

ЛИТЕРАТУРА

1. Хотько, Э.И. Атлас насекомых – вредителей лесных пород Беларуси/ Э.И. Хотько, Я.И. Марченко, Т.М. Шаванова - Мн.: ГП «Минская печатная фабрика», 1999. – 128 с.
2. Воронцов, А.И. Лесная энтомология: учебник для вузов/ А.И. Воронцов. - М.: Экология, 1995. – 362 с.
3. Ильинский, А.И. Определитель вредителей леса/ А.И. Ильинский. – М.: Сельхозиздат, 1962. – 392 с.
4. Падутов, А.Е. Состояние популяции непарного шелкопряда и факторы его смертности в Лоевском очаге вредителя в 1996 – 2000 годах/ А.Е. Падутов, Н.А. Падутова, Г.М. Емельянчик, А.Е. Силин// Проблемы лесоведения и лесоводства: Сборник научных трудов ИЛ НАН Беларуси. Вып 52. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2001. – С. 191 – 198.
5. Падутов, А.Е. Реакция популяции непарного шелкопряда на насыщение воздуха синтетическим половым феромоном / А.Е. Падутов, Н.С. Блинова, Е.Н. Усанова // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сборник научных трудов ИЛ НАН Беларуси. Вып 68. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2008. – С. 529 – 533.
6. Дубко, Л.А. Биологические основы культивирования некоторых видов волнянок: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.А. Дубко; Московский госуниверситет леса. – М., 1995. – 22 с.
7. Новикова, Л.К. Непрерывное культивирование листогрызущих вредителей/ Л.К. Новикова, А.П. Бирюкова, Л.Н. Солонкина, Ю.А. Масюк// Тез. докл. II Всесоюзной конф. по промышленному разведению насекомых, 1989. – С. 91 – 92.
8. Монастырский, А.Л. Массовое разведение насекомых для биологической защиты растений: справочник/А.Л. Монастырский, В.В. Горбатовский. – М.: Агрпромиздат, 1991. – 240 с.



УДК 630*165.3

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВОДЯНКИ РАЗЛИЧНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

Пантелеев С.В.¹, Ярмолович В.А.², Баранов О.Ю.¹

Институт леса НАН Беларуси¹

УО «Белорусский государственный технологический университет»²

Бактериальная водянка (бактериальный мокрый рак) — заболевание бактериальной природы, поражающее многие растительные виды [1]. Внешними признаками болезни являются образование на коре стволов и ветвей тёмных мокнущих пятен, а затем и трещин, из которых вытекает вначале прозрачная,

а затем желтовато-бурая или черноватая жидкость, содержащая бактерии. Поражённые участки ствола насыщаются жидкостью, газами и в итоге изъязвляются. По результатам проведенного детального фитопатологического обследования лесных насаждений нашей республики выявлено значительное количество пораженных бактериальной водянкой насаждений березы и некоторых других лиственных пород [2].

Основными возбудителями бактериальной водянки являются бактерии родов *Erwinia* [Winslow *et al.* 1920, цит. по 3] и *Pseudomonas* (Migula 1894), относящиеся к семейству энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*). Представители данных родов являются аэробными и анаэробными гетеротрофами, представляющие собой грамотрицательные палочковидные подвижные бактерии [3].

Ранее для установления видовой принадлежности инфекций использовали в основном микроскопический метод. Получаемые данные о природе возбудителя зачастую были неоднородны и противоречивы. Проведение достоверного анализа пораженных растительных тканей или почвенных образцов было затруднено в связи с присутствием в собранном материале деградированных клеток, чужеродных примесей, структур и др. Решением данной проблемы явился подход получения и анализа чистых культур патогена, которые создавались путем изоляции инфекционного агента из собранного материала и культивированием его в лабораторных условиях на специальных питательных средах. К недостаткам метода чистых культур можно отнести длительность исследований, их трудоемкость и отсутствие специфических сред для каждого конкретного вида. Особые требования предъявляются также и к уровню квалификации персонала проводящих культивирование и определение микроорганизмов.

