

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ *PSEUDOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В БЕЛАРУСИ

Чэнь Паньшэнь

Белорусский государственный университет, г. Минск;

85860828@qq.com;

науч. рук. – А.Г.Песнякевич, канд. биол. наук, доц.

Этот эксперимент направлен на 19 штаммов, собранных в Беларуси и депонированных на кафедре микробов биологического факультета Белорусского государственного университета, для определения принадлежности этих штаммов к фитопатогенным бактериям. Эти 19 штаммов были предварительно идентифицированы как штаммы *Pseudomonas* перед экспериментом. Этот эксперимент включает изучение физиологических и биохимических характеристик и характеристик 19 штаммов, а также оценку инфекционного статуса некоторых штаммов на тканях и растениях восприимчивых растений (картофеля, томатов и табака). Принадлежность штаммов 46-2 и 67-2 к виду *Ralstonia solanacearum* подтверждена не только по физиологическим - биохимическим характеристикам, но и на молекулярном уровне. Штаммы 3-2, 36, 46-2, 67-2, 99 и 100 принадлежат к расе 3 дикого типа (F.) *Ralstonia solanacearum*. Штаммы 92 и 96 принадлежат к штаммам варианта (Op.) *Ralstonia solanacearum*, Из которых штамм 96 все еще обладает патогенной способностью штамма расы 1. Штаммы 84 и 87-2 не относятся к виду *Ralstonia solanacearum*, но являются фитопатогенами бактериями. Штаммы 4-7, 4-8, 32-2, 94 не относятся к фитопатогенным бактериям, а штаммы 4-7 и 94 предположительно относятся к *Pseudomonas fluorescens*. Классификация штаммы 85, 87-1, 91 и 95-2 до сих пор неясна, некоторые экспериментальные результаты показывают, что 87-1, 91 можно предположительно к виду *Ralstonia solanacearum* дикого типа (F.), но для окончательной идентификации необходимы дополнительные исследования.

Ключевые слова: фитопатогенные бактерии, штамм *Pseudomonas*, *Ralstonia solanacearum*, картофель, томат, табак.

Картофель, который является четвертой по значимости экономической культурой в мире и одной из основных экономических культур в Беларуси, не должен подвергаться влиянию различных факторов. Некоторые бактериальные патогены растений, которые могут инфицировать растения пасленовых и вызывать болезни растений, могут вызвать серьезное сокращение производства культур пасленовых, включая картофель, и вызвать серьезные экономические потери. Во избежание снижения урожайности и экономических потерь, вызванных болезнями растений, скрининг и идентификация собранных патогенных микроорганизмов является важным шагом в профилактике эпидемий сельскохозяйственных культур. В коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии имеются штаммы фитопатогенных бактерий, выделенных из поврежденных с/х растений на территории Беларуси. Не

все эти штаммы идентифицированы до вида. Видовая идентификация важна для дальнейшей разработки методов быстрого определения возбудителей в случае возникающих эпифитотий и порчи хранящихся овощей и фруктов. В задачу исследования входила видовая идентификация штаммов, предположительно отнесённых к группе *Pseudomonas*, по физиолого - биохимическим и молекулярно - биологическими критериям.

Использованные в работе штаммы были сняты с полужидкой питательной среды для хранения штаммов, и посеяны на картофельную агаризованную среду (среда КА), с целью получения изолированных колоний, и культивировали при 28 °С в течение примерно 48 часов. Затем выбрали по одной колонии каждого штамма и расселяли до изолированных колоний на такой же среде. В результате оценки роста штаммов на КА, было установлено, что часть штаммов формируют мелкие колонии даже при 48 - часовом культивировании. И поэтому было решено изменить среду культивирования на среду РУА. Каждый раз штаммы культивировали при 28 °С в течение 36 часов. Анализ роста бактерий анализируемых штаммов на среде РУА, содержащей дрожжевой экстракт и пептон, позволил разделить штаммы на несколько типов по морфологии и текстуре колоний: (1) Штаммы первого типа (тип I), образуют изолированные колонии, диаметр которых не превышает 1 мм. Консистенция колоний позволяет легко снимать их с поверхности агара бактериальной петлёй. (2) Штаммы второго типа (тип II), образуют колонии диаметром от 2 до 5 мм. Колонии более слизистые, чем колонии типа I. При снятии бактериальной петлёй колонии не отделяются от поверхности агара. (3) Штаммы третьего типа (тип III), образуют колонии диаметром от 3 до 5 мм, но выделяют гораздо большее количество слизи, чем колонии типа II. При снятии бактериальной петлёй трудно отделить колонию от агара из-за большого количества слизи. Рост штаммов на среде РУА очень нестабилен и очень чувствителен к концентрации питательных веществ в среде. и очень легко дико расти на поверхности среды. Результаты определения морфологических характеристик колоний и бактериальных клеток, проведенное при микроскопировании препаратов «раздавленная капля» и препаратов, окрашенных по методу Грама, подвижность бактерии анализировали входе преживненного микроскопирования в фазовом контрасте. (табл. 1)

