена у *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Бактерии вызывают заболевания на растениях олив и олеандрах. Вирулентность обусловлена продукцией индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), синтез которой проходит в два этапа: на первом из триптофана образуется индол-3-ацетамид, на втором — ИУК. Синтез ферментов для первого (триптофан монооксигеназа, ген *iaaM*) и второго (индолацетамид гидролаза, ген *iaaH*) этапов детерминирован наличием плазмиды pIAA. Синтез индолацетамид гидролазы регулируется ИУК по типу обратной связи.

Штаммы, выделенные из растений олеандра, патогенны и для олив, в то время как выделенные из олив заражают только хозя-

ев. Для разных штаммов показано, что соответствующие ферменты могут быть локализованы либо только на плазмиде (штаммы олеандра), либо и на плазмиде, и хромосомально (штаммы олив).

Штаммы, выделенные из олеандра, помимо ИУК, образуют и цитокинин транс-зеатин. Гены биосинтеза цитокинов (*ptz*) были обнаружены на плазмиде.

Мутанты, дефектные по синтезу ИУК, являются одновременно и авирулентными. Этот факт был доказан при элиминации плазмиды с помощью 5-метилтриптофана. Кроме того, гены *iaaM* и *iaaH* являются первыми клонированными генами вирулентности и после переноса в клетки *E. coli* обеспечивают продукцию ИУК. Генетический анализ *P. savastanoi* pv. *savastanoi* показал наличие в составе как хромосомы, так и плазмиды некоторых IS-элементов (IS51 и IS52), что рассматривается как источник возникновения природных авирулентных штаммов. Инсерция этих детерминант в ген *iaaM* приводит к потере вирулентности, изменению продукции ИУК и инактивации как первого, так и второго фермента.

Показано, что существует 50 % гомология между генами *iaaM* и *tms1*, *iaaH* и *tms2* Ti-плазмиды *A. tumefaciens* и 70 % — между IS51 и IS868 Ti-плазмиды.

Вопрос о происхождении генов синтеза ИУК рассматривают с той точки зрения, что они могут обеспечивать бактериям селективные преимущества в природе. Однако оказывается, что ИУК⁻мутанты могут расти и поддерживать жизнеспособность в тканях хозяина. Штаммы же дикого типа стимулируют аномальную пролиферацию клеток хозяина, в результате чего образуется галл. Такая структура интенсивно колонизируется клетками бактерий, причем популяция достигает высокой плотности, в результате чего создается ниша для перенесения неблагоприятных условий.

У возбудителей корончатых галлов *A. tumefaciens* часть ДНК Ti-плазмиды интегрируется в геном растений. В составе Т-ДНК имеются гены *tms1* и *tms2*, которые контролируют образование ИУК, а также ген *ipt*, продукт которого изопентилтрансфераза необходим для образования двух цитокининов — трансрибозилзеатина и трансзеатина. Продукция всех гормонов вызывает быстрые клеточные деления и неопластический рост тканей.

Однако образование гормонов вследствие интеграции Т-ДНК в геном растений является заключительным этапом взаимодействия хозяин — патоген. Начальные его стадии связаны с активнос-

тью хромосомально локализованных генов *chv* (прикрепление бактериальных клеток) и *exo* (продукция ЭПС). Продукты первой группы генов отвечают за образование β -1,2-D-глюканов и их секрецию, а второй — за продукцию гетерополисахарида сукциногликана.

β -1,2-D-глюкан бактериальной клеточной стенки связывается с пектиновыми компонентами или гликопротеинами клеточной стенки. Некоторые *chv*-гены активируют и обеспечивают рост бактерий в кислой среде растительной ткани, хемотаксисе и поступлении сахаров, изменении поверхностных свойств бактерий, приводящих к увеличению агрегации.

A. rhizogenes, вызывающий волосатость корня за счет продукции опинов, в составе Ri-плазмиды содержит гены *rol* (всего 4), которые трансформируют клетку в корневую.

7.5. Образование центров кристаллизации льда

Образование центров кристаллизации льда в охлажденной до -2°C воде свойственно некоторым сапрофитным и фитопатогенным бактериям, среди которых *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. viridiflava*, *X. campestris*, *P. herbicola* и *E. ananas*. Указанные бактерии присутствуют в больших количествах (около $1 \cdot 10^7$ кл/г сырой ткани) на надземных частях растений. Считают, что существует определенная связь между повреждением от заморозков морозочувствительных растений и наличием бактерий. В этом случае при незначительных температурах наблюдается поражение растений, степень которого зависит от концентрации так называемых INA^+ (ice nucleation activity) бактерий. Данное свойство считается условно зависимым фактором патогенности.

Ответственным за образование кристаллов считается белок, который содержится в наружной мембране грамотрицательных бактерий и чувствителен к протеазе и сульфгидрильным реагентам. Белок богат серином, треонином и глицином, а в качестве повторяющихся субъединиц содержит блоки из 8—16 аминокислот. Количество таких повторяющихся структур зависит от температуры. На поверхности такого комплекса или вокруг него располагаются молекулы воды в виде слоев, решетки или сетки. Четвертичная структура такого центра имеет ту же форму, что и кристаллы льда из-за наличия повторяющихся аминокислотных блоков.

Белки центров кристаллизации по активности могут быть разделены на три типа. Белки типа I (или класса A) образуются при температуре от -2 до -5 °C; типа II (класс B) — от -5 до -8 °C; типа III (класс C) — при -10 °C. Белки класса A рассматриваются как первичные, и в результате их структурной модификации образуются белки классов B и C, что сопровождается увеличением кристаллизующей активности. Белки класса B являются гликопептидами и содержат дополнительно остатки маннозы и глюкозамина, а также аспарагина; белки класса A являются липогликопротеинами и содержат дополнительно остаток фосфатидилинозитола, присоединенный к остаткам сахаров.

Помимо температуры, образование белка и его количество регулируется условиями среды: на плотной среде на $1 \cdot 10^9$ клеток *P. syringae* образуются около 300 тыс. молекул, в жидкой культуре — примерно в 10 раз меньше. При температуре ниже -2 °C в клетке присутствует несколько центров кристаллизации.

Синтез белков кристаллизации детерминирован генами *ina*, которые клонированы у бактерий *P. syringae*. Фрагмент ДНК размером 4 кб включает ген *inaZ*, продукт которого состоит из повторяющихся фрагментов, на 70 % состоящих из белка. Синтез белка является индуцибельным.

Тема 8. ИММУНИТЕТ РАСТЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЕГО ФАКТОРЫ

8.1. Горизонтальная и вертикальная устойчивость

Иммунитет растений — это проявление невосприимчивости к болезням в случае непосредственного контакта с возбудителями. Наряду с иммунитетом (полной невосприимчивостью) различают устойчивость, выносливость и восприимчивость.

Устойчивость (резистентность) — способность растения-хозяина подавлять, задерживать активность патогена или поражаться в незначительной степени. Устойчивость может быть вертикальной, т. е. направленной на определенные расы возбудителя, и горизонтальной, т. е. распространяющейся на все расы патогена. *Выносливость (толерантность)* — способность больных растений не снижать свою продуктивность и(или) выживать после атаки патогена. *Восприимчивость (чувствительность)* — неспособ-

ность растений противостоять заражению и распространению патогена в тканях, т. е. его заражение при контакте с патогеном в достаточной инфекционной дозе при соответствующих условиях окружающей среды.

Устойчивость растений и факторы защиты от патогенов, а также факторы вирулентности патогенов могут быть специфическими или неспецифическими, или, согласно терминологии Ван дер Планка, вертикальными или горизонтальными. В таких случаях говорят о формировании определенной *патосистемы*, под которой понимают взаимоотношения, складывающиеся между взаимодействующими организмами хозяина и патогена на уровне образования специфических метаболитов.

Вертикальная устойчивость заключается в том, что в ответ на специфические метаболиты патогенов только у растений с определенными генотипами возникает специфическая ответная химическая реакция. При *горизонтальной устойчивости* в ответ на специфические метаболиты патогена в растении активизируются конститутивные факторы устойчивости, присутствовавшие до заражения. Основные различия между вертикальной и горизонтальной устойчивостью (табл. 4) сводятся к типу реакции на заражение штаммами патогенов.

По мнению Ван дер Планка, в природе циркулируют два типа рас патогенов. Одни из них поражают только определенные сорта растений, но совсем не поражают другие. Эти расы отвечают требованиям теории «ген-на-ген». Расы другого типа не дают дифференцированной реакции с растениями различных сортов и способны заражать их, проявляя при этом разную степень поражения ($A \geq B \geq C$ и т. д.). Разница в степени поражения между расами носит количественный характер, а сами они различаются не по вирулентности, а по агрессивности. При качественной оценке поражения можно говорить, что этот процесс свойствен высокоспециализированным патогенам; при количественной — менее специализированным, т. е. полифагам.

Качественный и количественный характер проявления вертикальной и горизонтальной устойчивости сказывается и на характере симптомов заболеваний у растений. Вертикальная устойчивость чаще всего проявляется в форме реакции сверхчувствительности, т. е. активной реакции зараженных клеток, приводящей к их собственной гибели и гибели или прекращению развития патогена.

Таблица 4

Различия между вертикальной и горизонтальной устойчивостью

Признак	Устойчивость	
	вертикальная	горизонтальная
Генетический контроль	олигогенный	полигенный
Фенотипическое выражение	качественное (альтернативное)	количественное (неальтернативное)
Модификация внешними условиями	слабая	сильная
Взаимоотношения с паразитами	специфические	неспецифические
Механизмы устойчивости	активные защитные реакции	разные механизмы

Относительно влияния внешних условий следует отметить, что горизонтальная устойчивость четко проявляется в полевых условиях и может быть ослаблена или даже потеряна при искусственном заражении в благоприятных условиях. Вертикальная устойчивость проявляется в более широком диапазоне внешних условий (температура, влажность и др.), при использовании большей инфекционной дозы, на протяжении большого периода жизненного цикла по сравнению с горизонтальной.

8.2. Теория «ген-на-ген»

Для бактерий выделяют несколько возможных механизмов и условий, необходимых для атаки растений с последующим развитием заболевания:

- пассивное попадание в ткани через поранения;
- выделение ферментов деполимераз и химическое разрушение тканей растений;
- выделение вивотоксинов и патотоксинов;
- выделение фитогормонов;
- распространение патогена по растению;
- формирование потомства и его освобождение.

У грибов-фитопатогенов дополнительно отмечают наличие:

- способности к прорастанию на поверхности растений;
- способности к формированию инфекционных структур;
- возможности механического пробивания покровов тканей;
- способности к формированию гаусториев.

Таблица 5

Генотип растения-хозяина	Генотип паразита	
	АА или (Аа) (устойчивость или 0)	аа (+ или чувстви- тельность)
rr	+ (или чувствительность)	+ (или чувствитель- ность)

Наиболее распространенной для описания взаимоотношений хозяин — патоген является теория Х. Флора, которая предполагает взаимодействие по типу «ген-на-ген». Теория была разработана на патосистеме лен — возбудитель ржавчины льна (*Melampsora lini*). В соответствии с ней у сортов растений с одним определенным геном устойчивости к патогену обнаруживается устойчивость к одной определенной расе патогена, содержащей ген авирулентности. Если существуют два гена устойчивости, то у авирулентных патогенов должно быть два гена, определяющих их авирулентность. Для возбудителей бактериальных болезней природа взаимодействий «ген-на-ген» доказана для некоторых видов, например хлопчатник и возбудитель гоммоза хлопчатника (*Xanthomonas malvacearum*). Такой тип взаимоотношений можно представить в виде табл. 5.

Следовательно, только при наличии у партнеров двух доминантных генов, взаимодействующих через продукты, наступает устойчивость или несовместимость. Во всех других случаях будет наблюдаться совместимость или чувствительность, а соответствующие комбинации генов обозначаются как *дефинитивные* или *недефинитивные*. Практически это означает, что в случае комбинации доминантных генов обоих генов каждый из них образует функционально значимый продукт. Если у одного из партнеров изменяется дефинитивный ген, то на другой тип изменяется и реакция их взаимоотношений. Данное положение становится понятным, если учесть, что у растения-хозяина имеются структуры или метаболиты, способные узнавать определенные структуры или метаболиты патогена как чужие и запускать защитные реакции. Если же такие структуры у хозяина отсутствуют или же они изменены, а у патогена изменяются метаболиты и он перестает узнаваться как чужой, то защитные реакции включаются слишком поздно или вообще отсутствуют.

Развитие теории «ген-на-ген» нашло свое отражение и при характеристике взаимодействия хозяин — патоген, в котором выде-

ляют две фазы: *детерминантную* и *экспрессивную*. Специфичность взаимодействия реализуется на начальных этапах контакта, на которых определяется будет отторгнут или проникнет патоген. Экспрессивная фаза включает в себя события, продиктованные детерминантной фазой, и приводит либо к целой серии защитных реакций в тканях хозяина, либо к развитию взаимоотношений, заболеванию и(или) гибели хозяина.

На стадии *узнавания* происходит взаимное узнавание хозяина и патогена на клеточном уровне. На примере патосистем между растениями картофеля, табака и бактериями *Ralstonia solanocera* показано, что в процесс этот вовлечены: LPS-компонент наружной мембраны бактерий; внеклеточный экзополисахарид, покрывающий бактериальную клетку, и лектин клеточной стенки хозяина, который специфически связывается с LPS и экзополисахаридом. Авторы данного исследования вводят понятия гетерологичные (несовместимые) бактерии, которые индуцируют реакцию сверхчувствительности, и гомологичные (совместимые), т. е. вызывающие патологический процесс. Показано, что гетерологичные клетки плотно прикрепляются к клеточной стенке хозяина, а через 2—3 ч после инфильтрации они покрываются тонкой пелликулой, возможно, кутикулярного происхождения, которая отделяет их от поверхности клеток растения-хозяина. Примерно через 7 ч все бактерии и их группы оказываются прикрепленными и покрытыми оболочкой, можно сказать, что они застревают в межклетниках хозяина. Материал, который окружает бактериальные клетки, вероятно, выделяется хозяином. При этом в местах прикрепления плазмалемма впячивается, на ее внутренней стороне собираются многочисленные везикулы, которые и выделяют обволакивающий материал.

Реакции обволакивания и прикрепления являются достаточно общими для многих гетерологичных, сапрофитных и авирулентных бактерий и показаны у *Xanthomonas phaseoli* и фасоли; *Erwinia carotovora* и кукурузы; *Pseudomonas syringae* и фасоли. В случае проникновения гомологичных бактерий прикрепления или обволакивания не происходит, клетки свободно размножаются в межклеточной жидкости и вызывают частичное разрушение растительной клеточной стенки.

Прикрепление бактерий к растительным клеточным стенкам определяется структурой ЛПС. Различия в составе ЛПС коррелируют со способностью хозяина реагировать на патоген. Роль ЛПС доказана и для бактерий *Erwinia chrysanthemi*. Мутанты по О-ан-

тигену были вирулентны в той же степени, что и бактерии дикого типа, а мутанты, утратившие или изменившие коровую часть ЛПС, — авирулентны.

