

Т.Т. Гнатюк¹, Н.В. Житкевич¹, Р.В. Грицай², В.Ф. Патыка¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

²Институт картофелеводства НААН Украины
ул. Чкалова, 22, смт. Немишаеве, Киевская обл., Украина

CURTOBACTERIUM FLACCUMFACIENS PV. FLACCUMFACIENS - ВОЗБУДИТЕЛЬ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ СОИ

В результате мониторинга бактериальных заболеваний сои в Украине выявлен и исследован новый возбудитель, который по фенотипическим и генотипическим признакам идентифицирован как *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Патоген отличается высокой агрессивностью по отношению к сое и может потенциально представлять угрозу заражения для других зернобобовых культур.

Ключевые слова: бактериальное заболевание, возбудитель, соя, биологические свойства, пятнистость.

Распространение разных типов бактериозов сои зависит от экологических факторов и условий современной хозяйственной деятельности человека. В то же время количество факторов влияния на окружающую среду непрерывно растет, что имеет значение для формирования и функционирования микробных ассоциаций на растениях сельскохозяйственного значения, в частности сое [6]. В таких условиях можно предположить перераспределение акцентов среди видового состава возбудителей заболеваний сои или появление новых, которые встречаются в других странах, таких как *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Curtobacterium flaccumfaciens (Hedges 1922) Collins & Jones 1984 (старое название *C. flaccumfaciens*), известный как возбудитель ржаво-бурой пятнистости или увядания фасоли. Он не относится к основным и широко распространенным возбудителям бактериальных заболеваний зернобобовых, за исключением стран Южной Америки [5]. Поэтому литературные данные об этом патогене на фасоли и сои немногочисленны [11].

C. flaccumfaciens поражает сосудистую систему растения, вызывает увядание и гибель всходов и взрослых растений. Обычно больные растения плохо растут и становятся карликовыми, у них опадают листья, отмирают побеги и ломается стебель [10]. Семена сои, зараженные этим патогеном, являются источником распространения инфекции [7]. В Украине возбудитель изолирован К.И. Бельтюковой только из фасоли [1]. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* потенциально опасный патоген, который адаптирован к различным агроэкологическим условиям и растениям, в связи с чем во многих странах мира занесен в список карантинных культур.

Целью настоящей работы является идентификация и изучение распространения нетипичного для сои в Украине бактериального возбудителя.

Материалы и методы. Мониторинговые исследования проводили на научно-исследовательских стационарах и производственных посевах сои Киевской, Винницкой, Черкасской, Ровенской и Херсонской областях. Обследование растений сои и изоляцию возбудителя проводили в фазы всходов, бутонизации, цветения растений и созревания зерна. Для оценки заражения посевов сои использовали линейный метод [8]. Отбирали листья растений сои с симптомами бактериального заражения и проводили бактериологический анализ пораженного материала для выделения изолятов фитопатогенных бактерий. Их патогенные свойства устанавливали путем искусственного заражения ростков и взрослых растений в фазе созревания бобов в полевых условиях и условиях теплицы. Оценку вирулентности проводили по разработанной нами 5-ти бальной шкале для основных возбудителей сои [4]. В качестве эталонных использовали культуры фитопатогенных бактерий из Украинской Коллекции Микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* штаммы 6562, 6564, 6565, 6566а, 6567, 6568, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* УКМ В-1150, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *Pantoea agglomerans* 8490, 7695, 8456, 8508, УКМ В-1089^г и *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 3, 8303, 9075. Морфологические, культуральные, физиологические и биохимические свойства

выделенных изолятов изучали по известным методикам [3,13]. Оксидазную активность определяли по N. Kovacs [14]. Идентификацию изолированных бактерий проводили руководствуясь определителем Bergey [9].

Выделение ДНК из культуры бактерий проводили с использованием коммерческого набора Diatom DNA Prep 200 («Изоген», Россия) [12].