Среди 19 штаммов протеазная активность штаммов 4-7, 4-8 и 84 была значительно выше, чем у других штаммов, тогда как у штаммов 3-2, 85, 94, 95-2 и 98 к 100. она была невысокой, а штамм 94 вообще не обладает протеазной активностью. Результаты культивирования 19 штаммов с использованием среды с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) и

посева на полипектатный гель показали отсутствие целлюлолитической и пектолитической активностей у всех исследованных штаммов, в то время как контрольный штамм *Pectobacterium carotovorum* штамма D3310 проявлял эти активности в ходе таких экспериментов. Анализ способности исследуемых штаммов утилизировать лактозу и глюкозу образованием кислоты показал, что ни один из 19 штаммов не может использовать лактозу в качестве источника энергии. Из экспериментальных результатов на рисунке 5 видно, что все 19 штаммов могут использовать глюкозу в качестве источника энергии в разной степени, но только штамм 85 может полностью ферментировать глюкозу с образованием кислоты, штаммы 4-7, 4-8, 32-2 также могут использовать глюкозу, но цвет среды все еще слегка пурпурный, что указывает на то, что эти три штамма имеют неполное сбраживание глюкозы. Остальные штаммы не ферментируют глюкозу в жидкой среде с бромкрезоловым пурпурным. мало влияют на ферментацию глюкозы, что очень очевидно, из которых штаммов 36, 46- 2, 67-2, 94 и 100 не могут сбраживать глюкозу с образованием кислоты, но способны утилизировать её другим путём. Выращенные на среде CPG на жидкие культуры были проанализированы на способность флюоресцировать при освещении UV светом. Штаммы 4-7 и 94 давали очень явную синезеленую флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. В этой ситуации я объясню свое мнение, когда сообщу о результатах 19 штаммов штаммов, культивируемых на селективной среде. (табл.1)

Таблица 1

Морфологические характеристики исследуемых штаммов.

Штамм ов	Окраска по Граму	Морфология	Подвижность	Тип колонии	Протеазной	Целлюлозной	Пектатной	Лактозы	Глюкозы	Флуоресценция
3-2	G ⁻	палочка	++	II (III?)	++	-	-	-	+	-
4-7	G ⁻	палочка	+++	I	++++	-	-	-	++	+
4-8	G ⁻	палочка	+++	I	++++	-	-	-	++	-
32-2	G ⁻	палочка	+++	I	+++	-	-	-	++	-
36	G ⁻	палочка	++	II	+++	-	-	-	+	-
46-2	G ⁻	палочка	++	III	+++	-	-	-	+	-

Штамм ов	Окр аска по Гра му	Морфо логия	Подви жность	Тип коло нии	Про теаз ной	Цел люл азно й	Пект атле азно й	Лакт озы	Глю коз ы	Флу орес цен ция
67-2	G ⁻	палочк а	++	III	+++	-	-	-	+	-
84	G ⁻	палочк а	+++	I (II?)	++++	-	-	-	+	-
85	G ⁻	палочк а	++	I	+	-	-	-	+++	-
87-1	G ⁻	палочк а	++	II	++	-	-	-	+	-
87-2	G ⁻	палочк а	++	II	++	-	-	-	+	-
91	G ⁻	палочк а	++	II	++	-	-	-	+	-
92	G ⁻	палочк а	++	I	++	-	-	-	+	-
94	G ⁻	палочк а	+	I	-	-	-	-	-	+
95-2	G ⁻	палочк а	+	I	+	-	-	-	+	-
96	G ⁻	палочк а	++	I	++++	-	-	-	+	-
98	G ⁻	палочк а	++	II	+	-	-	-	+	-
99	G ⁻	палочк а	+	III	+	-	-	-	++	-
100	G ⁻	палочк а	+	III	+	-	-	-	+	-
контро ль	G ⁻	палочк а			+	+	+	-	-	-