Для объяснения специфичности распознавания существуют несколько моделей, имеющих не только различия — разную степень экспериментальной обоснованности и подтверждения, но и сходства, что формулируется в следующих положениях:

- молекулы, участвующие в распознавании, должны либо присутствовать на поверхности контакта-хозяина и патогена на самых ранних этапах взаимодействия, либо находиться в цитоплазме или ядре;

- образуемые вещества являются либо конститутивными веществами, либо выделяются из состава клеток в период детерминантной фазы;

- молекулы, участвующие в распознавании, должны быть достаточно вариабельными, чтобы объяснить наличие большого числа генов устойчивости и соответствующих продуктов у растений и генов авирулентности у микроорганизмов.

В настоящее время рассматривают две модели распознавания: элиситорно-рецепторную и специфического супрессора.

Элиситорно-рецепторная модель предложена в 1976 г. П. Альбершеймом и Г. Андерсон-Проути с учетом теории «ген-на-ген». В соответствии с ней на поверхности гиф несовместимой расы патогена имеются некие молекулы-антигены, которые распознаются молекулами-рецепторами, имеющимися в составе плазмалеммы устойчивых растений-хозяев. В результате такого взаимодействия реализуется реакция сверхчувствительности и наблюдается отторжение патогена. Белки-рецепторы образуются в растении под контролем генов устойчивости, а гены авирулентности паразита отвечают за синтез ферментов, активность которых приводит к образованию *молекул-элиситоров*.

Авторы указанной модели считают, что наиболее вероятными продуктами авг-генов являются гликозилтрансферазы, с помощью которых образуются углеводсодержащие полимеры клеточных стенок патогена. Во многих исследованиях показано, что именно компоненты клеточных стенок являются элиситорами (индукторами), которые распознаются белками-рецепторами мембраны растений. Таким образом, элиситоры вызывают защитные реакции только у устойчивых сортов. У вирулентного паразита происходит модификация элиситора, он перестает быть комплементарным рецепторным участком растений и не распознается им.

8.3. Элиситоры и супрессоры

Впервые элиситоры выделены Н. Кином, который и предложил данный термин. Для исследования была использована система сельдерей — *Phytophthora megasperma*. После выращивания несовместимой расы патогенов удается выделить вещество гликопротеиновой природы, защищающее клетки растения от заражения совместимой расой. Впоследствии было показано, что такой элиситор вызывает образование фитоалексинов в зоне заражения. Для приведенной системы элиситор состоял на 81,5 % из белка, а на 18,5 % из углеводов. Однако соотношение белков и углеводов, как и соотношение маннозы и глюкозамина, а также характер гликозидных связей колебались у различных рас патогенов.

В настоящее время выделяют несколько групп элиситоров: биогенного (биотического) и абиогенного происхождения (рис. 2). *Биогенные элиситоры* выделяются из патогенов или питательных сред после их культивирования, *эндогенные* — непосредственно из растений, *абиогенные элиситоры* не имеют отношения к патогенезу.

К абиогенным относят элиситоры, не участвующие в процессах патогенеза, но способные вызывать защитную реакцию (т. е. образование фитоалексинов) в относительно невысоких концентрациях. К их числу относят фунгициды, ионы тяжелых металлов, фенольные соединения и хиноны, УФ-лучи и др. Одно из возможных объяснений данного действия заключается в активации ряда гидролитических (гидролазы, нуклеазы и др.) ферментов, связанных с индукцией защитных ответных реакций растительной ткани.

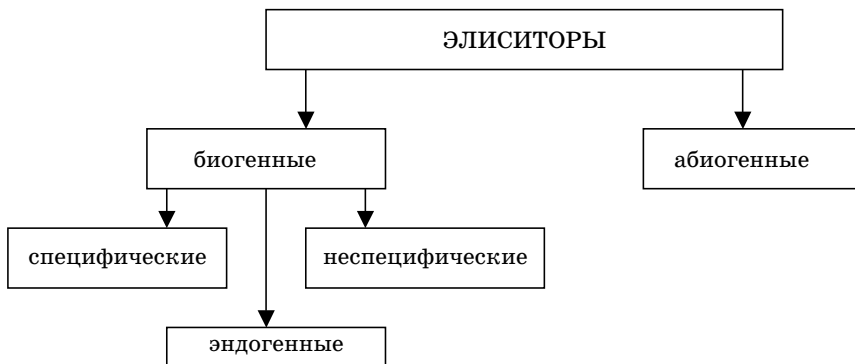


Рис. 2. Классификация элиситоров

К неспецифическим биогенным элиситорам относят вещества, которые способны индуцировать защитные реакции независимо от устойчивости растения или вирулентности штамма патогена. Ими могут быть вещества нескольких классов.

Полисахариды клеточных стенок грибов, наиболее эффективные в отношении элиситорной активности, относятся к β -1,3-глюканам, хитинам (β -1,4-связанным полимерам ацетилглюкозамина), а также деацетилированному производному хитина — хитозану. В 1976 г. из клеточных стенок и культуральной жидкости *Phytophthora* выделен гептаглюкозид, молекула которого состоит из пяти линейно связанных остатков глюкозы, к которым присоединены еще два боковых. Данный элиситор является неспецифическим и индуцирует образование не только глицеоллина, но и фазеоллина, ришитина, капсидиола, также оксипролин-богатых белков и этилена. Другие вещества этой же группы были выделены у возбудителей антракноза фасоли, фитофтороза картофеля и др.

В клетках высших растений широко представлены ферменты, способные расщеплять хитин и хитозан. К их числу относятся липаза, протеаза, целлюлаза, гемицеллюлаза, синтез которых часто является индуцибельным. Продукты гидролиза хитина и хитозана способны связываться с ДНК, ингибируя процессы биосинтеза РНК, что обеспечивает их антигрибную активность. Кроме того, они обладают фитоалексин-индуцирующей активностью.

Оценивая механизмы действия данных соединений, следует указать, что для специфического связывания гептаглюкозида в плазматической мембране клеток сои существуют сайты, которые инактивируются протеазами, что свидетельствует об их белковой или гликопротеиновой природе. Молекулярные механизмы действия ацетилированных или деацетилированных производных хитиновых соединений, вероятно, различаются. Для хитина это может быть связывание с мембранными рецепторами лектиновой природы, для фрагментов хитозана — взаимодействие положительно заряженной молекулы элиситора с отрицательно заряженными компонентами мембран или молекулами ДНК.

Примером неспецифических элиситоров *пептидной природы* являются *элиситины*. Это семейство гидрофильных белков, которые выделяются всеми исследованными видами *Phytophthora* и *Phytum*. Данные соединения вызывают образование фитоалексинов, некроз растительных тканей, системную приобретенную устойчивость. К этому же классу элиситоров относят и вещества гликопротеиновой природы.

Особую группу элиситоров составляют соединения, содержащие *липидный компонент*. Наиболее исследованы липидсодержащие элиситоры *Phytophthora infestans*. За индуцирующую активность липогликопротеидного комплекса отвечает липидный компонент, составляющий до 60 %, и представленный арахидоновой и эйкозапентаеновой кислотами. Индуцируемая ими устойчивость носит системную, продолжительную устойчивость к болезням. Важными характеристиками индуцирующей активности являются длина углеродной цепи жирной кислоты (20 атомов), положение и число двойных связей (5, 8, 11), класс липидов, в которых обнаружены эти кислоты. Механизм действия таких элиситоров заключается в накоплении арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот в мембранах растений и замещении собственных растений линолевой и линоленовой кислот. Не исключено, что продукты окисления арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот могут распознаваться растениями как сигнал о внедрении патогена, у которых данные кислоты присутствуют в мембранах.

Поиск и установление новых элиситоров необходимы для применения на практике метода индуцирования устойчивости растений с помощью элиситоров. Этот метод в известной мере является альтернативным использованию ряда пестицидов. Анализ возможностей использования элиситоров для индукции устойчивости растений позволяет сделать выводы о его достоинствах и недостатках (табл. 6).

Эндогенными, растительными, или вторичными, элиситорами (см. рис. 2) являются олигосахариды клеточных стенок растений, выполняющие как регуляторную функцию (рост и дифференцировку растений), так и контролирующие защитные функции растений. Такие соединения называются *олигосахаридами*. Соединения подобного рода (β -1,3-глюкан, хитин, хитозан) грибного происхождения относятся к экзогенным для растения элиситорам, олигосахариды же клеточных стенок растений являются эндогенными.

Олигосахариды богаты сахарными остатками, но могут содержать также и фенольные, пептидные или ацильные группы. Они обладают уникальной структурой: многочисленными гидроксильными группами, кислородными атомами и гидрофильными участками, что создает идеальные возможности для точного взаимодействия с сайтами на молекулах белков (лектин-лигандные взаимодействия). Наличие или отсутствие одного из мономеров, изменение положения боковых дисахаридов могут принципиально менять регуляторные свойства молекулы.

Таблица 6

**Оценка возможностей использования элиситоров
для борьбы с заболеваниями растений**

Достоинства	Недостатки
Экологическая безопасность, так как индуцируется естественная устойчивость растений	Неспецифическая индукция множества защитных эффектов не может не сопровождаться затратой энергии и пластических веществ растений
Системность и продолжительность защитного действия	Узкий концентрационный диапазон индукции устойчивости элиситоров
Участие в индуцированной устойчивости многих защитных систем, что исключает возможность адаптации патогенов	Изменение при хранении необходимых концентраций, позволяющих индуцировать болезнеустойчивость
Индукция неспецифической устойчивости к ряду грибов, бактерий, вирусов, нематод	Необходимость использования разных доз на разных стадиях вегетации
Продолжительность действия при грамотном использовании около года	Потеря эффективности при высокой инфекционной нагрузке патогенов
	Возможность загрязнения недостаточно очищенных препаратов различного рода супрессорами (токсинами, импединами)

Образование олигосахаридов происходит в результате деградации полисахаридов клеточных стенок растений под действием стрессовых агентов, поранении, поражении патогенами. Предполагается, что олигосахариды, связываясь со специфическими рецепторными сайтами, обеспечивают выживаемость растений, индуцируют в них образование фитоалексинов, пролин-богатых белков и ингибиторов протеиназ и лигнина, а также другие ответы. Кроме того олигосахариды индуцируют растяжение клеток растений, стимулированное ростовыми гормонами, контролируют процессы ризо- и морфогенеза, вызывают изменения в проницаемости мембран. Образование олигосахаридов связывают и с активностью некоторых гидролитических ферментов патогенов, например эндополигалактуроназы *Erwinia carotovora*, индуцирующей образование глициоллина в сое.

Олигогалактурониды (пектиновые олигомеры), выделенные из клеточных стенок двудольных и однодольных растений, имеют сходную структуру, хотя и различаются по содержанию пектиновых веществ (35 и 9 % соответственно). Оптимальная степень

полимеризации галактуроновых остатков, вызывающая индукцию образования фитоалексинов и активацию ферментов их биогенеза, составляет от 9 до 15 остатков галактуроновой кислоты. Полагают, что именно такая степень полимеризации определяет пространственное положение заряженных группировок, необходимое для элиситорной активности и стабильности конформации. Помимо индукции образования фитоалексинов, в присутствии олигосахаринов наблюдается окислительный взрыв, индукция пероксидазы и образование лигнина. Относительно механизма действия пектиновых олигосахаринов предполагают, что они специфически изменяют физиологические свойства мембраны.

Следует также отметить, что активные пектиновые фрагменты получают при действии не только полигалактуроназ, но и пектатлиаз. Можно предположить, что в результате действия различных деполимераз образуются разные по степени деградации продукты, запускающие разные типы защитных ответов. Известно также, что олигогалактурониды со степенью полимеризации более 9 способны образовывать межмолекулярные комплексы, в которых Ca^{2+} -ионы выступают в качестве связующего мостика. Способность олигогалактуронидов вызывать быстрые и краткосрочные изменения в потоках калия и кальция, деполаризацию мембраны, и защелачивание среды свидетельствуют об их действии на мембранном уровне.

Гемицеллюлозные олигомеры представлены ксилоглюканами, полимерами, в которых молекулы глюкозы в определенных положениях связаны с остатками ксилозы, в свою очередь соединенными с галактозой или фукозой. Ксилоглюкановые цепи связывают водородными связями смежные микрофибриллы целлюлозы, ограничивая межклеточное растяжение. При действии гемицеллюлаз получаемые при ферментативном расщеплении фрагменты содержат целлотетраозную основу. Наиболее исследованы эффекты воздействия фрагментов ксилоглюканов, содержащих нано- и пентасахариды, для них характерно ингибирование процессов роста и морфогенеза.

Сведения, касающиеся иммуностимулирующей активности олигомеров ксилоглюканов, определяются в зависимости от степени ферментолитического расщепления гемицеллюлоз: на ранних стадиях процесса, когда образуются крупные фрагменты индуцируется защитный эффект. По мере углубления гидролиза образующиеся фрагменты с размерами меньше 12 молекул не обладают элиситорной активностью, а, напротив, характеризуются усилением проявления симптомов заболевания.

Следует остановиться также и на регуляции образования олигосахаридов в растениях. В данном случае отмечается значение растительных белков, специфически ингибирующих активность деполимераз клеточных стенок. Предложена модель, в соответствии с которой деполимеразы клеточных стенок растений, могут регулировать устойчивость к болезням, способствуя образованию элиситорно-активных молекул. Из экстрактов клеточных стенок фасоли был выделен ингибитор полигалактуроназ (polygalacturonase inhibiting protein — PGIP), имеющий сродство и к полигалактуроназам некоторых видов грибов. Такие ингибиторы были более активны в отношении полигалактуроназ тех видов патогенов, которые не поражают данное растение.

PGIP обнаружен в клеточных стенках, тканях и органах двудольных и однодольных растений и представляет собой лейцин-богатый гликопротеин. Он термостабилен и устойчив к действию протеаз. Действие PGIP следующее: в его присутствии количество элиситорно-активных олигомеров стабильно возрастает в течение определенного времени (24 ч), и только через 48 ч его активность снижается и соответствующие ферменты гидролизуют субстрат до меньших, элиситорно-неактивных фрагментов.

Специфические элиситоры представлены в основном молекулами двух типов: белками и конъюгатами углеводов. Белки имеют структуры, обеспечивающие их прохождение через мембраны и отщепляемые протеазами грибов в процессе созревания элиситора. У бактерий это продукты двух групп генов: *avg* и *hpr*, которые, находясь вне протопласта, участвуют во взаимоотношениях с окружающей средой. У вирусов в данной роли выступают ферментные или структурные белки. Конъюгаты углеводов представляют собой компоненты клеточных стенок или сигнальные молекулы, участвующие в регуляции жизненного цикла или необходимые для взаимодействия с окружающей средой. Их транспорт из клетки обеспечивают специальные белки — харпины.

В соответствии с моделью *специфического супрессора*, разработанной К. Оуши и Ю. Оку в 1981 г. (см. п. 8.2), предполагается, что наиболее общим механизмом патогенеза является образование патогенами токсических или нетоксических факторов, индуцирующих так называемое состояние доступности. В таком состоянии патогены (вирусы, бактерии, грибы) способны установить псевдосимбиотическую ассоциацию с растительной клеткой. Патоген образует факторы, которые активно или пассивно подавляют защитные реакции клеток или тканей растения и позволяют продуцирующему их организму инфицировать хозяина. Такие со-

единения называли *специфическими супрессорами*, они могут быть как токсическими (повреждающими клетки хозяина), так и нетоксическими. Нетоксические супрессоры, не повреждая клетку, препятствуют распознаванию хозяином патогена.