Продукты ПЦР анализировали в 1,5 %-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Определение длин ампликона в геле осуществляли с помощью программы Gel-Pro Analyzer 4.5. При обчёте результатов гель-электрофореза учитывали только те полосы, интенсивность которых достигала не менее 2,5 % от максимальной. Родство образцов ДНК определяли по доле ампликона одинаковой длины, пользуясь коэффициентом Джакарда. Кластерный анализ проводили, используя невзвешенный парногрупповой метод с арифметическим усреднением (UPGMA), построение дендрограммы проводили с помощью DendroUPGMA [15, 16].

Результаты и их обсуждение. Исследования по уточнению видового состава возбудителей заболеваний сои показали, что соя в Украине поражается: *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *P. agglomerans*, что совпадает с данными литературы по заболеванию сои в мире [2]. Кроме этих возбудителей нами впервые в Украине на научно-исследовательских селекционных посевах Белоцерковского Национального аграрного университета были обнаружены листья сои с характерными симптомами ржаво-бурой пятнистости, которые по данным литературы вызывает *Curtobacterium flaccumfaciens*.

На всех 9-ти обследованных сортах сои в Белоцерковском районе нами обнаружено небольшое (15-25 %) от общего бактериального поражения, но устойчивое распространение ржаво-бурой пятнистости (рис. 1). Среди сортов сои наиболее поражённым был сорт Вижион (до 32 %). Симптомы данной болезни обнаружены в Киевской, Винницкой, Ровенской, Черкасской и Херсонской областях. Характерные симптомы этого заболевания мы наблюдали также на сорняках, которые встречаются в посевах сои (преимущественно щерица обыкновенная).

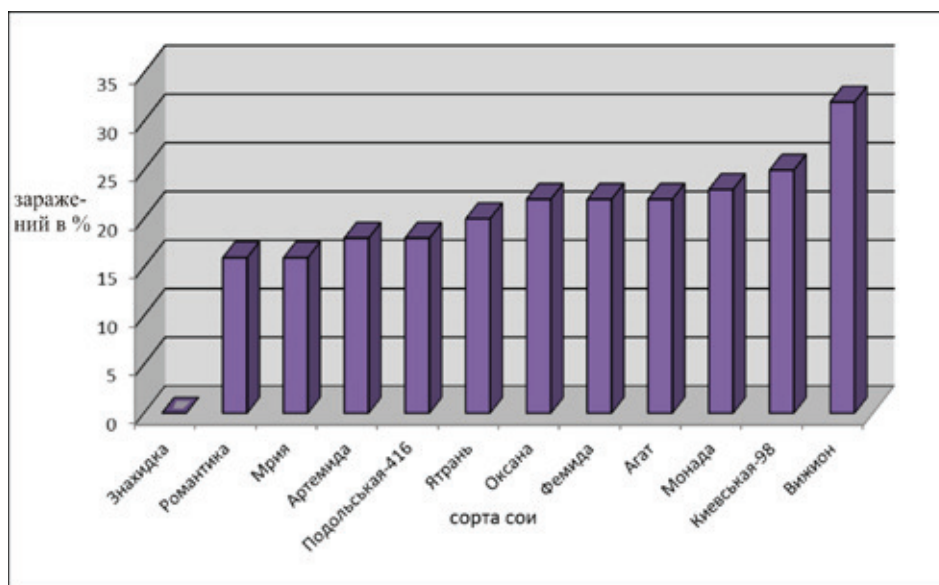


Рис. 1. Распространение симптомов ржаво-бурой пятнистости сои (научно-исследовательские поля, Белоцерковский район)

Болезнь начинается с появления хлоротических пятен очень малых размеров – 2-3 мм в диаметре. В центре пятна появляется некротическая точка ярко-коричневого или красно-коричневого цвета. Впоследствии пятна увеличиваются, а ореол хлороза становится менее выразительным.

Из поражённых листьев сои с признаками ржаво-бурой пятнистости были выделены изоляты, которые по культурально-морфологическим и вирулентным признакам соответствовали коллекционным штаммам *C. flaccumfaciens*. Для дальнейшей работы были отобраны 18 наиболее вирулентных изолятов.

