

У. В. Фальковская, А. В. Сидоренко, Г. И. Новик

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВИДОВОЙ СОСТАВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИОЗОВ ТОПИНАМБУРА

На основании изучения морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также данных анализа нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК, определена таксономическая принадлежность 21 культуры фитопатогенных бактерий, изолированных из клубней топинамбура с признаками бактериоза. Исследуемые штаммы идентифицированы как *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp., *Ewingella americana*, *Xanthomonas* sp., *Rahnella* sp. Показано, что анализируемые бактериальные культуры продуцируют ряд внеклеточных ферментов (протеаз, целлюлаз, липаз, амилаз), участвующих в развитии бактериозов у растений.

Ключевые слова: бактериозы, топинамбур, физиолого-биохимическая идентификация, молекулярно-генетическая идентификация, ген *16S* рРНК, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae.

U. V. Falkouskaya, A. V. Sidarenka, G. I. Novik

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

TAXONOMIC COMPOSITION OF THE JERUSALEM ARTICHOKE BACTERIOSIS AGENTS

Taxonomic affiliation of the 21 phytopathogenic bacterial cultures isolated from the Jerusalem artichoke tubers with signs of bacteriosis was established based on results of examination of morphological and physiological-biochemical properties and data of *16S* rRNA gene sequence analysis. Examined strains were identified as *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp., *Ewingella americana*, *Xanthomonas* sp., *Rahnella* sp. It was shown that analyzed cultures produce extracellular enzymes (proteases, cellulases, lipases, amylases), involved in the development of bacteriosis in plants.

Keywords: bacteriosis, Jerusalem artichoke, physiological-biochemical identification, molecular-genetic identification, *16S* rRNA gene, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae.

Введение. Топинамбур – вид многолетних травянистых клубненосных растений семейства Астровые (Asteraceae). Данная культура обладает рядом ценных свойств, благодаря которым находит широкое применение в сельском хозяйстве, пищевой и фармацевтической промышленности. В 2012 г. на заседании Совета министров Союзного государства утверждена программа «Инновационное развитие производства картофеля и топинамбура на 2012–2015 годы», в приоритетные задачи которой включены разработка технологий промышленного производства и переработки топинамбура, формирование рынка продуктов здорового питания на основе данного растения. Для успешного возделывания топинамбура необходимым является изучение фитопатогенных бактерий, инфицирующих эту ценную сельскохозяйственную культуру и приводящих к значительным потерям урожая.

Согласно сведениям литературы, наиболее распространенными возбудителями заболеваний топинамбура в США, Австрии, Франции, Японии, КНР, странах Малой Азии, где данная культура занимает значительные площади, являются фитопатогенные грибы родов *Puccinia*, *Sclerotinia*, *Erysiphe*, а также фитопатогенные бактерии родов *Erwinia* и *Pseudomonas* [1]. Сведения о фитопатогенах, инфицирующих топинамбур в Республике Беларусь и странах СНГ, практически отсутствуют.

Цель исследования – изучение видового состава возбудителей бактериозов топинамбура, культивируемого в Республике Беларусь.

Материалы и методы исследования. Объекты исследования – 21 культура бактерий, изолированных из клубней топинамбура с признаками бактериоза. Выделение фитопатогенных бактерий из образцов инфицированных клубней топинамбура проводили по общепринятой методике,

используя следующие питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА) (пептон – 5,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, мясной экстракт – 1,5 г, дрожжевой экстракт – 1,5 г, агар бактериологический – 20,0 г, вода дистиллированная – до 1 л; pH 6,8); картофельный агар (КА) (картофельный отвар – 200 мл, глюкоза – 15,0 г, агар бактериологический – 20,0 г, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8). Анализ сформировавшихся колоний осуществляли через 72 ч культивирования при 28 °С. Чистые культуры бактерий получали путем трехкратного посева изолированных колоний на МПА. Морфологию клеток исследовали с помощью световой микроскопии фиксированных препаратов, окрашенных по методу Грама, используя микроскоп Nikon Eclipse E2000 (Япония). Физиолого-биохимические свойства культур (продукцию каталазы, оксидазы, пигментов) изучали по стандартным методикам. Липолитическую активность исследовали на среде МПА, содержащей твин-80 или твин-20. Амилолитическую активность определяли на среде МПА с добавлением 0,2 % растворимого крахмала. Для выявления целлюлолитических ферментов использовали среду МПА, содержащую целлюлозу (0,1 %). Для определения протеолитических ферментов применяли кальциево-казеиновый агар (Conda).