Предпосылкой для разработки этой гипотезы узнавания послужили наблюдения, что растения, инфицированные вирулентным патогеном, становятся восприимчивыми к авирулентным формам или даже некоторым непатогенам. Подсчет количества вирулентных и невирулентных клеток при совместном заражении показал, что при заражении *Xantomonas oryzae* рисовых листьев авирулентный мутант мог размножаться в ткани только в присутствии вирулентного. Данный факт позволил сделать вывод о том, что совместимые (вирулентные) патогены образуют молекулы, подавляющие или нарушающие присущую клеткам растения-хозяина способность распознавать и отторгать последовательно внедряющийся несовместимый патоген.

По способам подавления защитных механизмов растений патогены могут быть разделены на три группы.

1. Пассивно преодолевающие защитные реакции путем нарушения процесса распознавания за счет таких продуктов, как капсулы или слизь. К этой группе относятся *импедины*, например ЛПС *R. solanacearum*, взаимодействующий с лектином картофеля. По предложению авторов гипотезы, *импединами* называют вещества (по аналогии с заимствованным из медицины термином), обозначающие нетоксические продукты бактериальных клеток, способные подавлять противомикробный иммунитет. Супрессорные свойства описаны и для многих веществ, продуцируемых грибами. Так, например, в системе гриб *Mycosphaerella* — горох был выделен олигопептид (фактор 5) из трех аминокислот (аспарагиновой, серина и глицина), который подавлял образование пизатина, не вызывая видимых повреждений на листьях.

2. Активно подавляющие механизмы устойчивости за счет образования токсинов или ферментов.

3. Активно подавляющие образование продуктов генов устойчивости в результате образования соединений, которые не вызывают заметных повреждений клетки-хозяина.

На примере одной из наиболее изученных патосистем фитопатогена — картофеля был охарактеризован первый специфический супрессор — низкомолекулярный водорастворимый глюкан с β -1,3— β -1,4-типом связей, в молекуле которого от 12 до 23 остатков глюкозы. Подобные глюканы, выделенные из нескольких совместимых рас патогена, специфически подавляли иммунный от-

вет. Обнаруженные в различных лабораториях у различных рас патогенов глюканы обладали рядом общих свойств. Во-первых, они обнаруживаются в мицелии патогена и его выделениях; во-вторых, представляют собой водорастворимые соединения одной формы; в-третьих, способны подавлять как реакцию сверхчувствительности (СВЧ), так и накопление фитоалексинов; в-четвертых, отражают расовую специфичность возбудителя по отношению к различным сортам растений. Наряду с подавлением сортовой устойчивости глюканы способны подавлять и видовой иммунитет картофеля, т. е. после обработки ими растения становились чувствительными к некоторым непатогенам.

Другим проявлением действия супрессоров является подавление процесса раневого заживания, вероятно, за счет подавления меристематической активности паренхимных клеток, в результате чего не закладывается феллоген и не образуется раневая перидерма. Было также показано, что действие глюканов не является необратимым, а осуществляется только временная задержка зачатных реакций.

Продукты генов устойчивости растений-хозяев способны выполнять две функции: служить рецепторами, узнающими элиситоры патогенов, и медиаторами, передающими сигнал в геном. Продукты R-генов имеют в составе несколько структурных областей.

- С-концевой участок, содержащий большое число повторяющихся последовательностей из 23—24 аминокислот с высоким содержанием лейцина (Leucine Rich Repeats, LRR). Этот участок осуществляет белковые взаимодействия за счет рецепции белкового элиситора-лиганда патогена. У некоторых белков LRR-область может содержать углеводный компонент, который также участвует в связывании.

- Область, обеспечивающая связывание с ДНК (Nucleotide Binding Sites, NB), состоит: из киназной области 1а, обеспечивающей связывание фосфатов; киназы 2, связывающей ион металла, необходимого для реакции переноса фосфата; киназы 3а, которая за счет аргинина обеспечивает связывание с пуриновой областью АТФ. Эта сигнальная область может активировать киназы или сигнальные G-белки после связывания с АТФ.

- Область лейциновой застежки (Leucine Zipper Region, LZ) способствует формированию спирализованных структур, обеспечивающих димеризацию или специфическое взаимодействие с другими белками. R-белки, находящиеся в интактной клетке в виде мономеров, способны формировать гомодимеры или олиго-

меры (или, наоборот, претерпевать диссоциацию) при взаимодействии с элиситором в реакции заражения.

- Область гомологии с рецептором интерлейкина-1 (TIR), функции этой области пока не ясны.

- Треонин/сериновая протеинкиназа (РК), обладающая сигнальными свойствами.

В зависимости от комбинации этих областей и их присутствия все R-белки разделены на 5 групп (табл. 7). Следует отметить, что R-белки, например, первой группы, имеют внеклеточный LRR-гликопротеин, закрепленный в мембране. Эти белки могут быть рецепторами, связывающими элиситор, но они не способны выполнять функции передачи сигнала.

Рецепторы имеют общий план строения, что предполагает наличие трех участков: расположенного вне клетки, погруженного в цитоплазму и внутримембранного фрагмента, который, в отличие от первых двух, имеет константную структуру. Внешний, N-концевой фрагмент специфичен к элиситору, внутренний С-фрагмент — к ассоциированному с рецептором ферменту. Именно последнее взаимодействие определяет, с какой сигнальной системой будет осуществляться взаимодействие.

На пути распространения сигналов функционирует множество протеин- и фосфопротеинкиназ, которые регулируют активность белков путем изменения степени их фосфорилирования. В качестве доноров фосфатов используется АТФ, а фосфорилированию подвергаются свободные ОН-группы серина, треонина или тирозина. Процессы фосфорилирования-дефосфорилирования обратимы, что возвращает активность белка к первоначальному уровню.

Таблица 7

Группировка R-белков растений, основанная на их строении

Область белка	Группа				
	1	2	3	4	5
LRR	+		+	+	+
NB				+	+
LZ				+	
TIR					+
PK		+	+		

Примечание. Знак «+» указывает на наличие данной области в R-белках.

В циклоаденилатной, митоген-киназной (МАТ), Ca^{2+} -фосфоинозитольной, липооксигеназной и фосфатидилкислотной сигнальной системах роль промежуточного звена между цитоплазматической частью рецептора и первым активируемым ферментом выполняет комплекс G-белков.

Тема 9. МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

9.1. Фитоалексины

Первые сведения о фитоалексинах как о соединениях, обеспечивающих один из механизмов защиты растений, появились в 1940 г., когда немецким исследователям К. Мюллеру и Н. Боргеру удалось показать, что в ответ на микробную инфекцию в тканях растений образуются некоторые химические вещества. Эти вещества были названы *фитоалексинами* и рассматривались как антибиотики растительного происхождения, которые синтезируются в растениях *de novo* в ответ на микробную инфекцию и участвуют в механизмах болезнеустойчивости растений. Впоследствии было дано более широкое толкование фитоалексинов не только как низкомолекулярных антимикробных веществ, но и как веществ, синтезируемых *de novo* и освобождающихся из конъюгатов, а также образующихся в результате деградации ферментами растений и микроорганизмов в ответ на различные инфекционные и механические поражения, стрессы, воздействие температуры, УФ-облучения. Причем отмечается, что в ответ на воздействие биотических и абиотических факторов образуются разные типы фитоалексинов.

Успешное обнаружение и выделение фитоалексинов связано с наличием достаточно простых и оригинальных методов их выделения. Например, если на поверхность среза картофеля нанести суспензию спор несовместимой расы возбудителя фитофтороза в виде креста, а через 24 ч эту же поверхность инфицировать совместимой расой патогена, то на всей поверхности, за исключением участков ткани, инфицированных несовместимой расой, где фиксировалось развитие реакции сверхчувствительности, наблюдается рост мицелия гриба. Это выглядит как черный крест некротизированной ткани на фоне белого мицелия гриба.

Классическим является также и выделение фитоалексинов методом капельных диффузатов. Из бобов фасоли выделяли семена, а в семенные камеры помещали капли воды, содержащие спо-

ры патогенов. Через определенный период времени в инфекционные капли при прорастании спор выделялись фунгитоксические вещества. Капли собирали, удаляли споры и определяли наличие фитоалексинов. Данный метод обладает явными преимуществами: используется неповрежденная растительная ткань, отсутствует кутикула, препятствующая свободному обмену метаболитами между двумя партнерами.

В 1960—1962 гг. выделен и очищен первый фитоалексин из гороха, названный пизатином, определена его структура. Позднее были идентифицированы фазеоллин из фасоли, капсидиол из перца и др. Известно, что растения родственных видов образуют фитоалексины сходной химической структуры. Также обнаружено, что в клетках одного растения могут образовываться фитоалексины нескольких различных типов. К настоящему времени выделены фитоалексины у более чем 350 представителей 30 семейств двудольных и однодольных растений. Только у бобовых растений известно около 130 фитоалексинов, а клетки картофеля образуют до 10 различных фитоалексинов. Для отнесения к фитоалексинам соединение должно обладать следующими свойствами:

- антимикробным (фунгитоксичным) действием;
- способностью к образованию в тканях, в которых в норме оно отсутствует;
- способностью синтезироваться *de novo* из универсальных блоков по одному из трех основных путей: шикиматному, ацетатно-мевалонатному или ацетатно-малонатному;
- иметь небольшую молекулярную массу.

Фитоалексины являются липофильными соединениями, основная масса которых локализуется вокруг места поражения. Существует прямая связь между образованием фитоалексинов и развитием реакции сверхчувствительности. Мертвые клетки, которые образуются в результате несовместимых отношений хозяин — патоген, являются резервуаром для накопления фитоалексинов. В таких клетках они накапливаются в очень высоких концентрациях.

Синтез фитоалексинов, как уже указывалось, проходит по трем основным путям, но следует отметить, что в некоторых случаях синтез предшественников для образования глицеоллина и пизатина происходит с участием нескольких биохимических путей. Отмечена и возможность посттрансляционного контроля их образования, т. е. накопления при гидролизе уже имеющихся в клетке конъюгатов. В сое в больших количествах присутствует даидцеин, являющийся близким предшественником глицеоллина. При несовмести-

мых взаимоотношениях он быстро гидролизруется, в результате накапливается глицеоллин и развитие гриба прекращается. Наконец, следует указать на то, что экспрессия генов синтеза фитоалексинов и накопление веществ-предшественников может приводить к увеличению синтеза и других, связанных с иммунитетом соединений. Это относится, например, к образованию фенилаланинаммоний лиазы — фермента, участвующего в формировании слоя лигнина.

Действие фитоалексинов на клетки патогенов изучается в различных тестах и с использованием различных методических приемов. Самым простым является добавление выделенных фитоалексинов к жидким или агаризованным питательным средам с последующим выращиванием клеток; пропитывание бумажных дисков и наложение их на газон культуры; опрыскивание хроматограмм, полученных после выделения антимикробных веществ из зон поражения, культурами бактерий и оценка степени их роста. Имеющиеся данные об антибактериальной активности фитоалексинов представляются противоречивыми. Например, для *Erwinia carotovora* в присутствии фитоалексина картофеля ришитина (360 мкг/мл) количество клеток снижалось до нуля за 4 ч. Другой фитоалексин, фитуберин, даже в более высокой концентрации не оказывает ингибирующего действия на клетки бактерий.

Для грибов показателем токсичности фитоалексинов служит величина ЭД₅₀ — концентрация, которая на 50 % тормозит рост колонии. На основании того, что значения ЭД₅₀ находятся в пределах 10^{-3} — 10^{-5} М, сделан вывод об их низкой антигрибной активности. В данном случае исход взаимоотношений хозяин — патоген определяется двумя факторами: количеством образовавшегося вещества и степенью чувствительности к нему патогена.

Относительно механизмов действия фитоалексинов известно немного в силу того, что это вещества с весьма разнообразной структурой. Один из возможных механизмов их повреждающего действия — нарушение целостности мембраны, хотя все больше исследователей предполагают полифункциональный характер активности фитоалексинов.

У некоторых изученных фитоалексинов показано наличие и фитотоксической активности. Например, ришитин ингибирует прорастание пыльцы картофеля, вызывает гибель клеток клубней, а также лизис протопластов картофеля и томатов. Ряд фитоалексинов являются токсичными и для животных. В этом случае можно предположить, что токсический эффект воздействия фитоалексинов на организм животных обусловлен их высоким содержанием в болезнестойчивых растениях.

9.2. PR-белки

PR-белки (Pathogenesis-related Proteins) впервые обнаружены в листьях определенного сорта табака в случае, когда после заражения вирусом мозаичной болезни наблюдалось развитие реакции сверхчувствительности. Сам по себе термин «белки, связанные с патогенезом», относится к группе белков, которые индуцируются в растении в ответ на грибные, бактериальные, вирусные и виroidные поражения, а также при воздействии некоторых химикатов.

При анализе таких белков более чем из 20 различных растений было определено, что это низкомолекулярные соединения, обнаруживаемые в экстрацеллюлярной жидкости, имеющие низкую изоэлектрическую точку, растворимые при низких значениях pH, часто устойчивые к действию протеолитических ферментов. Однако для табака показано наличие второго набора PR-белков, которые локализуются в вакуолях, а также наличие основных белков, индуцируемых в листьях при определенных условиях воздействия.

В настоящее время наиболее полно изучены PR-белки из растений табака. Их разделяют на 5 классов, обозначаемых PR-1, PR-2 и так далее, в зависимости от подвижности, молекулярной массы и серологического родства.

Белки типа PR-1 могут быть как кислыми, так и основными. Кислые формы белков накапливаются не только в растениях табака, но и в инфицированных растениях картофеля, кукурузы, томатов и др. Основные формы белков PR-1 на 65 % схожи с кислыми, также имеют гидрофобный N-терминальный домен из 30 аминокислот, который функционирует как сигнальный полипептид для прохождения через мембраны. Тот факт, что в ответ на развитие некроза наблюдается накопление PR-белков, а также приобретает устойчивость растения к последующему заражению, позволил рассматривать их как факторы приобретенной системной устойчивости.

Белки типа PR-2 по сути являются β -1,3-глюканазами. Они способны разрушать клеточные стенки некоторых грибов и приводить к образованию фрагментов с иммунорегулирующими свойствами. Среди ферментов имеются как кислые (5), так и основные (1) формы, которые принимают участие в процессах развития реакции СВЧ.

Белки типа PR-3 относятся к внеклеточным хитиназам групп I (две основные формы) и II (две кислые). Помимо более высокой, чем у кислых форм, хитиназной активности, основные формы

имеют и лизоцимную активность, а также они способны гидролизовать бактериальный пептидогликан. В растениях хитиназы и β -глюканазы экспрессируются в ответ на различные типы повреждений, а степень экспрессии соответствующих генов коррелирует с устойчивостью. Полагают, что PR-белки первой и второй групп участвуют в индуцировании устойчивости растений.

Функции белков *PR-4 типа* наименее определены. Это кислые белки, индуцируемые в табаке после инфекции вирусом мозаичной болезни.

Белки *PR-5 типа* относятся к тауматиноподобным белкам, одним из представителей которых является ингибитор амилазы из кукурузы. Тауматиноподобные белки имеют большое сходство с осмотином — белком, накапливающимся при адаптации к осмотическому стрессу.

9.3. Протеолитические ферменты и их ингибиторы

Вещества белковой природы являются неотъемлемыми компонентами защитных механизмов растений в борьбе с вредителями и болезнями. К ним относятся β -1,3-глюканазы, хитиназы, протеазы, ингибиторы ферментов (в первую очередь протеаз и амилазы) и др. Например, поражение растений томатов индуцирует синтез более 15 типов различных белков.