Современным решением в данном направлении явилось использование молекулярно-генетической диагностики. Методы ДНК-анализа позволили провести генотипирование большого количества различных видов фитопатогенов, по результатам которого были выявлены их генетические особенности и разработаны методы идентификации [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для экспериментального анализа был собран на природных насаждениях Логойского, Минского и Пуховичского лесхозов.

В исследованных объектах были отобраны образцы с пораженных бактериальной водянкой деревьев березы (*Betula pendula* Roth.), лещины (*Coryllus avellana* L.) и ивы (*Salix sp.* L.) в виде фрагментов луба, листьев и бактериальной жидкости.

После сбора материала был произведен посев в чашках Петри на мальто-агаровую питательную среду [5].

Для идентификации полученных штаммов проведена молекулярно-генетическая диагностика, состоящая из следующих этапов: выделение суммарной ДНК; амплификация фрагмента гена 16S рРНК методом ПЦР (поли-

меразная цепная реакция); ПДФ-анализ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) ампликонов и секвенирование.

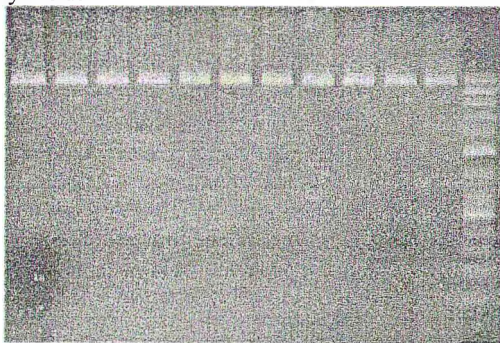
Выделение суммарной ДНК бактерий проводилось методом лизирования при 95°C в течение 5 минут образцов колоний размером 1мм² отобранных с чашек Петри в 400 мкл 1×TE-буфера. После центрифугирования полученный супернатант отбирался и в дальнейшем использовался для ПЦР-анализа. Данный подход характеризовался быстротой выполнения, незначительным количеством операций и как следствие минимальной вероятностью занесения загрязнения извне.

Для амплификации фрагмента гена 16S рНК были использованы праймеры U1 (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') и U2 (5'-ATCGG(C/T)TACSTTGTTCGACTTC-3'). В ходе исследования была использована ПЦР-смесь на основе Taq-ДНК полимеразы (Fermentas, Литва), составленная согласно инструкции фирмы-изготовителя. Программа проведения ПЦР описана в работе для ампликонов 500-2000 п.о. [6]. Рестрикционный анализ проводился с использованием рестриктаз AluI, RsaI, MspI (Fermentas, Литва), согласно рекомендациям фирмы-изготовителя.

Электрофоретическое фракционирование полученных продуктов рестрикции проводилось в 2% агарозном и 6% полиакриламидном геле по стандартной методике [4]. Секвенирование ампликонов было проведено с помощью генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США) согласно методике компании-производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе проведения реакции амплификации гена 16S рНК бактериальной ДНК получен однофракционный спектр с зоной ампликации, размером ≈ 1000 п.о., что согласуется с литературными данными по диагностике бактерий с использованием праймеров данной структуры [6]. ПЦР-спектр представлен на рисунке 1.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Рисунок 1 – ПЦР-спектры образцов при использовании праймеров U1 и U2. Образцы: 1-4, 7,9-11 – береза повислая; 5,8 – лещина обыкновенная; 6 – ива.

Проведение видовой идентификации бактерий на данном этапе анализа не представлялось возможным, поскольку все образцы имели сходную электрофоретическую подвижность, в отличие от аналогичного метода идентификации грибов по различным локусам рДНК [7]. Следует отметить, что наряду со специфической зоной (≈ 1000 п.о.) во всех образцах присутствовала слабоокрашенная зона размером ≈ 150 п.о. [6], не оказывающая влияние на проведении дальнейшей идентификации.

На следующем этапе работы было проведено сравнение рестрикционных спектров ампликонов, отражающих видовую принадлежность образцов. Фрагмент RFLP-спектра представлен на рисунке 2.

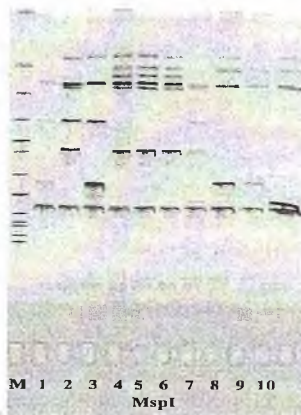


Рисунок 2 – Фрагмент RFLP-спектра образцов при использовании рестриктазы *MspI*.