Хромосомную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Для амплификации нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК применяли праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttacctgttacgactt-3') («Праймтех», Беларусь). Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере Eppendorf Mastercycler epgradientS с использованием активного точного режима регулирования и следующего температурно-временного профиля: денатурация – 5 мин при 94 °С; 30 циклов: 20 с при 94 °С, 20 с при 50 °С, 90 с при 72 °С; достройка цепи – 3 мин при 72 °С; охлаждение до 4 °С. Для очистки амплифицированных фрагментов генов применяли набор MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) согласно прилагаемой инструкции. Реакцию секвенирования проводили, используя набор реагентов для секвенирования DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Разделение и анализ продуктов секвенирования осуществляли с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer. Для сравнительного анализа секвенированных фрагментов генов использовали программу BLAST международной базы данных GenBank [2].

Результаты и их обсуждение. Из клубней топинамбура с признаками бактериального поражения выделена 21 чистая культура бактерий, предположительно являющихся возбудителями инфекционного заболевания.

Изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных культур показало, что они представляют собой грамотрицательные неспорообразующие палочки (аэробы) с окислительным типом метаболизма. Тринадцать штаммов продуцировали каталазу и оксидазу, у семи из них выявлена продукция внеклеточных диффундирующих в среду желто-зеленых и коричневых пигментов, что позволило отнести данные культуры к сем. Pseudomonadaceae. Восемь штаммов являлись оксидазоотрицательными, каталазоположительными, внеклеточных пигментов не образовывали, и на основании перечисленных признаков идентифицированы как представители сем. Enterobacteriaceae.

Проведена молекулярно-генетическая идентификация выделенных культур фитопатогенных бактерий на основании анализа нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК, поскольку данный метод рекомендован в качестве одного из стандартов и признан в авторитетных мировых коллекциях. В результате амплификации на матрице геномной ДНК исследуемых культур с праймерами 8f и 1492r получены ПЦР-продукты размером ~1500 п. н., что соответствует полной нуклеотидной последовательности целевого гена. С помощью секвенирования определена нуклеотидная последовательность проксимального участка (~800 п. н.) амплифицированных фрагментов гена *16S* рРНК, содержащего вариабельную V1–V3 область. На основании данных сравнительного анализа секвенированных последовательностей и референтных нуклеотидных последовательностей из базы данных GeneBank 10 штаммов идентифицированы как *Pseudomonas* sp., 5 – как *Stenotrophomonas* sp., 2 – как *Serratia* sp., 2 – как *Ewingella americana*, 1 – как *Xanthomonas* sp., 1 – как *Rahnella* sp. Полученные результаты свидетельствуют, что возбудителями бактериозов

топинамбура, культивируемого в Республике Беларусь, являются представители семейств Pseudomonadaceae (*Pseudomonas* sp., 48 % выделенных фитопатогенов), Enterobacteriaceae (*Serratia* sp., *Ewingella americana*, *Rahnella* sp., 24 % выделенных культур), Xanthomonadaceae (*Stenotrophomonas* sp., *Xanthomonas* sp., 28 %). Таксономический состав выделенных возбудителей бактериоза топинамбура схож с составом фитопатогенных бактерий, инфицирующих данное растение в других регионах [1]. Результаты исследования подтверждают сведения литературы, согласно которым бактерии родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* являются наиболее распространенными и вредоносными фитопатогенными микроорганизмами, поражающими широкий круг сельскохозяйственных и декоративных культур [3].

Из литературных источников известно, что фитопатогенные бактерии продуцируют такие факторы вирулентности, как токсины, ферменты, растительные гормоны, внеклеточные полисахариды, и индуцируют различные симптомы бактериозов растений: хлорозы, мягкие гнили, гиперплазию клеток, некрозы и увядания. Биохимические исследования показали, что патогенные в отношении растений свойства бактерий являются результатом продукции ряда деполимеризующих ферментов, таких как пектиназы, целлюлазы, протеазы, фосфолипазы и ксиланазы, которые вызывают деградацию компонентов клеточных стенок [4]. С целью выявления факторов патогенности у бактериальных культур, выделенных из пораженных клубней топинамбура, исследована их протеолитическая, липолитическая, амилолитическая и целлюлолитическая активность. По наличию определенной ферментативной активности анализируемые штаммы разделены на шесть групп:

штаммы с протеолитической активностью: 1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 3н-1, 3н-2, 3н-3, 3к-3, 4-2, 4-3, 5-2, 5-3, 5-4, 8-1, 8-3, 8у-1, 9-3, 9-4;

штаммы с целлюлолитической активностью: 4-2, 4-3, 5-4;

штаммы с липолитической активностью (твин-20): 1-2, 1-3, 2-к, 3н-1, 3н-3, 4-2, 4-3, 3к-3, 5-2, 5-4, 8у-1, 9-1, 9-2;

штаммы с липолитической активностью (твин-80): 1-2, 1-3, 2-к, 3н-1, 3н-3, 3к-3, 5-2, 5-3, 5-4;

штаммы с амилолитической активностью: 1-3, 8-1, 9-3;

штаммы с комплексной активностью: 1-3, 4-2, 4-3, 5-4, продуцирующие широкий спектр внеклеточных ферментов, участвующих в развитии симптомов бактериозов у растений, – протеазы, целлюлазы, липазы, амилазы.

Способность исследуемых бактериальных культур продуцировать внеклеточные ферменты, являющиеся факторами фитопатогенности, подтверждает возможность их участия в развитии заболеваний топинамбура.

Выделенные и охарактеризованные культуры фитопатогенных бактерий введены в фонд специализированной коллекции фитопатогенных микроорганизмов, функционирующей на базе Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Данные культуры могут быть использованы в научных исследованиях для изучения механизмов развития бактериозов, разработки диагностических систем для экспресс-идентификации возбудителей болезней и создания средств защиты ценных сельскохозяйственных культур, в первую очередь топинамбура.

Заключение. Из клубней топинамбура с признаками бактериального поражения выделена 21 чистая культура бактерий, предположительно являющихся возбудителями инфекционного заболевания. На основании изучения морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также данных анализа нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК 10 штаммов идентифицированы как *Pseudomonas* sp., 5 – как *Stenotrophomonas* sp., 2 – как *Serratia* sp., 2 – как *Ewingella americana*, 1 – как *Xanthomonas* sp., 1 – как *Rahnella* sp. Показано, что выделенные культуры продуцируют ряд внеклеточных ферментов: протеаз, целлюлаз, липаз, амилаз, участвующих в развитии симптомов бактериозов у растений.

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией защиты растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси В. А. Тимофеевой за предоставление клубней топинамбура с признаками бактериального поражения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Smith, S. Jerusalem artichoke / S. Smith // *Plant health clin. news.* – 2011. – N 2. – P. 1–4.
2. NCBI [Electronic resource] // *GenBank Overview.* – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>. – Date of access: 03.10.2015.
3. Agrios, G. N. *Plant pathology* / G. N. Agrios // *Plant pathology.* – 5th ed. – New York: Elsevier Academic Press, 2004. – 922 p.
4. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы / Р. А. Желдакова. – Минск: БГУ, 2006. – С. 23–69.

References

1. Smith, S. (2011) "Jerusalem artichoke", *Plant health clinic news*, no. 2, pp. 1-4.
2. "NCBI", *GenBank Overview*, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html> (accessed 3 October 2015).
3. Agrios, G. N. (2004) *Plant pathology*, 5nd ed., Elsevier Academic Press, New York, US.
4. Zheldakova, R. A. and Myamin, V. E. (2006) *Phytopatogennyye mikroorganizmy* [Phytopathogenic microorganisms], BSU, Minsk, BY.

Информация об авторах

Фальковская Ульяна Владимировна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: uliana_006@mail.ru

Сидоренко Анастасия Вячеславовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

Новик Галина Ивановна – канд. биол. наук, зав. лабораторией «Коллекция микроорганизмов». Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by

Для цитирования

Фальковская, У. В. Видовой состав возбудителей бактериозов топинамбура / У. В. Фальковская, А. В. Сидоренко, Г. И. Новик // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 103–106.

Information about the authors

Falkouskaya Ulyana Vladimirovna – Scientific Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: uliana_006@mail.ru

Sidarenka Anastasia Viacheslavovna – Ph. D. (Biol.), Senior Scientific Researcher Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

Novik Galina Ivanovna – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory of Collection of microorganisms. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by

For citation

Falkouskaya U. V., Sidarenka A. V., Novik G. I. Taxonomic composition of the Jerusalem artichoke bacteriosis agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 103–106.