Протеолитические ферменты играют важную роль в передаче сигнала, процессинге и других превращениях защитных белков, явлениях связанных с апоптозом, могут действовать непосредственно на белки и ферменты насекомых и патогенов. Большинство защитных белков синтезируются в форме неактивных предшественников, которые затем в результате реакций ограниченного протеолиза превращаются в активные белки.

Такие белки, как раневой гормон системин, ингибиторы сериновых протеиназ I из листьев томатов, α -амилазы из фасоли, хитиназы из листьев табака и другие, образуются из предшественников в результате гидролиза пептидной связи, в образовании которой участвует карбоксильная группа остатка аспарагина. Предполагается участие в процессинге вакуолярной протеиназы со специфической вышеупомянутой активностью, она же может отвечать за процессинг и некоторых запасных белков ряда растений.

Протеолитические ферменты могут принимать активное участие и в процессах дальнейшего превращения защитных белков у

растений. В плазматической мембране листьев томатов присутствует белок, который избирательно связывает раневой гормон системин, что сопровождается гидролизом одной из пептидных связей в молекуле гормона. В листьях томатов или табака, инфицированных виридами, обнаруживается внеклеточная аспартильная протеиназа, которая способна избирательно гидролизовать PR-белки.

Протеолитические ферменты играют важную роль и в реакциях сверхчувствительности. Для растительных клеток, так же как и для клеток животных, показано увеличение активности цистеиновых протеиназ при взаимодействии с биотропными патогенами. Гибель клеток сои при контакте с авирулентными штаммами *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* сопровождается индукцией синтеза цистеиновых протеиназ. Одновременная индукция синтеза ингибитора цистеиновых протеиназ — цистатина подавляла как активность этих ферментов, так и гибель клеток. Это послужило основанием для предположения, что процесс запрограммированной смерти клеток растений регулируется соотношением между содержанием протеиназ и их ингибиторов.

При некоторых заболеваниях отмечается индукция синтеза протеолитических ферментов в растениях. Например, сериновая протеиназа является преобладающим PR-белком в ответной реакции на поражение виридами. Дальнейшие исследования свойств такой сериновой протеиназы показали, что она относится к субтилизиновому семейству, имеется несколько генов, которые кодируют ее различные формы (A—D). В частности, особые формы B и C образуются в ответ на инфицирование *Pseudomonas syringae*.

Ингибиторы протеолитических ферментов играют важную роль в защите растений как от насекомых-вредителей, так и от фитопатогенных микроорганизмов. Это особая группа белков, представляющая пептиды или небольшие белки, объединяемые общей способностью образовывать с протеиназами стехиометрические комплексы, что приводит к конкурентному ингибированию каталитической активности. Ингибиторы протеиназ присутствуют в растениях различных таксономических групп, содержатся в семенах и других запасающих органах растений, составляя до 5—10 % от общего количества водорастворимых белков.

Ингибиторы протеиназ в растениях выполняют три основные функции. Они являются:

- запасными белками растений;
- регуляторами белков или ферментов самого растения;
- составной частью защитной системы.

Характеризуя роль каждой из них, следует сказать, что наиболее высокое содержание ингибиторов протеиназ обнаруживается в запасующих органах растений. При этом отмечается наличие корреляции между накоплением запасных белков и ингибиторов протеиназ, а также между прорастанием клубней и семян и снижением содержания ингибиторов протеиназ.

Не менее важной является и регулирующая функция ингибиторов протеолитических ферментов по отношению к собственным протеиназам растений, на которые чаще действуют ингибиторы цистеиновых протеиназ, а не ингибиторы трипсина и химотрипсина, влияющие на протеиназы микроорганизмов. Ингибиторы протеиназ могут предохранять растения от неконтролируемого протеолиза белков. Находясь в цитоплазме, они способны защищать белки растительных клеток в случае повреждения внутриклеточных структур и освобождения протеиназ.

Наконец, ингибиторы протеиназ могут осуществлять важную защитную роль в растениях, пораженных микроорганизмами. Так, в клетках клубней картофеля и томатов обнаруживаются два типа ингибиторов протеиназ, обозначенные как ингибитор I и ингибитор II. В первом случае фермент содержит 4—5 субъединиц и подавляет активность химотрипсина, во втором — две субъединицы, но подавляет активность как трипсина, так и химотрипсина.

Одной из важных особенностей ингибиторов протеиназ считается бифункциональный характер действия некоторых из них. Это значит, что одна молекула ингибитора может одновременно реагировать с двумя ферментами, образуя тройные комплексы, что свидетельствует о наличии в молекуле двух независимых центров связывания. Такие бифункциональные ингибиторы могут принимать участие не только в защите растений от насекомых и микроорганизмов, но и подавлять активность трипсиноподобных протеиназ и α -амилаз. В покоящемся зерне бифункциональный ингибитор локализован в эндосперме. В процессе прорастания зерна происходит транспорт ингибитора из эндосперма в проросток и при его недостатке может наблюдаться «предуборочное прорастание», связанное с преждевременной активацией α -амилазы, что наносит большой экономический урон сельскому хозяйству в районах с влажным климатом. С другой стороны, достаточное количество таких ферментов может сыграть существенную роль в защите растений от фитопатогенов.

Синтез ингибиторов протеиназ, как и других белков, связанных с патогенезом, может индуцироваться в ответ на заражение

фитопатогенами. Было показано, что после механического повреждения растений картофеля или томатов наблюдается образование ингибиторов протеиназ по всему растению. Данная ответная реакция растений объяснялась образованием в месте повреждения специфического раневого гормона РИФ (Proteinase Inhibitor — Inducing Factor). РИФ является растворимым, обогащенным остатками уроновой кислоты пектиновым полисахаридом с молекулярной массой около 5 кД. Он образуется в результате ферментативной деградации клеточной стенки и является эндогенным элиситором. Под воздействием РИФ содержание ингибиторов I и II в листьях пасленовых иногда достигает 2 % от общего количества вновь синтезированных белков.

Кроме РИФ, образование ингибиторов протеиназ можно индуцировать пектином цитрусовых, олигоуруонидами со степенью полимеризации от 2 до 20, растворимыми производными хитина и хитозана.

9.4. Оксипролин-богатые белки

Оксипролин-богатые белки связаны с клеточной стенкой растений и являются гликопротеинами. Эти белки находятся в клеточной стенке либо в растворенном состоянии, либо ковалентно связаны с ее компонентами. Оксипролин-богатые гликопротеины обогащены оснлвными аминокислотами, и их высокое содержание превращает клеточную стенку в поликатионный барьер, который связывает отрицательно заряженные частицы либо клетки типа бактериальных. Более того, оксипролин-богатые белки укрепляют клеточную стенку. Для некоторых патосистем показано, что оксипролин-богатые гликопротеины выступают как агглютинины патогенов или их метаболитов

Существует несколько групп доказательств важной роли оксипролин-богатых белков в устойчивости растений.

1. Примерно для 30 типов различных патосистем показано обогащение клеточных стенок оксипролин-богатыми белками.

2. Уровень оксипролина увеличивается в клеточных стенках быстрее при заражении устойчивых сортов, чем восприимчивых.

3. Индукция или супрессия уровня оксипролин-богатых белков приводит к индуцированию или ингибированию устойчивости.

4. Образование оксипролин-богатых белков происходит при обработке элиситорами.

Все оксипролин-богатые белки имеют ряд общих особенностей. Во-первых, это высокое содержание оксипролина, оксиаминокислого серина, треонина и либо глицина, либо аланина. Во-вторых, арабиноза и галактоза содержатся в равных количествах. В-третьих, кроме вышеперечисленных аминокислот и сахаров могут присутствовать и другие соединения.

Растения синтезируют оксипролин-богатые гликопротеины трех классов. *Экстенсин* относится к первому классу и секретируется как растворимый белок, слабо связанный с клеточными стенками. Две трети экстенсина составляют углеводы, одну треть — белки. Белковая часть представлена оксипролином, лизином, серином, тирозином и гистидином. Экстенсин из клеточных стенок может переходить в растворимую форму гликопротеина с участием некоторых гидроксилаз (оксипролина) и трансфераз (арабинозы).

Арабиногалактановые белки являются растворимыми гликопротеинами, обнаруживаемыми как внутри-, так и внеклеточно. Большую часть аминокислот в них составляют оксипролин, серин, аланин и глицин. Остатки сахаров связаны, как правило, с оксипролином.

Третий класс — это *лектины* растений семейства пасленовых, которые локализуются внутри- и внеклеточно. На 50—60 % эти гликопротеины состоят из оксипролина, серина, глицина и цистеина. Арабинозные остатки связаны с оксипролином, галактозилы — с серином.

Оксипролин-богатые гликопротеины из картофеля способны агглютинировать авирулентные, но не вирулентные штаммы *Ralstonia solanacearum*. За высокую способность к агглютинации эти соединения были названы *агглютинидами*. Показано, что они являются растворимыми соединениями клеточных стенок, углеводная часть которых состоит из арабинозы.

Полагают, что в качестве индукторов синтеза оксипролин-богатых гликопротеинов выступают как некоторые элиситоры, стимулирующие синтез этилена, так и этилен сам по себе.

Такие гликопротеины клеточных стенок, как пероксидазы и гликозилгидролазы, обладающие ферментативной активностью, могут вызывать защитные реакции растений, например биосинтез лигнина, формирование связывающих мостиков экстенсина, связывание клеточной стенки феруловой кислотой. Гликозилгидролазы также могут быть ответственными за высвобождение олигосахаридов из клеточных стенок растений или грибов.

9.5. Фенилпропаноиды и лигнин как защитные вещества растений

Фенилпропаноидные соединения — это циклические соединения, обладающие разнообразными функциями. Коричная, бензойная и салициловая кислоты или так называемые простые фенилпропаноиды образуются при дезаминировании фенилаланина с участием фенилаланин-аммиаклиазы. Далее с участием тирозин-аммиаклиазы образуются истинные фенилпропаноидные соединения: кумаровая, кофейная, феруловая и синаповая кислоты, образующие лигнин. При конденсации активированного кумарина (кумароил-СoА) с тремя молекулами малонил-СoА образуются и другие, не менее важные классы флавоноидов: флавоны, флавонолы, флавононы, антоцианы. Между фенилпропаноидами могут существовать структурные различия, связанные со степенью гидроксирования, алкилирования, пренелирования, сульфатации и метилирования.

Повышение активности фенилаланин-аммонийлиазы может приводить и к образованию других, помимо лигнина, защитных веществ: пигментов, защищающих от действия света; природных антибиотиков; веществ для заживления поврежденных участков ткани. Ацетосирингон, который является индуктором для активации *vir*-генов у *Agrobacterium tumefaciens*, образуется таким же образом.

Многие стресс-индуцируемые фенилпропаноиды классифицируются как фитоалексины (глицеоллин, киевитон и др.). Уровень этих соединений вокруг места поражения увеличивается до концентраций, токсических для патогенов. Например, у огурцов и табака количество салициловой кислоты увеличивается в ответ на инфекцию, УФ-облучение или повышение концентрации озона. Кроме того, салициловая кислота является элементом сигнальной системы, которая приводит к системной приобретенной устойчивости.

Лигнин — это комплекс гетерополимеров, состоящий из смеси ряда фенилпропаноидов кумарилового, кониферилового и синапового спиртов, соотношение которых варьирует у различных видов растений. Он образуется при вторичном утолщении клеточной стенки, в результате которого межклеточное пространство импрегнируется. Полагают, что синтез лигнина инициируется с помощью фактора LIF (Lignin Inducible Factor), который локализован в мембранах здоровых клеток и активируется компонентами,

освобождающимися при повреждении. Лигнификация начинается в клеточных слоях, расположенных под эпидермальными клетками, хотя сам эпидермис не лигнифицируется.

Лигнин образует ковалентные связи с соединениями клеточной стенки (целлюлозой, гемицеллюлозами, пектином, структурными и оксипролин-богатыми белками). Также он может образовывать связи с дикарбоновыми и оксикислотами, входящими в состав суберина. Предполагается, что лигнификация может замедлять развитие патогена за счет нескольких механизмов:

- увеличения механического сопротивления клеточной стенке растения-хозяина проникновению патогена;
- предохранения клеточной стенки растения-хозяина от разложения внеклеточными ферментами патогена;
- уменьшения диффузии токсинов и питательных веществ;
- ингибирования роста патогенов под действием токсических предшественников лигнина;
- лигнификации гиф патогена.

Суберинизация является еще одним барьером, препятствующим проникновению и развитию грибных и бактериальных патогенов. Основные компоненты суберина: жирные кислоты, их спирты (C_{20} — C_{28}) и некоторые дикарбоновые кислоты. Биосинтез суберина — это относительно медленный процесс, который обнаруживается через несколько дней после поражения. Кроме того, образование суберина препятствует потере воды. Ингибиторами образования суберина могут выступать некоторые вещества, продуцируемые патогенами или образующиеся ими деградирующие ферменты.

Каллоза (β -1,3-глюкан) образуется на внутренней стороне клеточной стенки, прилегающей к плазмалемме, в ответ на проникновение патогена. В месте внедрения патогена образуются папиллы, которые затем уплотняются, в них накапливается лигнин. *Папилла* — это отложение липидного материала и аморфного вещества (полисахаридов) с внутренней стороны клеточной стенки. В зоне папиллы может накапливаться кремний. Образование каллозы индуцируется элиситорами, а дальнейший синтез происходит параллельно с отложением каллозы на клеточной стенке.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ

Характерными признаками бактериальных повреждений растений могут служить различные типы гнилей (мокрые, мягкие, сухие), некрозы, увядания, пятнистости, ожоги и др. При поражениях, вызванных фитопатогенными микроорганизмами, создаются благоприятные условия для развития не только возбудителей, но и сопутствующей микрофлоры, поэтому задача исследователя — выявление и определение истинных возбудителей. Экспериментальная работа для ее решения может быть условно разделена на несколько этапов:

- определение заболевшего растения (бобы, томаты и др.);
- исследование симптомов заболевания макро- и микроскопически;
- изучение литературы по распространенности патогена на данной территории;
- сравнение симптомов наблюдаемого заболевания с описанными в литературе;
- подбор среды для изолирования и культивирования патогенов;
- исследование сформировавшихся колоний и их расчистка;
- постановка необходимых для идентификации и определения патогенности тестов.

Наиболее широко распространенные представители фитопатогенных бактерий относятся к родам *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xantomonas*, *Clavibacter*.

Тема 1. ОТБОР ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Для отбора образцов используют клубни, корнеплоды, стебли, семена, листья и другие органы растений с наиболее типичными признаками поражения фитопатогенами. Их измельчают и гото-

вят водные суспензии, которые засевают с помощью шпателя либо на поверхность полноценной среды, либо на специально подобранную среду для выделения патогена определенного вида. Рассев производят таким образом, чтобы на поверхности сформировались изолированные колонии, которые исследуют визуально. После этого проводят повторный рассев культуры для визуального и микроскопического подтверждения ее чистоты.

Далее приступают к проверке патогенности культуры в отношении растений-хозяев (проявление симптомов заболевания, мацерация тканей и др.). Доказав, что бактерии патогенны, определяют их морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства, необходимые для идентификации их родовой и видовой принадлежности.