Из рисунка 2 видно, что идентичные спектры имеют образцы: 1 и 3; 4, 5 и 6; 2 и 7; 8 и 9, что свидетельствует об их генетической идентичности. При этом образец 10 характеризуется отличным от других образцов спектром. Аналогичные результаты были получены при сравнении рестрикционных спектров образцов с эндонуклеазами *AluI* и *RsaI*.

С целью установления видовой принадлежности бактерий в исследуемых образцах на следующем этапе проводилось определение нуклеотидных последовательностей с помощью метода секвенирования. Для секвенирования были выбраны образцы, представляющие альтернативные группы по результатам ПЦР-ПДРФ анализа. В качестве примера на рисунке 3 приведен фрагмент секвенирования гена 16S рРНК изученных возбудителей бактериальной водянки.

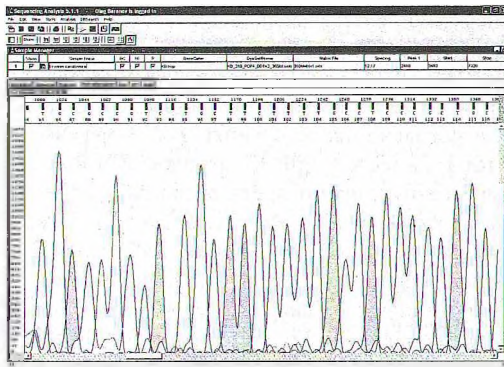


Рисунок 3 – Фрагмент нуклеотидной структуры гена 16S рРНК образца №5.

На основании анализа полученных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК в базе данных Генного банка NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) были идентифицированы следующие виды:

В исследуемых образцах пораженного луба березы повислой (*B. pendula* Roth.) была выявлена бактерия имеющая генетическое сходство на 98% с *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (идентификационный номер AF373182.1). Данный подвид впервые был классифицирован в 1902 Ван Халлом (van Hall). В литературных источниках встречается также под синонимами: *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall 1902) Dye 1969, "*Bacillus atrosepticus*" (van Hall 1902), "*Erwinia atroseptica*" (van Hall 1902) Jennison 1923, "*Bacterium atrosepticum*" (van Hall 1902) Lehmann and Neumann 1927, "*Pectobacterium atrosepticum*" (van Hall 1902) Patel and Kulkarni 1951, "*Bacterium carotovorum* var. *atrosepticum*" Hellmers and Dowson 1953, "*Pectobacterium carotovorum* var. *atrosepticum*" Hellmers and Dowson 1957, "*Erwinia carotovora* var. *atroseptica*" (Hellmers and Dowson 1953) Dye 1969. *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall 1902) Gardan *et al.* 2003, comb. nov. [8, 9, 10].

В образцах, содержащем фрагменты луба, взятые с пораженной бактериальной водянойкой березы (*B. pendula* Roth.) на другом исследуемом объекте был выявлен вид, имеющий генетическое сходство на 99% с *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901) Hauben *et al.* 1999 (идентификационный номер FJ527481.1). В 1901 году впервые подвид классифицировал Джонс (Jones), но в настоящее время чаще употребляется название *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones 1901) Bergey *et al.* 1923 [8, 11, 12]. *Erwinia carotovora* (van Hall) была впервые выделена из моркови, в связи с чем и получила свое название. Разногласия в систематическом положении и отнесении видов к разным родам связаны с рядом проведенных исследований по анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Ранее несколько