Примечание G⁻ - Грамотрицательный «+» - есть активности; «-» - отрицательный результат.

Результаты культивирования 19 штаммов с использованием среды ТТС, Штаммы 32-2, 36, 46-2, 67-2, 87-1, 87-2, 91, 98, 99 и 100 образовывали очень заметные белые слизистые колонии на среде, штамм 3-2 образовывал меньшее количества слизи, колонии штамма 96 не имели слизитой морфологии. Разница между ними и другими штаммами, которые не образовывали колоний с белой слизью, заключается в том, что центральная часть колонии имела красную

окраску, а периферия - белую. Согласно [1] модифицированная среда SMSA может быть использована как селективная при выделении *Ralstonia solanacearum* из природных источников. Присутствие в среде антибиотиков, TTC и кристаллического фиолетового не препятствует росту не *Ralstonia solanacearum*, но ограничивает размножение бактерий других видов. Исходя из этого было проведено культивирование исследуемых нами штаммов в модифицированной среде SMSA. В качестве контроля помимо использования штамма D3310 *Pectobacterium carotovorum* в были добавлены бактерии двух видов: *Pseudomonas putida*, М и *Pseudomonas fluorescens*.(табл. 2)

Таблица 2

Рост исследуемых бактерий в модифицированной среде SMSA

Штамм	рост	Штамм	рост
3-2	++	91	-
4-7	-	92	++
4-8	-	94	-
32-2	-	95-2	-
36	++	96	++
46-2	++	98	-
67-2	+	99	++
84	-	100	++
85	-	<i>P. carotovorum</i>	-
87-1	-	<i>P. putida</i> , М	-
87-2	-	<i>P. fluorescens</i>	-

Примечание: рост всех штаммов в среде без антибиотиков, ТТХ и кристаллвиолета -- +++++.

Результаты определения мацерирующей активности бактерии на ломтиках клубней картофеля, По результатом этой серии экспериментов штаммы разделились на три типа: первый тип при заражении штаммами первого типа ломтик картофеля становился полностью мягким, вокруг ломтика регистрировалось желтое слизеподобное вещество, поэтому данный тип был обозначен как тип **Y** (yellow). Второй тип вызывал мацерацию центральный части ломтиках, но внешняя стенка оставалась неповрежденной **M** (middle). Третий тип: в ломтиках клубней картофеля вообще нет повреждений, что обозначается знаком «-». Мацерция ломтика, вызванная контрольным штаммом *Pectobacterium carotovorum* D3310 не сопровождается выделением желтой слизи и обозначена **W**