В приложении приведены дифференцирующие признаки основных групп фитопатогенных бактерий (табл. 1), основные биохимические свойства и видовой состав 5 родов фитопатогенов (табл. 2—6). Следует указать, что в «Определителе бактерий Берджи» некоторые представители фитопатогенных бактерий либо вынесены в самостоятельные систематические категории, либо переименованы.

Начальный этап работы — *выделение фитопатогенных бактерий*, которое проводят, руководствуясь основными правилами, приведенными в «Определителе бактерий Берджи», с учетом ряда особенностей данной группы бактерий. Например, следует помнить, что бактерии разных систематических групп могут вызывать появление на больном растении сходных симптомов. В соответствии с их предполагаемыми особенностями и выбирают подходящую селективную среду. Среда общего назначения могут быть использованы для выделения практически всех фитопатогенных бактерий; специальные полуселективные или диагностические среды подходят для выделения только определенных групп бактерий и, как правило, являются сложными по составу и в приготовлении. Необходимо также отметить, что выделение фитопатогенов следует проводить на ранней стадии заболевания из участков с наиболее типичными симптомами поражения, а в случаях ожогов или некрозов материал отбирают на границе между пораженной и здоровой тканью. Растительный материал редко подвергают поверхностной стерилизации, но, если это необходимо, проводят обработку 0,5 % раствором гипохлорида натрия в течение 2—5 мин. После такой обработки образцы растений тщательно промывают

водой, промывание также необходимо для удаления почвы и растительных остатков.

Приготовление посевного материала проводят после высушивания. Для этого с помощью стерильного скальпеля вырезают участок поврежденной или пограничной ткани, которую помещают в каплю физиологического раствора в чашке Петри. Образец размельчают с помощью скальпеля или стеклянной палочки и оставляют на 10 мин. Суспензию высевают на подходящую среду для получения изолированных колоний.

При анализе выросших колоний учитывают тот факт, что чистые культуры фитопатогенов выделяются крайне редко: даже на полуселективных средах они могут быть получены в таком виде только из свежевыделенного материала с симптомами начальных стадий развития инфекции. Отбор колоний фитопатогенов проводят не ранее чем через 36—72 ч (до 7 сут), изолированные колонии должны быть рассеяны на неселективной среде. Необходимо помнить, что при культивировании может происходить утрата или изменение патогенных свойств, вследствие чего количество пересевов должно быть ограничено. Полученные чистые культуры исследуют на стабильность таких признаков, как скорость роста (размер) колоний, морфология колоний и их пигментация на различных средах.

Следующий этап исследования — *определение граммпринадлежности бактерий*. Большинство фитопатогенов принадлежит либо к грамотрицательным аэробным (факультативно-анаэробным) палочкам, либо к грамположительным коринеформам и актиномицетам. Анализируя результаты окраски клеток, следует помнить, что: грамотрицательные и грамположительные кокки и спорообразующие палочки не относятся к фитопатогенам; коринеформные бактерии обычно меньших размеров, чем другие грамположительные бактерии, но имеют характерную V- или L-форму. Дифференцирующим тестом должен быть и тест на определение подвижности.

Изолированные колонии проверяют на патогенность в отношении растений-хозяев, из которых они были выделены, или же на наличие факторов патогенности (в некоторых случаях можно проводить параллельные эксперименты). Доказав, что бактерии патогенны, приступают к их детальной идентификации на основании культуральных и физиолого-биохимических свойств.

Тема 2. НЕКОТОРЫЕ ТИПЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

2.1. Среда для выделения и культивирования большинства фитопатогенных бактерий

NA-среда (г/л, вода дистиллированная): мясной экстракт (Difco) — 3 г; пептон (Difco) — 5 г; агар-агар — 15 г; pH 7,2. Стерилизуют при 1,5 атм 30 мин.

Можно использовать коммерческий препарат.

NDA-среда — NA-среда с добавлением 1 % глюкозы. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин. На этой среде выделяются практически все фитопатогены, но предпочтительно бактерии родов *Agrobacterium* и *Clavibacter*.

Картофельный агар (КА): 500 г очищенных и мелко нарезанных клубней картофеля заливают 500 мл водопроводной воды и кипятят 30 мин. Отвар фильтруют через ватный фильтр и доводят его объем водопроводной водой до 1000 мл. После этого устанавливают pH среды 7,2 и добавляют агар-агар до концентрации 1,5 %. Стерилизуют при 1,5 атм 30 мин.

Среда Кинг В (г/л, вода дистиллированная): пептон ферментативный (Difco) — 20,0 г; глицерин — 15,0 мл; безводный K_2HPO_4 — 1,5 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,5 г; агар-агар — 15,0 г; pH 7,2. Стерилизуют при 1,5 атм 30 мин.

YDC-среда (г/л, вода дистиллированная): дрожжевой экстракт — 10,0 г; глюкоза — 20,0 г; агар-агар — 15,0 г; $CaCO_3$ — 20,0 г.

Первые три компонента растворить в воде, затем (не нагревая!) добавить $CaCO_3$. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин. Используется для выделения всех фитопатогенов, но предпочтительно бактерий рода *Xanthomonas*.

TGA-агар (г/л, вода дистиллированная): мясной экстракт — 3,0 г; триптон — 5,0 г; декстроза — 1,0 г; агар-агар — 15,0 г. Стерилизуют при 1,5 атм 30 мин.

TZCA-агар (г/л, вода дистиллированная): пептон — 10,0 г; гидролизат казеина — 1,0 г; глицерин — 5,0 мл; агар-агар — 15,0 г. Стерилизуют при 1,5 атм 30 мин. После автоклавирования к охлажденной среде добавляют стерилизованный фильтрованием раствор ТТХ (0,5 % водный раствор трифенилтетразолиум хлорида) из расчета 1 мл раствора ТТХ на 100 мл среды. На среде выделяются все фитопатогены, но она является основной для выделения *Pseudomonas solanacearum* — белые колонии с розовым центром.

2.2. Селективные среды

MCVP-среда для выделения и культивирования *Erwinia* spp.: кристаллический фиолетовый (0,075 % водный раствор) — 1,0 мл; NaOH (1 М раствор) — 4,5 мл; CaCl₂ (10 % раствор) — 6,0 мл; Difco агар (полноценный питательный агар) — 4,0 г; NaNO₃ — 1,0 г.

Все указанные ингредиенты при быстром перемешивании добавить к 500 мл кипящей дистиллированной воды, затем при постоянном перемешивании постепенно всыпать 9 г полипектата натрия, довести объем смеси до 2 л и прилить 0,5 мл 10 % раствора додецилсульфата натрия. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин. Среду в чашках Петри высушивают не менее 48 ч под бумажными фильтрами.

SCM-среда для выделения *Clavibacter* spp. (г/л, вода дистиллированная): сахароза — 10,0 г; дрожжевой экстракт — 0,1 г; K₂HPO₄ — 2,0 г; KH₂PO₄ — 0,5 г; MgSO₄ · 7H₂O — 0,5 г; борная кислота — 1,5 г; агар-агар — 15,0 г.

После стерилизации при 0,5 атм в течение 20 мин к среде добавить 1 мл налидиксовой кислоты (10 мг/мл в 0,1 н. NaOH), 2 мл циклогексимида (100 мг/мл в 75 % этаноле), 10 мл раствора никотиновой кислоты (10 мг/мл в воде).

MT-среда для выделения *Xanthomonas* spp., *P. syringae*.

Раствор 1: пептон ферментативный — 10,0 г; CaCl₂ · 2H₂O — 0,33 г; тирозин — 0,5 г; агар-агар — 15,0 г; вода дистиллированная — 500 мл.

Раствор 2: молоко обезжиренное — 10,0 г; вода дистиллированная — 500 мл.

Раствор 3: твин 80 — 10 мл.

Растворы 1—3 стерилизуют при 0,5 атм 20 мин, затем смешивают, охлаждают до 50 °С и добавляют к смеси 8 мл раствора цефалексина (10 мг/мл), 2 мл раствора циклогексимида (100 мг/мл в 75 % этаноле) и 1 мл раствора ванкомицина (10 мг/мл).

YMA-среда для выделения *Agrobacterium* spp. (г/л, вода дистиллированная): маннитол — 10,0 г; K₂HPO₄ — 0,5 г; MgSO₄ × × 7H₂O — 0,2 г; NaCl — 0,1 г; дрожжевой экстракт — 0,4 г; конго красный (0,25 % раствор) — 10,0 мл; агар-агар — 15,0 г; pH 7,0. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

SX-среда для выделения *Xanthomonas* spp., предпочтительно *Xanthomonas campestris* (г/л, вода дистиллированная): крахмал растворимый — 10,0 г; мясной экстракт — 1,0 г; NH₄Cl — 5,0 г;

K_2HPO_4 — 2,0 г; метиловый фиолетовый 2В (1 % раствор в 20 % этаноле) — 0,4 мл; метиловый зеленый (1 % водный раствор) — 2,0 мл; агар-агар — 15 г.

После стерилизации при 0,5 атм в течение 20 мин и охлаждения до 50 °С добавляют 2 мл раствора циклогексимида (100 мг/мл) в 75 % этаноле.

Тема 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ

Круг факторов, вовлекаемых в развитие болезней растений, довольно широк, но здесь ограничимся описанием ряда наиболее распространенных тестов на фитопатогенность.

Определение способности мацерировать растительную ткань. Оптимальным вариантом проверки мацерирующей способности бактерий является тот, в котором используется растение-хозяин. Однако при отсутствии необходимых тканей можно использовать клубни картофеля или корнеплодов моркови и свеклы.

Клубни и корнеплоды промывают в проточной и стерильной воде и высушивают. Затем стерилизуют их поверхность 96 % этанолом и стерильным пробочным сверлом нарезают диски растительных тканей диаметром 1 см и толщиной 3—5 мм, которые помещают в чашки Петри на увлажненные фильтры или на поверхность 1,5 % агар-агара. Диски большего диаметра можно нарезать с помощью скальпеля и простерилизовать 96 % этанолом с последующим обжиганием дисков в пламени спиртовки. На каждый диск накапывают суточные культуры исследуемых бактерий. Чашки помещают в термостат для культивирования при оптимальной температуре на 1—3 сут. Наличие или отсутствие мацерации определяют визуально или при прикосновении к дискам бактериологической петлей.

Определение способности деградации пектиновых веществ. Исследуемые бактериальные культуры засевают медальонами (диаметр 3—5 мм) по трафарету на поверхность полипектатного геля в чашках Петри. Гель готовят, наслаивая 3—4 мл 1,5 % полипектата натрия на поверхность затвердевшей агаризованной полноценной среды, содержащей ионы Ca^{2+} (2,5 мл 1 М раствора $CaCl_2$ на 100 мл среды). Затем чашки Петри помещают в термостат с температурой, оптимальной для развития бактерий. При

продукции пектолитических ферментов на поверхности полипектатного геля бактерии образуют лунки.

Определение целлюлолитической активности. Исследуемые бактериальные культуры засевают медальонами (диаметр 5—8 мм) на поверхность минимальной агаризованной среды, содержащей 0,1 % растворимой целлюлозы (карбоксиметилцеллюлозы) и инкубируют в течение 48 ч при оптимальной температуре. После этого чашки заливают 0,1 % водным раствором конго красного и выдерживают 20 мин. Краситель сливают, чашки промывают 8 % водным раствором хлорида натрия. Наличие светлых неокрашенных зон в месте роста бактерий или вокруг медальонов свидетельствует о продукции целлюлолитических ферментов.

Изучение фитотоксических свойств. Наиболее удобным объектом для изучения фитотоксических свойств (или способности продуцировать токсины) является зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* 157, поскольку она хорошо культивируется на простых питательных средах.

3—4 мл взвеси клеток хлореллы (смыв со скошенного агара в пробирке) вносят в 300 мл охлажденной до 46 °С минимальной агаризованной глюкозо-солевой среды с дрожжевым экстрактом и разливают в чашки Петри. Исследуемые бактериальные штаммы засевают медальонами (диаметр 5—8 мм) по трафарету на поверхность среды. Чашки инкубируют в течение 24 ч при температуре, оптимальной для роста бактерий, после чего помещают в светотеплицу и инкубируют 3—5 сут для развития хлореллы. При наличии фитотоксических свойств наблюдается зона задержки роста хлореллы (зона просветления) вокруг выросших медальонов бактерий.

Определение способности вызывать некроз растительной ткани (реакция гиперчувствительности). Если растение заразить фитопатогенными бактериями, не являющимися патогенными для данного вида растений, то в месте введения бактерий запускаются быстрые механизмы защитного ответа. Растительные клетки в месте попадания патогена гибнут, что сопровождается локальным почернением и усыханием. В результате предотвращается распространение патогена по растению.

В качестве тест-растения для определения некротической способности (реакции гиперчувствительности) наиболее часто используют растения бобов конских (*Vicia faba*) и табака настоящего (*Nicotiana tabacum*). Для данных растений характерен быстрый рост,

неприхотливость, наличие листовых пластинок, пригодных для инокуляции бактерий с помощью иглы. Поскольку бобы и табак чаще всего не являются специфическими растениями-хозяевами для исследуемых бактерий, то для полного анализа следует также использовать заражение и того растения, из которого были выделены бактерии. Вместе с тем необходимо помнить, что на растениях табака могут вызывать заболевание некоторые виды бактерий — *Pseudomonas solanacearum*, некоторые патовары *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas campestris*, а на растениях бобов — *Pseudomonas lupini* и некоторые патовары *Pseudomonas syringae*. Это также может быть дополнительным дифференцирующим признаком для идентификации некоторых видов фитопатогенных бактерий.

Исследуемые бактериальные штаммы инкубируют на скошенном агаре в течение 24 ч. Клетки смывают с помощью 3—4 мл физиологического раствора и 15—20 мкл вводят в мякоть листа с помощью стерильного шприца (для стерилизации шприц промывают сначала в 70 %, затем в 96 % этанолом, после этого физиологическим раствором). Для контроля вводят такой же объем стерильного физиологического раствора. Реакция СВЧ проявляется в почернении участка листовой пластинки в месте введения бактериальной суспензии в течение 1—3 сут после инокуляции.

Тема 4. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ

При постановке физиолого-биохимических тестов следует:

- ставить положительные и отрицательные контроли;
- использовать молодые (18—24-часовые) культуры;
- засеивать культуру одним из способов: рассев до изолированных колоний, нанесение точечной колонии с помощью петли или капли суспензии (10^6 — 10^7 кл/мл), укол в агар, внесение жидкой культуры в жидкую среду.

Определение грампринадлежности. На предметное стекло наносят каплю 3 % раствора КОН. С помощью петли или деревянной шпильки вносят биомассу изучаемого штамма, взвесь тщательно перемешивают. Если суспензия образует тянущуюся за шпилькой субстанцию, то штамм относится к грамотрицательным, если нет — к грамположительным.

Определение подвижности. Микроскопически подвижность определяют у клеток молодой (суточной) культуры с помощью фазово-контрастного микроскопа. Для того чтобы отличить подвижность от пассивного броуновского движения, к капле исследуемой культуры добавляют каплю 5 % водного раствора фенола. Активное движение в этом случае прекращается.