видов эрвиний выделялись в отдельный род *Pectobacterium*, но к концу 90-х годов прошлого века этот род перестал использоваться [3]. В 1998 году на основании изучения 16S рРНК Хаубен с соавторами предложил восстановить род *Pectobacterium* и отнести к нему ряд подвидов *E. carotovora* (как *P. carotovorum*) [13]. А согласно исследованиям полиморфизма длины рестриционных фрагментов гена *recA* 16SpРНК методом RFLP-анализа в 2002 году Małgorzata Waleron с сотрудниками предложено разделение рода *Erwinia* на четыре: *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea* и *Brenneria*. В род *Erwinia* были включены шесть видов: *E. amylovora*, *Erwinia mallotivora*, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii*, *Erwinia rhapontici* и *Erwinia tracheiphila* по Hauben *et al.* (1999). В род *Pectobacterium* – четыре подвида: *Erwinia carotovora*, а также виды *E. chrysanthemi*, *Erwinia cacticida* и *Erwinia cypripedii*. Шесть видов эрвиний: *Erwinia alni*, *Erwinia nigrifluens*, *Erwinia paradisiaca*, *Erwinia quercina*, *Erwinia rubrifaciens* и *Erwinia salicis*, отнесены к новому роду *Brenneria*. Еще пять, ранее отнесенные к роду *Erwinia*, классифицированные как *Erwinia ananas*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*, *Erwinia stewartii* и *Erwinia uredovora* – к роду *Pantoea* и генотипированы по Waleron *et al.* [14]. В настоящее время для видов спорного таксономического положения используются оба синонима, а классификация рода *Erwinia* продолжает пересматриваться [14]. Выявленные подвиды *Erw. carotovora* вызывают бактериальную гниль овощных культур (картофеля, моркови, огурцов, помидоров, капусты и др.) и многих других растений, называемые чёрная ножка (подвид *E. c. subsp. carotovora*) и мягкая гниль (подвид *E. c. subsp. atroseptica*). Подвиды различаются по симптоматике вызванного заболевания и оптимальной температуре развития. *E. c. subsp. carotovora* развивается при температуре ниже 18°C и вызывает симптом «чёрных чернил», в то время как *E. c. subsp. atroseptica* — выше 18°C и данного симптома не вызывает. Оба подвида поражают как надземные части растения, так и подземные, в том числе и клубни, вызывая потемнение и гниение тканей, скручивание и пожелтение листьев [15].

В образце бактериальной жидкости, собранной с потеков на стволах березы повислой (*B. pendula* Roth.), выявлен вид генетически сходный по генной базе данных NCBI с *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895 на 98,5% (идентификационный номер AM933520.1). В литературе встречается также иные синонимы данного вида: "*Bacillus fluorescens liquefaciens*" Flüggé 1886, "*Bacillus fluorescens*" Trevisan 1889, "*Bacterium fluorescens*" (Trevisan 1889) Lehmann and Neumann 1896, "*Liquidomonas fluorescens*" (Trevisan 1889) Orla-Jensen 1909 [8, 16]. *Ps. fluorescens* Migula является антагонистом фитопатогенных микроорганизмов, в частности возбудителей корневой гнили [17]. Существуют данные, свидетельствующие о выделении *Ps. fluorescens* Migula из некротических пятен на стволах березы и ее антогонистическом влиянии на развитие мицелия трутовика березового *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) Karst. [18]. При этом некоторые исследования на томатах свидетельствуют о том, что *Ps. fluorescens* Migula не оказывает подавляющего воздействия на развитие *Erw. carotovora* (Jones) Bergey *et al.* [19].

Из образца пораженного луба лещины обыкновенной (*Coryllus avellana* L.) выделен вид на 98% сходный с *Erwinia persicina* corr. Hao *et al.* 1990, sp. nov. (идентификационный номер DQ217659.1) [20]. *E. persicina* впервые была идентифицирована в провинции Гранада (Испания) в листьях гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с симптомами хлороза [21]. Оригинальное видовое название *persicinus* было исправлено на *persicina* Euzéby в 1998 году [22]. Согласно Бреннеру (Brenner *et al.* 1994), наименование *Erwinia persicina* является синонимом идентифицированной ранее *Erwinia nulanidii* Schuster *et al.* 1981, но последнее так и не было утверждено в номенклатуре [23].

Из листьев березы (*B. pendula* Roth.), пораженной бактериальной водяной выделен не описанный ранее вид идентичный с *Pseudomonas* sp., представленный в базе данных NCBI (идентификационный номер EU140959.1).