(white). Заражение целостных клубней картофеля показало деление на 4 типа: Первый тип: ткань картофеля мягкая и гнилая, имеет белый цвет, зона мацерации имеет размер 2 - 3 см. Такое повреждение характерно для клубней, зараженных контрольным штаммом *Pectobacterium carotovorum* D3310, поэтому этот тип был обозначен С (control). Второй тип: гниль имеет коричневый цвет и жидкую консистенцию, и размер зоны мацераций не превышает 1 см Гниль не распространилась внутри клубень картофеля в период наблюдения (48 часов). такие повреждения были обозначены как тип В (brown). Третий тип: стенки вырезанной лунки имеют коричневый цвет, мацерация отсутствует, идет отмирание клеток по пути опробковения. В этом эксперименте эта метка S (suberenization)-типа. Четвертый тип: у картофеля, инокулированного штаммами, нет изменений в засеянной части или во всем клубне картофеля. В этом эксперименте такой знак - «-», это непатогенные бактерии, не относящиеся к картофелю. Результаты инокуляции штаммов в листья табака показаны, среди 10 штаммов, выбранных для инокулирования в листьях табака, штаммы 84, 87-2 и 96 вызвали наиболее серьезное повреждение, которое непосредственно вызвало высыхание инокулированного участка на листьях табака. Штаммы 3-2, 36, и 46 - 2, 67-2 и 87-1 вызывают пожелтение в листа табака в месте введения. Лист, инокулированный бактериями штаммов 87-1 и 87-2 полностью пожелтел на 12 день после заражения. Это подтверждает принадлежность штамма 96 к расе 1 *Ralstonia solanacearum*, так как согласно [2] бактерии этой расы поражают и картофель, и табак. Четыре штамма 3-2, 36, 46-2 и 67-2 вызывали слабое пожелтение в соответствующей зоне инокуляции на листьях табака, но они не вызывали некроза и высыхания. Другими словами, эти четыре штамма не являются патогенами, которые могут вызывать поражение табака. Они также подтверждают предыдущее предположение о том, что они принадлежат к штамму к расе 3 *Ralstonia solanacearum* (табл. 3). И результаты, проведенные на растение томатов, показали, что все 10 штаммов являются патогенными для томата. Заражение вегетирующих стеблей картофеля показало, что наиболее патогенным является штамм 36, зараженное растение по гибло через месяц после инокуляции. Штамм 46-2 вызывал пожелтение нижних листьев, но растение сохраняло жизни способность. Отмирание листьев также наблюдалось при инфицировании штаммом 98, но в меньшей степени. Остальные штаммы не вызывали поражения вегетирующих стеблей картофеля.

Таблица 3

Результаты определения мацерирующей активности и влияние микроорганизмов на листья табака

Штамм	Клубень картофеля		Степень поражение листа		
	Ломтики	Целый		Ломтики	Целый
3-2	Y	B	-	+	-
4-7	-	-			
4-8	-	-			
32-2	-	-			
36	Y	B	-	++	-
46-2	M	B	-	+++	-
67-2	Y	B	-	++	-
84	Y	S	-	-	+++
85	-	-			
87-1	Y	-	-	++	-
87-2	Y	B	-	-	+
91	M	S			
92	-	S			
94	-	-			
95-2	-	S			
96	M	S	-	-	++
98	M	-	+	-	-
99	-	S			
100	M	-	+	-	-
Контроль	W	C			

Примечания: контроль - *Pectobacterium carotovorum*, D. 3310.

Таким образом, принадлежность штаммов 46-2 и 67-2 к виду *Ralstonia solanacearum* подтверждена не только по физиолого - биохимическим характеристика, но и на молекулярном уровне. Штаммы 3-2, 36, 46-2, 67-2, 99 и 100 принадлежат к расе 3 дикого типа (F.) *Ralstonia solanacearum*. Штаммы 92 и 96 принадлежат к штаммам варианта (Op.) *Ralstonia solanacearum*, Из которых штамм 96 все еще обладает патогенной способностью штамма расы 1. Штаммы 84 и 87-2 не относятся к виду *Ralstonia solanacearum*., но являются фитопатогенами бактериями.

Штаммы 4-7, 4-8, 32-2, 94 не относятся к фитопатогенным бактериям, а штаммы 4-7 и 94 предположительно относятся к *Pseudomonas fluorescens*. Классификация штаммы 85, 87-1, 91 и 95-2 до сих пор неясна, некоторые экспериментальные результаты показывают, что 87-1, 91 можно предположительно к виду *Ralstonia solanacearum* дикого типа

(F.), но для окончательной идентификации необходимы дополнительные исследования.

Библиографические ссылки

1. Хикари Хорита: *Ralstonia solanacearum* / Хикари Хорита, Кеничи Цучия //MAFF Microorganism Genetic Resources Manual - 2012 - Vol.12, №.2.
2. Zeng Guoqin: Diagnosis and Identification of Important Plant Bacterial Diseases / Zeng Guoqin, Xu Shidian // Special Issue of Seminar on Diagnosis and Identification Technology of Important Plant Disease Prevention and Quarantine. - Vol.2 - p.95-115.