Для определения подвижности можно воспользоваться также следующим методом. Готовят 0,3 % полноценный агар, разливают его в пробирки по 5—6 мл. Затем тонкой иглой исследуемую культуру засевают в пробирки, которые помещают в термостат. После инкубирования в течение 1—2 сут отмечают характер роста бактерий: если бактерии подвижны (*Escherichia coli*), то рост будет наблюдаться по всему столбику агара (диффузное помутнение среды), неподвижные бактерии (*Staphylococcus saprophyticus*) растут только по линии укола.

Кроме того, подвижность можно наблюдать на «голодном» агаре. Низкая концентрация питательных веществ в среде культивирования заставляет бактерии, если они подвижны, по мере роста перемещаться из области посева в более богатые питательными веществами зоны. Для постановки теста готовят 0,3 % минимальную среду: 2 % водный агар — 9 мл; солевой концентрат $\times 4$ — 5 мл; 20 % водный раствор глюкозы — 0,2 мл; вода дистиллированная — 46 мл. Если бактерии обладают сложными пищевыми потребностями, то используют среду, содержащую 1 % триптона и 0,3 % агар-агара (pH 7,2). Среды разливают в пробирки (по 3 мл) или чашки Петри (подсушивают, не переворачивая). Посев бактерий в пробирки проводят уколом на чашки Петри — из ночных культур, прикасаясь пипеткой к ее поверхности. Пробирки или чашки инкубируют в термостате не менее 3 сут. Диффузное помутнение среды в пробирках свидетельствует о подвижности бактерий, рост только по линии укола — об их неподвижности. При использовании чашек Петри подвижные бактерии формируют мутные пятна роста, превышающие по диаметру размер нанесенной капли, неподвижные — растут только в зоне посева.

Определение роста при различных температурах. Интенсивность роста определяется в интервале температур 4—60 °С. Для этого на агаризованную среду в чашках Петри проводят посев исследуемых культур до изолированных колоний и помещают в соответствующие условия. Оптимальную температуру роста определяют визуально по времени появления одиночных колоний.

Определение каталазы. Каплю пероксида водорода (3 % раствор) наносят на предметное стекло и туда же вносят петлю исследу-

дуемой культуры. В присутствии каталазы образуются пузырьки водорода. В качестве положительного контроля могут быть использованы штаммы *Pseudomonas* spp., отрицательного — *Agrobacterium* spp.

З а м е ч а н и е. Каплю пероксида водорода можно наносить непосредственно на колонию и следить за выделением газа.

Определение оксидазы. Пробу ставят с 1 % раствором тетраметил- или диметилпарафенилендиамин гидрохлорида). Раствор реактива нестойк, поэтому его используют свежеприготовленным. На 18—24-часовую культуру на чашке Петри наливают несколько капель реактива и, наклонив чашку, дают ему стечь. Через 30—60 с колонии микроорганизмов, обладающих оксидазой, приобретают пурпурную окраску. Оксидазоположительными являются штаммы *Pseudomonas* spp., оксидазоотрицательными — *Escherichia* spp.

Отношение микроорганизмов к кислороду. Исследуемую культуру уколом бактериологической иглы засевают в пробирки с высоким столбиком (не менее 2/3 по высоте) полноценной агаризованной среды. Расплавленную и разлитую в пробирки среду быстро охлаждают под струей холодной воды и засевают уколом культуру микроорганизмов. После культивирования отмечают характер роста: если рост происходит на поверхности среды — исследуемые микроорганизмы относятся к аэробам; если только в глубине или на дне столбика агара — к облигатным анаэробам; равномерный рост по всему уколу указывает, что выросшие микроорганизмы — факультативные анаэробы; рост на некотором расстоянии от поверхности — на их принадлежность к микроаэрофилам.

З а м е ч а н и е. В среду для снижения ее окислительно-восстановительно-го потенциала может быть внесен восстанавливающий агент, например тиогликолат натрия (концентрация 0,05 %) или цистеин-HCl (0,025 %), которые добавляются перед автоклавированием. Приготовленные среды долго не хранят, исключается их хранение в холодильнике.

Окислительное, или ферментативное, образование кислоты из углеводов (тест Хью — Лейфзона, О/Ф-тест). Готовят среду следующего состава (г/л): пептон ферментативный — 2 г; NaCl — 5 г; K_2HPO_4 — 0,3 г; агар-агар — 5 г; вода дистиллированная; pH 7,2. Стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм 20—25 мин. Отдельно стерилизуют 10 % водные растворы углеводов, которые вносят перед использованием из расчета 10 мл углевода на 100 мл среды. В среду после автоклавирования вносят один из индикаторов — бромтимоловый синий (0,3 мл 1 % спиртового раствора на 100 мл среды) или 1,6 % бромкрезоловый пурпурный (0,01 мл на 100 мл среды). При подборе индикатора сле-

дует убедиться, что он не подавляет рост микроорганизмов. Все индикаторы плохо растворимы в воде и используются в средах в очень низких концентрациях.

Среду разливают по пробиркам. Исследуемые культуры засевают уколом параллельно в две пробирки, одну из которых заливают стерильным вазелиновым маслом. Результаты регистрируются ежедневно. Организмы, сбраживающие сахар (отрицательный оксидазный тест, F-реакция, *Erwinia* spp.), образуют кислоту в обеих пробирках. Об этом судят по изменению окраски индикатора. Микроорганизмы с окислительным типом метаболизма (оксидазоположительные, O-реакция, *Pseudomonas* spp.) образуют кислоту только в открытой пробирке; вначале в верхней части среды. Если кислота не образуется ни в одной из пробирок, значит, бактерии не катаболизируют углевод, если рост вообще не происходит, то, возможно, в среде нет питательного вещества, необходимого для него.

Определение наличия сахаролитических ферментов (образование кислоты и газа из углеводов). Готовят дифференциально-диагностические среды Гисса: в дистиллированную воду добавляют 1 % пептона, 0,5 % NaCl, 1 % K_2HPO_4 и индикатор (например, 1 % индикатор Андреде или 1,6 % бромкрезоловый пурпурный; 0,01 мл на 100 мл среды); pH 7,2. Добавляют исследуемый углевод до концентрации 0,5—1,0 %. Среду уплотняют добавлением 0,5 % агара, стерилизуют 15 мин при 0,5 атм. Образование кислоты отмечают по изменению цвета индикатора, газа — по появлению пузырьков или разрывов в толще среды.

Образование индола. Бактериальные культуры засевают в 3 мл бульона или пептонной воды с триптофаном (0,01 %) и инкубируют в течение 3—5 сут. К культуре микроорганизмов добавляют 2—3 капли 30 % H_2SO_4 и осторожно пастеровской пипеткой по стенке наслаивают 0,05 % раствор нитрата натрия. При ферментации культурой триптофана до индола на границе раздела жидкостей появляется розовое кольцо.

З а м е ч а н и е. Пептонная вода (г/л): пептон ферментативный — 10 г; NaCl — 5 г; вода дистиллированная; pH 7,2.

Для детектирования индола можно воспользоваться реактивом Эрлиха: парадиметиламидобензальдегид — 1 г; этиловый спирт 96 % — 95 мл; концентрированная HCl — 20 мл. Реактив аккуратно наслаивают на поверхность культуры. При положительной реакции на индол на границе раздела жидкостей появляется рубиново-красное кольцо.

Образование сероводорода. Готовят среду состава (г/л): пептон — 10 г; CaCl_2 — 5 г; лимонно-аммиачное железо — 0,3 г; дрожжевой экстракт (10 %) — 2 мл; агар-агар — 15 г; вода водопроводная; pH 7,0. Стерилизуют 15 мин при 0,5 атм. Исследуемые культуры засевают на поверхность скошенного агара. О выделении сероводорода судят по почернению среды.

З а м е ч а н и е. Для определения продукции сероводорода можно использовать индикаторные бумажки, пропитанные раствором ацетата свинца. В этом случае бактерии засевают в пептонную воду или бульон и в пробирку под пробку помещают индикаторные бумажки. Инкубируют в течение 3—5 сут. При образовании сероводорода наблюдается почернение индикаторной бумажки, при отрицательной реакции — ее цвет не изменяется.

Разжижение желатина. К жидкой полноценной среде (бульон) добавляют 12—15 % желатина, после набухания его растворяют при нагревании. После стерилизации (15 мин при 0,5 атм) разливают в пробирки по 5 мл. При наличии протеолитических ферментов (*Proteus vulgaris*), выделяемых в процессе роста культуры, наблюдается разжижение столбика желатина.

Определение амилалитической активности. Для определения используют полноценную среду, дополненную растворимым (0,2 %) или нерастворимым (1 %) крахмалом. После формирования колоний поверхность среды обрабатывают раствором Люголя. Фиксируют наличие зон просветления вокруг колоний, свидетельствующих о разложении крахмала (*Bacillus subtilis*).

Определение казеинолитической активности на молочных питательных средах. Исследуемые бактериальные культуры засевают медальонами (диаметр 3—5 мм) по трафарету на поверхность минимальной агаризованной среды, содержащей 1 % обезжиренного молока (20 мл 5 % раствора обезжиренного молока на 100 мл среды). Чашки помещают в термостат на 24—48 ч с температурой, оптимальной для развития бактерий. При продукции протеолитических ферментов наблюдаются зоны просветления среды вокруг места роста бактерий.

При использовании жидкой среды (5 % раствор обезжиренного молока) культуру засевают петлей и суспендируют. Учет результатов проводят через 12, 18—24 ч и отмечают:

- свертывание, в результате которого образуются сгустки казеина (при наличии газообразования сгусток может всплывать на поверхность);
- пептонизацию (лизис казеина), при котором молоко становится прозрачным.

Обе реакции могут происходить последовательно или одновременно. При отрицательной реакции молоко остается без изменений.

Определение лецитиназной активности. Готовят яично-желточную плотную среду: к 300 мл стерильного мясо-пептонного агара, расплавленного и охлажденного до 45—50 °С, добавляют один желток куриного яйца. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Исследуемые культуры засевают в чашки медальонами и наблюдают за характерными изменениями среды. При положительной реакции (например, стафилококки, клостридии) на агаре появляется зона просветления, а на поверхности среды вокруг колонии формируется небольшой ореол с металлическим блеском. При отрицательной реакции цвет среды вокруг колоний не изменяется.

Определение аргининдегидролазной активности. Микроорганизмы, обладающие аргининдегидролазой, в анаэробных условиях образуют из аргинина аммиак, что сопровождается защелачиванием среды и изменением цвета индикатора. Метод используется для дифференциации патогенных псевдомонад. Основная среда (г/л): пептон ферментативный — 1 г; NaCl — 5 г; K_2HPO_4 — 0,3 г; L(+)аргинин-HCl — 10 г; феноловый красный — 0,01 г; агар-агар — 15 г; pH 6,9—7,0. Среду стерилизуют при 0,5 атм 15 мин, затем разливают по 5 мл в стерильные пробирки и после охлаждения засевают уколом испытуемую культуру. Каждой культурой засевают две пробирки, одну из которых заливают стерильным вазелиновым маслом. Результаты учитывают через 24—48 ч. В случае положительной реакции у бактерий, выращенных в анаэробных условиях, цвет среды изменяется с желтого на красный.

З а м е ч а н и е. Исследуемые бактерии выращивают на среде следующего состава (%): пептон — 0,5; мясной экстракт — 0,5; глюкоза — 0,05; пиридоксаль — 0,0005; исследуемая аминокислота — 1,0; pH 6,0. На 100 мл среды добавляют 0,2 мл (0,2 % раствора) крезолового красного, 0,5 мл (0,2 % раствора) бромкрезолового пурпурного. В случае положительной реакции цвет среды культивирования изменяется от серо-синего к сине-фиолетовому.

Ассимиляция азота минеральных солей. Готовят основную среду (г/л): глюкоза — 20 г; K_2HPO_4 — 1 г; $MgSO_4$ — 0,5 г; NaCl — 0,5 г; агар-агар — 15 г; вода дистиллированная; pH 7,1—7,2. В одном случае в среду вносят 1 г NH_4Cl и 5 г $CaCO_3$, в другом — 1 г KNO_3 . Стерилизуют при 0,5 атм 15 мин и готовят скошенный агар, на который осуществляют посев исследуемой культуры. В случае ассимиляции азота минеральных солей наблюдается рост исследуемой культуры.

Определение наличия нитратредуктазы (восстановление нитратов) с использованием реактива Грисса. При взаимодей-

ствии бактериальной нитратредуктазы с нитратом натрия или калия происходит их восстановление до нитритов, которые выявляют с помощью реактива Грисса, образующего с нитратами соединения вишнево-красного цвета.

К исследуемой микробной культуре (18—24 ч) на скошенном агаре приливают 1—2 мл физиологического раствора, диспергируют. В опытную и контрольную пробирки вносят по 1 мл микробной суспензии, в которую добавляют по 0,1 мл 10 % раствора нитрата натрия или калия.

З а м е ч а н и е. Соли можно использовать в виде порошка (в этом случае вносят несколько кристалликов селитры).

Пробирки инкубируют в течение 1 ч при 37 °С. Затем в каждую пробирку вносят по 1 мл реактива Грисса. Результаты учитывают в течение 1 мин: появляется вишнево-красное окрашивание, которое при большом количестве нитратов может немедленно измениться до желтого.

Дезаминирование фенилаланина. Взаимодействие микробной фенилаланиндезаминазы с L-фенилаланином приводит к образованию фенилпировиноградной кислоты, которая при добавлении хлорида железа(III) дает хромогенную реакцию.

Основная среда (г/л): дрожжевой экстракт — 3 г; L-фенилаланин — 2 г; Na_2HPO_4 — 1 г; NaCl — 5 г; агар-агар — 12 г; вода дистиллированная; pH 7,0. Среду стерилизуют при 0,5 атм 15 мин. Посев производят на длинно скошенную среду. Время инкубирования 2—10 дней. После инкубирования на колонии наносится 4—5 капель 10 % раствора FeCl_3 . Если произошло дезаминирование фенилаланина до фенилпировиноградной кислоты (*Proteus vulgaris*), появляется зеленая окраска, в противном случае (*Escherichia coli*) слегка желтоватый цвет среды не изменяется.

З а м е ч а н и е. При замене фенилаланина на триптофан в случае положительной реакции наблюдается коричнево-красная окраска.

Определение уреазной активности. Фермент уреазы гидролизует мочевины до аммиака. Сдвиг pH среды в щелочную сторону можно детектировать с помощью индикаторов. Реакция проводится на среде с мочевиной.

Готовят два раствора:

- раствор А: 96 % этанол — 2 мл, дистиллированная вода — 4 мл, мочевина — 2 г (раствор не стерилизуют, хранят на холоду);
- раствор Б: KH_2PO_4 — 0,1 г, K_2HPO_4 — 0,1 г, NaCl — 0,5 г, 1 мл 0,2 % раствора фенолового красного, вода дистиллированная — до 100 мл (раствор Б стерилизуют в автоклаве).

Перед использованием смешивают 1 ч. раствора А и 19 ч. раствора В, смесь разливают в микропробирки по 0,1 мл. Максимальное количество исследуемой культуры вносят в среду и растирают в ней. Учет результатов проводят после 30—60 мин инкубирования при 37 °С (предварительный) и через 6—12 ч (окончательный) по изменению окраски среды. При расщеплении мочевины окраска среды из слабо-желтой переходит в малиново-красную.