В целом в ходе проведенной работы были выявлены четыре вида бактерий относящихся к родам, представители которых вызывают паренхиматозные бактериозы лесных пород, в частности, бактериальную водянку или мокрую гниль [1]. Полученные результаты будут включены в молекулярно-генетическую базу данных патогенов Беларуси, для разработки системы ранней диагностики и идентификации патогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лесная энциклопедия: В 2-х т. / Гл. ред. Воробьев Г.И.; Ред. кол.: Анучин Н.А., Атрохин В.Г., Виноградов В.Н. и др. – М.: Сов. энциклопедия, 1985. – 563 с., ил.
2. Перечень разработок, выполненных с участием студентов вузов Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – 2007. – Режим доступа: <http://www.sws.bsu.by/Diplomi/2007/Перечень%20разработок%20по%20основному%20министерству.pdf>. – Дата доступа: 19.03.2009.
3. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с.
4. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
5. Гусев, М. В. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – 4-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
6. Use of PCR with Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid / Jang-Jih Lu [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2000. – v.38(6). – P. 2076–2080.
7. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds.: Innis, M. A. [et al.]. – New York: Academic Press, Inc., – 1990. – P. 315-322.

8. Approved Lists of Bacterial Names / eds.: V.B.D. Skerman, V. McGowan, P.H.A. Sneath // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1980. – v.30. – P. 225-420.
9. van Hall, C.J.J. Bijdragen tot de kennis der Bakterieele Plantenziekten. Inaugural Dissertation Amsterdam / C. J. J. van Hall. – 1902. – 198 p.
10. Dye, D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The "carotovora" group / D.W. Dye // *New Zealand Journal of Science.* – 1969 – v.12 – P. 81-97.
11. Jones, L.R. *Bacillus carotovorus* n. sp., die Ursache einer weichen Faulnis der Mohre. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II* / L.R. Jones. – 1901 – v.7 – P. 12-21.
12. Bergey, D.H. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st ed. / eds.: D.H. Bergey [et al.]. – The Williams & Wilkins Co, Baltimore, – 1923. – 1-442 pp.
13. Hauben, L. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae / L. Hauben [et al.] // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1998. – v.21 – P. 384-397.
14. Małgorzata Waleron. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment / Waleron Małgorzata [et al.] // *Microbiology.* – 2002 – v.148 – P. 583–595
15. Билай, В.И. Микроорганизмы - возбудители болезней растений / В.И. Билай [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1988. – 552 с.
16. Migula, W. *Bacteriaceae* (Stabchenbakterien). / W. Migula. In: A. ENGLER and K. PRANTL (eds): *Die Naturlichen Pflanzenfamilien*, W. Engelmann, Leipzig, Teil I, Abteilung Ia, 1895 – P. 20-30.
17. Романенко, Н.Д. Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов / Н.Д. Романенко [и др.]. АГРОХХI, 2008, № 1-3 – С. 23-25
18. Przyby, K., ZobinBraska-Podejma, M. Effects of some bacteria (*Pseudomonas* spp. and *Erwinia herbicola*) on *in vitro* growth of *Piptoporus betulinus* / K. Przyby, M. ZobinBraska-Podejma // *Forest Pathology.* –2000 – v.30 – P. 321–328
19. Gross, D. C. Maximizing rhizosphere populations of fluorescent pseudomonads on potatoes and their effects on *Erwinia carotovora* / D. C. Gross // *American Journal of Potato Research.* – 1988 – v.65(12) – P. 697-710.
20. Hao, M.V. *Erwinia persicinus*, a new species isolated from plants / M.V. Hao // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1990 – v.40 – P. 379-383.
21. Gonzblez, A. J. *Erwinia persicina* Causing Chlorosis and Necrotic Spots in Leaves and Tendrils of *Pisum sativum* in Southeastern Spain / A. J. Gonzblez // *Plant Dis.* – 2007 –v.91 – P. 460.
22. Euzéby, J.P. Taxonomic note: necessary correction of specific and sub-specific epithets according to Rules 12c and 13b of the International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision) / J.P. Euzéby // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1998 – v.48 – P. 1073-1075.
23. Brenner, D.J. "*Erwinia nulandii*" is a subjective synonym of *Erwinia persicinus* / D.J. Brenner // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1994 – v.44 – P. 282-284.