З а м е ч а н и е. Уреазу можно выявить и при культивировании микроорганизмов на среде с раствором мочевины. Состав среды: питательный бульон (рН 7,2) — 100 мл; 1,6 % спиртовой раствор крезолового красного — 0,2 мл; стерильный 20 % раствор мочевины — 10 мл. Бактерии выращивают в 3 мл среды в течение 2—7 сут. При наличии фермента уреазы происходит покраснение среды.

Комбинированный метод выявления уреазы и фенилаланиндезаминазы у бактерий. Используют двухкомпонентную питательную среду следующего состава: дрожжевой экстракт — 1 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2 г; NaCl — 3 г; K_2HPO_4 — 1,2 г; KH_2PO_4 — 0,8 г; L-фенилаланин — 2,5 г; мочевины — 5 г; феноловый красный — 3,5 мл (0,5 г фенолового красного растворяют в 20 мл 0,1 н. NaOH и добавляют 230 мл дистиллированной воды); вода дистиллированная — до 1000 мл; рН 6,8. Цвет среды слабо-розовый. Среду стерилизуют фильтрованием.

Среду разливают в микропробирки по 0,3 мл и вносят одну полную петлю микробной культуры. Засеянные пробирки инкубируют в термостате в зависимости от температурного оптимума бактерий (желательно при 35—37 °С). Регистрацию результатов осуществляют визуально в течение 1—4 ч инкубации посевов. При разложении мочевины уреазоположительными бактериями окраска среды становится темно-малиновой. Затем переходят к определению фенилаланиндезаминазы. Сначала в среду добавляют 2 капли 1 % HCl для создания кислой среды (желтый цвет среды), а затем 2 капли 10 % FeCl_3 . При положительном результате (расщеплении фенилаланина) через 10 с появляется зеленое окрашивание, при отрицательном — цвет среды не изменяется.

Продукция 3-кетолактозы. Бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (биовар 1) способны окислять лактозу до 3-кетолактозы, что может быть выявлено по ее специфическому окрашиванию реактивом Бенедикта.

З а м е ч а н и е. Реактив Бенедикта готовят из двух растворов:

- раствор А: цитрат натрия — 173 г; безводный Na_2CO_3 — 100 г, дистиллированная вода — 600 мл;

- раствор В: CuSO_4 — 17,3 г, дистиллированная вода — 150 мл.

В большой стакан с раствором А медленно при перемешивании добавляют раствор В и доводят объем смеси до 1000 мл дистиллированной водой.

Исследуемые бактерии засевают медальонами в чашки Петри на поверхность лактозной среды (г/л, вода дистиллированная): α -лактоза — 10 г; дрожжевой экстракт — 1 г; агар-агар — 20 г. Чашки инкубируют в термостате 2 сут, после чего на поверхность среды наливают реактив Бенедикта и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. Формирование желтого кольца осадка Cu_2O вокруг бляшек свидетельствует об образовании бактериями 3-кетолактозы.

Выявление гранул поли- β -оксимасляной кислоты (поли- β -гидроксибутирата). Некоторые фитопатогенные бактерии (виды рода *Pseudomonas*) запасают органические вещества в форме гранул полиэфиров β -оксимасляной кислоты, которые могут быть специфически окрашены.

Техника окрашивания:

- на фиксированный мазок наносят 0,3 % раствор Судана черного В или Судана III (0,1 г Судана растворяют в 30 мл 70 % этанола, раствор фильтруют). Окрашивание проводят в течение 10—15 мин;

- краситель сливают, препарат высушивают на воздухе;
- предметное стекло несколько раз промывают в кислоте (толуоле) или на 1 мин заливают ксилолом, высушивают фильтровальной бумагой;

- дополнительно окрашивают препарат 0,1 % водным раствором сафранина в течение 10—20 с;

- препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Включения поли- β -оксимасляной кислоты выглядят как черносиние капельки, в то время как цитоплазма окрашена в розовый цвет.

Замечание. Следует обратить внимание на то, что накоплению поли- β -оксимасляной кислоты способствует выращивание клеток на средах с соотношением $\text{C} : \text{N} > 10$ или же на средах с органическими кислотами.

Определение окисления глюконата калия. При культивировании глюконатокисляющих бактерий в питательной среде с глюконатом калия он окисляется при взаимодействии с бактериальными ферментами, продукты окисления выявляют по хромогенной реакции с индикатором.

Реакцию проводят в среде следующего состава (в %): глюконат калия — 1; NaCl — 0,55; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,05; KH_2PO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,01. В пробирку с 1 мл среды вносят петлю микробной культуры с плотной среды. Засеянные пробирки помещают в термостат (37 °C) на 6 ч. Затем в каждую из них приливают по 3 мл

1 % раствора молибдата аммония и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты. Пробирки встряхивают и кипятят на водяной бане 5 мин с последующим быстрым охлаждением. При положительной реакции появляется темно-синяя окраска, при отрицательной — среда бесцветная или бледно-голубая.

Определение восстанавливающих веществ из сахарозы. Испытуемые бактериальные культуры инкубируют в 2 мл бульона с 4 % сахарозы в течение 48 ч. После этого к культуральной жидкости приливают равный объем (2 мл) реактива на восстанавливающие вещества, и смесь прогревают в течение 10 мин на водяной бане. При положительной реакции появляется зеленое или буро-коричневое окрашивание в зависимости от количества образованных восстанавливающих веществ.

З а м е ч а н и е. Реактив на восстанавливающие вещества готовят непосредственно перед проведением реакции, смешивая растворы 1 и 2 в соотношении 4 : 1.

Раствор 1 (в %): тартрат натрия — 1,5; NaHCO_3 — 2,0; Na_2CO_3 — 3,0; Na_2SO_4 — 18,0; вода дистиллированная.

Раствор 2 (в %): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; Na_2SO_4 — 18,0; вода дистиллированная.

Определение образования ацетона или ацетилметилкарбинола (реакция Фогес — Проскауэра). Культивирование микроорганизмов на среде Кларка, содержащей глюкозу, расщепление которой приводит к образованию ацетона или ацетилметилкарбинола (конечных продуктов распада глюкозы), выявляемых с помощью специфического реактива, дающего с ними хромогенную реакцию. Бактериальные культуры инкубируют в течение 4—5 сут в 3 мл среды Кларка.

З а м е ч а н и е. Приготовление среды Кларка: по 0,5 г пептона, глюкозы и K_2HPO_4 растворяют в 100 мл дистиллированной воды (pH 7,2), подогревают и после охлаждения фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют 15 мин при 0,5 атм.

К 1 мл 4—5-суточной культуры добавляют 0,6 мл раствора α -нафтола (5 % раствор в 96 % этаноле) и 0,2 мл 40 % раствора КОН. Пробирки энергично встряхивают. Результаты учитывают через 1—2 ч. При положительной реакции появляется малиновое окрашивание среды вследствие образования диацетила из ацетона или ацетилметилкарбинола в присутствии щелочи и его специфической реакции с α -нафтолом.

Определение образования кислоты из глюкозы (тест с метиловым красным). Глубокое расщепление глюкозы бактериальными ферментами сопровождается образованием кислоты (pH < 5),

что выявляется с помощью индикатора метилового красного, имеющего малиново-розовую окраску при таких значениях pH.

После 4-суточного роста культуры в среде Кларка в нее прибавляют 3—5 капель 0,04 % раствора метилового красного (1 мл 1,6 % спиртового раствора метилового красного и 39 мл спирта, раствор сохраняется неограниченно долго). При сильном кислотообразовании получается красное окрашивание, при слабом — желтое.

Комбинированные реакции с метиловым красным и ацетоном. Исследуемые культуры выращивают в течение 4—5 сут в 2 мл среды Кларка. К культуре добавляют 4—5 капель 0,04 % раствора метилового красного. При положительной реакции отмечается покраснение, при отрицательной — развивается желтая окраска среды. После учета реакции с метиловым красным (через 5—10 мин) в среду приливают 8—10 капель 40 % раствора КОН. После перехода цвета среды от красного к желтому добавляют 15—20 капель 5 % спиртового раствора α -нафтола. Пробирку встряхивают и через 15—30 мин учитывают результат реакции. При положительном результате развивается малиновая окраска, при отрицательном — среда имеет желтую окраску.

Тест на устойчивость к хлориду натрия. Бактериальные культуры засевают штрихом на КА, содержащий хлорид натрия в следующих концентрациях (%): 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,0. Чашки инкубируют в течение 24—48 ч, затем регистрируют интенсивность роста микроорганизмов или его отсутствие.

Тест на подщелачивание среды при использовании тартратов, цитратов, малонатов, пропионатов. Тест используется для идентификации видов рода *Agrobacterium*.

Готовят агаризованную среду следующего состава (г/л): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 0,5 г; K_2HPO_4 — 0,5 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 г; NaCl — 5,0 г; агар-агар — 12,0 г; pH 6,8. Среду стерилизуют при 1,5 атм в течение 30 мин. Кипячением отдельно стерилизуют 5 % раствор дрожжевого экстракта и 20 % растворы солей натрия: L-тартрат, цитрат, малонат, пропионат. В 100 мл среды вносят 2 мл раствора дрожжевого экстракта, 1 мл раствора исследуемого углевода и 0,2 мл 1 % спиртового раствора бромтимолового синего. Среду разливают по 5 мл в стерильные пробирки. Бактериальные штаммы засевают уколом. Результаты учитывают через 2—4 дня. Микроорганизмы, подщелачивающие среду в процессе утилизации углеводов, изменяют окраску среды с зеленой на синюю.

Тест на чувствительность к эритромицину. Тест используется для идентификации видов рода *Erwinia*. Бактериальные

штаммы засевают штрихом на картофельный агар, содержащий эритромицин (готовят на 45 % этаноле) в следующих концентрациях (мкг/мл): 10, 25, 50, 100. Чашки инкубируют в течение 24—48 ч, затем регистрируют наличие или отсутствие роста микроорганизмов.

В случае использования дисков, пропитанных эритромицином, на поверхность картофельного агара с помощью шпателя засевают газоном 0,1 мл ночной культуры исследуемых бактерий. Через 24—48 ч регистрируют зону роста бактерий вокруг дисков.

З а м е ч а н и е. Чувствительные к эритромицину виды *Erwinia* не растут на картофельном агаре, содержащем 50 мкг антибиотика в 1 мл среды, или образуют зону задержки роста вокруг диска (15 мкг антибиотика на диск).

Тест на потребность в факторах роста. Тест используется для установления видовой принадлежности бактерий родов *Erwinia*, *Xanthomonas* и *Agrobacterium*. Исследуется наличие роста бактерий на минимальной глюкозо-солевой среде.

Отдельно готовят:

- 2 % водный агар-агар;
- 20 % водный раствор глюкозы;
- солевой концентрат $\times 4$ (г/л, вода дистиллированная): NH_4Cl — 20 г; NH_4NO_3 — 4 г; Na_2SO_4 — 8 г; K_2HPO_4 — 12 г; KH_2PO_4 — 4 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г; pH 7,2.

Солевой концентрат $\times 4$ и 2 % водный агар-агар стерилизуют автоклавированием при 1,5 атм 30 мин, 20 % раствор глюкозы стерилизуют кипячением.

Для приготовления минимальной глюкозо-солевой среды к 300 мл 2 % водного агара-агара добавляют 100 мл солевого концентрата $\times 4$ и 4 мл 20 % раствора глюкозы. Среду разливают в чашки Петри и на поверхность засевают штрихом исследуемые штаммы. Результаты регистрируют через 2—3 сут. Отсутствие роста на минимальной глюкозо-солевой среде свидетельствует о потребности бактерий в факторах роста, наличие роста — об отсутствии этой потребности.

З а м е ч а н и е. В случае необходимости в среду вносят факторы роста: витамины, которые добавляют до конечной концентрации 2 мкг/мл, т. е. 1 мл раствора витамина (0,2 мг/мл) на 100 мл среды; аминокислоты — до конечной концентрации 20 мкг/мл (L-формы) или 40 мкг/мл (D-, L-формы), т. е. 1 мл раствора аминокислоты (2 или 4 мг/мл) на 100 мл среды; дрожжевой экстракт — до конечной концентрации 0,05 %, т. е. 1 мл 5 % дрожжевого экстракта на 100 мл среды. Факторы роста готовят отдельно; стерилизуют кипячением (аминокислоты и дрожжевой экстракт) или фильтрованием (витамины).

Тест на использование (утилизацию) источников углерода. Тест используется для установления видовой принадлежности бактерий родов *Pseudomonas* и *Clavibacter*. Изучается наличие роста бактерий на минимальной агаризованной среде с исследуемым источником углерода.

Для приготовления минимальной агаризованной среды к 300 мл 2 % водного агар-агара добавляют 100 мл солевого концентрата $\times 4$ и 4 мл 20 % водного раствора исследуемого источника углерода. Среду разливают в чашки Петри и на поверхность засевают штрихом исследуемые штаммы. Результаты регистрируют через 2—3 сут.

Наличие роста бактерий на минимальной агаризованной среде с источником углерода свидетельствует об его утилизации, отсутствие роста — о неспособности бактерий использовать данный источник углерода.

Тест на продукцию левана. Используется для установления видовой принадлежности бактерий рода *Pseudomonas*. Ряд бактерий этого рода, утилизирующих сахарозу в качестве источника углерода, продуцируют из нее также леван, что свидетельствует о наличии у них фермента левансахарозы.

Исследуемые бактерии засеваются на поверхность НА-агара, содержащего 5 % сахарозы. Инкубируют в термостате 3—5 сут. Бактерии, продуцирующие леван, на среде с сахарозой образуют белые, мукоидные, тянущиеся колонии.

Определение липолитической (твиназной) активности микробов. Твины представляют собой сложные эфиры сорбитола, маннитола и других спиртов и жирных кислот. В частности, твин 80 — эфир олеиновой кислоты. Под действием бактериальных липаз жирные кислоты отщепляются и осаждаются в виде мыла присутствующими в питательной среде ионами кальция, что сопровождается помутнением среды. Твиназная активность используется для идентификации бактерий рода *Pseudomonas*.

Готовят среду следующего состава (г/л, вода дистиллированная): пептон — 10 г; NaCl — 5 г; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,15 г; агар-агар — 15,0 г; pH 7,2. После стерилизации при 1,5 атм в течение 20 мин к среде добавляют 10 мл твин 80 (стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 мин), перемешивают и разливают в чашки Петри. Исследуемые бактерии засевают медальонами на поверхность среды и инкубируют в термостате 7 сут.

При положительной реакции (наличие твиназы у микробов) наблюдается замутнение среды вокруг бляшек микроорганизмов, при отрицательной — среда остается прозрачной.

Тест на гидролиз эскулина. Бактерии, обладающие β -гликозидазной активностью, способны расщеплять эскулин (6,7-дигидроксикумарин-6-гликозид) с образованием хромогенных конечных продуктов, изменяющих окраску среды на темно-коричневую и черную. Тест используется для видовой идентификации бактерий родов *Xanthomonas* и *Clavibacter*. Кроме того, β -гликозидазной активностью обладают некоторые патовары *P. syringae*.

Готовят среду следующего состава (г/л, вода дистиллированная): пептон — 10 г; эскулин — 1 г; цитрат железа — 0,5 г; агар-агар — 15,0 г; pH 7,2. Стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 мин. Исследуемые бактерии засевают медальонами на поверхность среды и инкубируют в термостате 2—5 сут.

Регистрация результатов осуществляется визуально по изменению окраски бесцветной среды. При наличии у бактерий β -гликозидазы отмечается изменение цвета среды до темно-коричневого или черного.

Выявление пигментов. Пигментация бактерий может проявляться на питательных средах для выделения и культивирования фитопатогенов (см. п. 2.2). Кроме того, существуют селективные среды для выявления пигментов.

Среда Кинг А для образования пиоцианина (в %): бактопептон — 2,0; глицерин — 1,0; K_2SO_4 — 1,0; $MgCl_2$ — 0,14; агар-агар — 1,5; вода дистиллированная; pH 7,2. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

Среда для флюоресцирующих пигментов псевдомонад: полноценный питательный агар-агар с 2—7 % глицерина, который вносят до стерилизации. Пигмент выявляется при просмотре в проходящем ультрафиолетовом свете, при этом наблюдается гамма цветов от белого до зеленовато-голубого.

Среда для образования синего внеклеточного пигмента — индигойдина (состав в %): соевый триптический перевар — 4,0; дрожжевой экстракт — 0,1; глюкоза — 0,5; глицерин — 2,0; агар-агар — 1,5; вода дистиллированная; pH 7,3. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

Среда для образования оранжевых пигментов (в %): соевая мука — 1,5; пептон — 0,5; глюкоза — 1,5; NaCl — 0,5; CaCO₃ — 0,1; глицерин — 0,25; агар-агар — 2,0; вода водопроводная; pH 7,0. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

Среды для образования желто-оранжевых водонерастворимых пигментов.

Среда Нахимовской (в %): пептон ферментативный — 0,2; сахароза или маннит — 2,0; K₂HPO₄ — 0,02; MgSO₄ — 0,02; NaCl — 0,02; K₂SO₄ — 0,01; CaCO₃ — 0,5; агар-агар — 2; вода дистиллированная; pH 7,2. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

Среда Петренко (в %): пептон ферментативный — 2,0; глицерин — 2,0; K₂SO₄ — 2,0; MgCl₂ — 0,7; агар-агар — 2,0; вода дистиллированная; pH 7,0. Стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

1. Гены вирулентности микроорганизмов и их продукты.
2. Стратегия создания устойчивых к болезням растений методами генной инженерии.
3. Повышение устойчивости растений к бактериальным болезням методами генетической инженерии.
4. Биохимия апоптоза.
5. Гены авирулентности растений и специфические элиситоры.
6. 50 лет теории «ген-на-ген».
7. Биохимические механизмы устойчивости и восприимчивости растений.
8. hgr-гены растений.
9. Надорганизменные симбиозы в развитии заболевания, их характеристика.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Дифференцирующие признаки основных групп фитопатогенных бактерий

Признак	Род				
	<i>Erwinia</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Clavibacter</i>
Форма клеток	прямые палочки	прямые (изогнутые) палочки или коккобациллы			V-образные палочки неправильной формы
Окраска по методу Грама	—	—	—	—	+
Подвижность	+*	+	+	+	—
Оксидазная активность	—	±	+++	—	—
Каталазная активность	+	+	+	+	+
Образование кислоты из глюкозы	±	+	±	±	+
Окислительное (О) или ферментативное (Ф) образование кислоты из глюкозы	Ф	О	О	О	О
Восстановление нитратов	—	±	±	—	—
Пигмент	± (ж, р, г)	± (б)	± (ф, к, ж-з)	± (ж)	± (ж, о, г)

П р и м е ч а н и е. Обозначения: «+» — положительная реакция; «—» — отрицательная реакция; «±» — признак варьирует у разных видов; б — бежевый; г — голубой; ж — желтый; ж-з — желто-зеленый; к — коричневый; о — оранжевый; р — розовый; ф — флуоресцирующий.

* Отсутствует у *E. stewartii*.

** Отсутствует у *P. syringae* и *P. viridiflava*.

Дифференцирующие признаки основных видов рода *Ergwinia*

Признак	Вид							
	<i>E.amy- lovora</i>	<i>E.ana- nas</i>	<i>E.sac- ticida</i>	<i>E.car- tova</i>	<i>E.chry- santhemi</i>	<i>E.cyp- ripedii</i>	<i>E.mal- lotivora</i>	<i>E.nig- rifluens</i>
Потребность в факторах роста	+	—	?	—	—	—	+	—
Пигмент	—	+	—	—	d (r)	—	—	—
Мукоидный рост	+	+	—	d	d	d	+	—
Рост при 36 °С	—	+	+	d	+	+	—	+
Образование H ₂ S из цистеина	—	d	?	+	+	+	—	+
Восстанавливающие вещества из сахарозы	+	+	—	d	—	—	+	—
Ацетоин	+	+	+	+	+	—	+	+
Уреаза	—	—	—	—	—	—	—	+
Разжижение желатина	+	+	—	+	+	—	—	—
пектата	—	—	+	+	+	—	—	—
Гидролиз казеина	—	—	?	d	d	—	—	—
Окисление глюконата	—	—	—	—	—	+	—	—
Образование газа из D-глюкозы	—	—	—	d	+	+	—	—
Фенилаланиндеаминаза	—	—	—	—	—	+	—	—
Образование индола	—	+	—	—	+	—	—	—
Рост в присутствии 5 % раствора NaCl	?	+	+	+	d	+	—	?
Лецитиназа	?	?	?	—	+	—	?	?
Чувствительность к эритромицину (15 мкг/диск)	?	?	—	—	+	+	?	?
Восстановление нитрата	—	—	+	+	+	+	—	—

Признак	Вид						
	<i>E.amy- lovora</i>	<i>E.ana- nas</i>	<i>E.cac- tidea</i>	<i>E.car- tovora</i>	<i>E.chry- santhem</i>	<i>E.cyp- ripedii</i>	<i>E.nig- lotivora rifluens</i>
Потребность в факторах роста	?	—	+	—	—	—	—
Пигмент	+ (p)	—	—	+ (p)	-	+ (ж)	+ (ж)
Мукоидный рост	—	+	+	+	+	+	—
Рост при 36 °С	+	—	+	d	—	d	+
Образование H ₂ S из цистеина	—	+	+	+	+	—	—
Восстанавливающие вещества из сахарозы	?	+	+	d	+	d	+
Ацетон	+	+	+	+	+	—	+
Уреаза	—	—	—	—	—	—	—
Разжижение желатина пектата	—	—	—	—	—	—	—
Гидролиз казеина	?	—	—	—	—	—	—
Окисление глюконата	—	?	—	d	—	—	—
Образование газа из D-глюкозы	—	—	—	—	—	—	—
Фенилаланиндезаминаза	—	?	—	—	—	—	—
Образование индола	—	—	—	—	—	—	+
Рост в присутствии 5 % раствора NaCl	?	?	?	+	?	+	+
Лецитиназа	?	?	?	—	?	?	?
Чувствительность к эритромицину (15 мкг/диск)	?	?	?	+	?	?	?
Восстановление нитрата	+	—	—	+	—	—	+

П р и м е ч а н и е. Обозначения: «+» — положительная реакция; «—» — отрицательная реакция; d — 11—89 % штаммов положительные; г — голубой; ж — желтый; р — розовый; «?» — данных недостаточно.

Таблица 3

**Дифференцирующие признаки
основных видов рода *Agrobacterium***

Признак	Вид			
	<i>A.rhizogenes</i>	<i>A.rubi</i>	<i>A.tumefaciens</i>	
			биовар 1	биовар 2
Рост при 35 °С	—	d	+	—
Рост в присутствии 2 % раствора NaCl	—	?	+	—
Образование 3-кетолактозы	—	—	+	—
Подкисление среды при использовании:				
мезо-эритритола	+	+	—	+
мелецитозы	?	?	+	—
этанола	—	—	+	—
Подщелачивание среды при использовании солей натрия:				
малоната	+	+	—	+
L-тартрата	?	?	d	+
пропионата	?	?	d	—
цитрата	+	—	—	+
Реакция лакмусового молочка:				
щелочная	—	+	+	—
кислая	+	—	—	+
Потребность в факторах роста:				
биотине и/или глутаминовой кислоте	+	?	—	+
глутаминовой кислоте и дрожжевом экстракте	—	+	—	—

П р и м е ч а н и е. Обозначения: «+» — положительная реакция; «—» — отрицательная реакция; d — 11—89 % штаммов положительные; «?» — данных недостаточно.

Дифференцирующие признаки основных видов рода *Pseudomonas*

Признак	Вид						
	<i>P.ichorii</i>	<i>P.caryophylli</i>	<i>P.gladiosi</i>	<i>P.solanacearum</i>	<i>P.syringae</i>	<i>P.viridiflava</i>	<i>P.carrugata</i>
Диффундир. пигменты: флуоресцирующие нефлуоресцирующие	+	— + (ж-з)	— + (ж-з)	— d (к)	+	+	— + (ж-з)
Накопление поли-β-гидроксibuтирата	—	+	+	+	—	—	+
Рост при 41 °С	—	+	+	—	—	—	—
Рост при 4 °С	—	—	—	?	d	?	?
Аргининдигидролаза	—	+	—	—	—	—	?
Лецитиназа	+	d	+	—	d	d	?
Гидролиз: желатина крахмала	—	—	+	—	d	+	+
	—	—	—	—	—	—	?
Использование:							
глюкозы	+	+	+	+	+	+	?
трегалозы	—	d	+	+	—	—	?
мезо-инозитола	d	+	+	d	d	+	?
L-аргинина	+	+	+	—	d	+	?
D-ксилозы	?	+	+	—	?	?	?
D-рибозы	?	+	+	d	?	?	?
L-рамнозы	?	+	—	—	?	?	?
Нитрат как источник азота	+	+	?	?	+	+	?

Примечание: «+» — положительная реакция; «—» — отрицательная реакция; ж-з — желто-зеленый; к — коричневый; d — 11—89 % штаммов положительные; «?» — данных недостаточно.

Дифференцирующие признаки основных видов рода *Xanthomonas*

Признак	Вид					
	<i>X.albilineans</i>	<i>X.axonopodis</i>	<i>X.campestris</i>	<i>X.citrii</i>	<i>X.fragariae</i>	<i>X.phaseoli</i>
Потребность в метионине или цистеине для роста	+	?	d	—	?	?
Мукоидный рост на МПА с 5 % глюкозы	—	—	+	?	+	+
Гидролиз: желатина крахмала	d —	— +	d d	? +	++ +	— ?
Протеолиз молока	—	—	+	?	—	+
Образование H ₂ S из пептона	—	+	+	?	—	?
Пектиназная активность на минимальной среде	?	?	d	+	?	?
Температура роста, °C	37	35—37	35—39	38	33	27,5
Устойчивость к NaCl, %	0,5	1,0	2,0—5,0	?	0,5—1,0	?
Образование кислот из:						
арабинозы	—	—	+	?	—	?
маннозы	+	—	+	?	+	+
галактозы	d	—	+	?	—	+
трегалозы	—	+	+	?	—	+
целлобиозы	—	—	+	?	—	?
фруктозы	—	—	+	?	+	+

П р и м е ч а н и е. Обозначения: «+» — положительная реакция; «—» — отрицательная реакция; d — 11—89 % штаммов положительные; «?» — данных недостаточно.

Дифференцирующие признаки основных видов рода *Clavibacter*

Признак	Вид								
	<i>C.iranicus</i>	<i>insidiosus</i>	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	<i>sepedonicus</i>	<i>tessellarius</i>	<i>C.rathayi</i>	<i>C.tricici</i>	<i>C.xyli</i>
Цвет колоний желто-оранжевый	+	+	+	+	—	+	+	+	—
	—	—	+	—	—	—	+	—	—
Гидролиз: желатина	—	—	+	d	d	+	d	+	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Тест с метиленовым красным	—	+	—	d	—	—	d	—	—
	+	—	+	d	—	—	+	+	—
Образование H ₂ S из пептона Образование кислоты из:	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	d	?	—	+	+
	—	—	—	+	+	+	—	—	—
	—	—	—	+	+	+	—	—	—
Использование:	—	—	+	+	+	+	—	+	—
	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	—	—	d	+	—	?	—	—	—
	+	—	+	+	+	?	+	+	—

П р и м е ч а н и е. Обозначения: «+» — положительная реакция; «—» — отрицательная реакция; d — 11—89 % штаммов положительные; w — реакция слабая; «?» — данных недостаточно.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН КУРСА «ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ»	4
ПРОГРАММА КУРСА	5

КУРС ЛЕКЦИЙ

Тема 1. Исторический очерк развития представлений о фитопатогенных микроорганизмах	8
Тема 2. Общая характеристика заболеваний, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами	12
Тема 3. Основные признаки заболеваний растений	16
Тема 4. Общая характеристика патологического процесса	19
Тема 5. Классификация фитопатогенных бактерий	25
5.1. Характеристика грамотрицательных фитопатогенных бактерий	25
5.2. Характеристика грамположительных фитопатогенных бактерий	31
5.3. Характеристика фитопатогенных микоплазм	32
Тема 6. Плазмиды фитопатогенных бактерий	35
Тема 7. Факторы вирулентности фитопатогенных микроорганизмов	38
7.1. Характеристика ферментов, участвующих в деградации полимеров клеточных стенок бактерий	39
7.2. Продукция токсинов и их роль в патогенезе	49
7.3. Продукция экзополисахаридов как фактор патогенности	54
7.4. Образование гормонов как фактор патогенности	57
7.5. Образование центров кристаллизации льда	59
Тема 8. Иммуитет растений и определяющие его факторы	60
8.1. Горизонтальная и вертикальная устойчивость	60
8.2. Теория «ген-на-ген»	62
8.3. Элиситоры и супрессоры	66
Тема 9. Механизмы устойчивости растений	75
9.1. Фитоалексины	75
9.2. PR-белки	78
9.3. Протеолитические ферменты и их ингибиторы	79
9.4. Оксипролин-богатые белки	82
9.5. Фенилпропаноиды и лигнин как защитные вещества растений	84

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ	
Тема 1. Отбор образцов для анализа	86
Тема 2. Некоторые типы питательных сред для выделения фитопатогенных бактерий.....	89
2.1. Среды для выделения и культивирования большинства фитопатогенных бактерий	89
2.2. Селективные среды	90
Тема 3. Определение наличия факторов патогенности.....	91
Тема 4. Изучение физиолого-биохимических свойств бактерий	93
Темы рефератов для контролируемой самостоятельной работы студентов.....	107
ПРИЛОЖЕНИЕ	108

Учебное издание	Подписано в печать 12.12.2005. Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Гарнитура SchoolBook. Печать офсетная. Усл. печ. л. 6,74. Уч.-изд. л. 6,4. Тираж 100 экз. Зак.
Желдакова Римма Анатольевна Мямин Владислав Евгеньевич	

ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ	Белорусский государственный университет. Лицензия на осуществление издательской деятельности № 02330/0056804 от 02.03.2004. 220050, Минск, проспект Независимости, 4.
Учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета специальности 1-31 01 01 «Биология»	Отпечатано с оригинала-макета заказчика. Республиканское унитарное предприятие «Издательский центр Белорусского государственного университета». Лицензия на осуществление полиграфической деятельности № 02330/0056850 от 30.04.2004. 220030, Минск, ул. Красноармейская, 6.
Редактор <i>А. П. Чернякова</i> Художник обложки <i>Е. П. Протасеня</i> Технический редактор <i>Т. К. Раманович</i> Корректор <i>Г. М. Добыш</i> Компьютерная верстка <i>А. А. Микулевича</i>	