Агрессивность новоизолированных штаммов на фасоли, а также симптомы поражения роднят их с возбудителем увядания или ржаво-бурой пятнистости фасоли *Curtobacterium flaccumfaciens* (табл. 2). При изучении вирулентных свойств установлено, что выделенные штаммы *C. flaccumfaciens* поражают листья и бобы как сои, так и фасоли. Также отмечено, что штаммы, изолированные с сои, проявляют более высокую агрессивность именно к сое, а коллекционные, выделенные из фасоли, более агрессивны к своему растению-хозяину.

Таблица 1

**Вирулентные свойства коллекционных и изолированных штаммов
C. flaccumfaciens (искусственное инокулирование сои и фасоли)**

| штаммы | баллы | | | |
|--|--------|------|--------|------|
| | фасоль | | соя | |
| | листья | бобы | листья | бобы |
| Коллекционные штаммы <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> 6562, 6564, 6565, 6566a, 6567, 6568, | 2 | 2-3 | 1 | 2 |
| Изолированные с сои штаммы <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (18 штаммов) | 2-3 | 2-3 | 3-4 | 4 |

По морфологии клеток, выделенные нами и коллекционные штаммы имеют типичные для вида *C. flaccumfaciens* свойства: Грамм позитивные, подвижные, аспорогенные палочки образуют Y или V подобные группировки. На картофельном агаре на 3-4 сутки образуют светло-желтые, маслянистые колонии, типичные для рода *Curtobacterium*.

Для подтверждения принадлежности изолированных из сои штаммов к патовару *flaccumfaciens* (поражающего именно сою или фасоль) проведено искусственное заражение свеклы, тюльпанов и молочая исследуемыми культурами, чтобы исключить другие 3 патовара, поскольку к виду *C. flaccumfaciens* отнесены четыре патовара [10], в частности *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (заражает фасоль и сою), *C. flaccumfaciens* pv. *betae* (заражает свеклу), *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* (заражает тюльпаны), *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* (заражает молочай).

Из результатов, представленных в табл. 2 видно, что выделенные нами штаммы, как и коллекционные *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, поражают фасоль и сою, но не поражают тюльпан, свеклу и молочай, что подтверждает принадлежность изучаемых нами штаммов к *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Таблица 2

**Степень поражения растений коллекционными и выделенными штаммами
C. flaccumfaciens при искусственном заражении**

| Вид, патовар, штамм | Степень поражения растений, баллы | | | | |
|---|-----------------------------------|--------|---------|--------|-----|
| | тюльпан | свекла | молочай | фасоль | соя |
| Коллекционные штаммы <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> 6562, 6564, 6565, 6567, 6568, 6566a | - | - | - | 4 | 2-3 |
| <i>Новоизолированные с сои штаммы C. flaccumfaciens</i> | | | | | |
| 3Б, 4Б, 4вБ, 17Б16Б, 18Б, 28Б | - | - | - | 2 | 3 |
| 2 бур., 4 бур. | - | - | - | 3 | 4 |
| 1В 2В, 5В ,8В,10В, 11В, 13В, 15В, 7В, | - | - | - | 2 | 4 |

Выделенные штаммы подобны коллекционным по способности использовать ряд сахаров, спиртов и по ряду других физиолого-биохимических свойств (табл. 3), что свидетельствует о значительном родстве данного возбудителя с представителями вида *C. flaccumfaciens*, а также отделяют его от других желтопигментных бактериальных фитопатогенных возбудителей заболеваний сои, таких, как *X. axonopodis* pv. *glycines* и *P. agglomerans*.

Для окончательной идентификации новых штаммов был использован метод ПЦР-фингерпринтинга.

В работе использовался праймер к так называемым BOX-элементам генома бактерий. В результате амплификации с 8 штаммами *C. flaccumfaciens*, *P. savastanoi* pv. *glycinea* и *P. syringae* pv. *syringae* получено 20 фрагментов, длина которых находилась в диапазоне 3000-100 п.н. Для представителей *C. flaccumfaciens* идентифицировано 6 мономорфных полос, что является опосредованным подтверждением родства рассматриваемых штаммов (рис. 2).

Таблица 3

Физиолого-биохимические свойства желтопигментных возбудителей бактериозов сои и изолятов типа *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

| Физиолого-биохимические тесты | новоизолированные | Коллекционные бактериальные культуры | | |
|---|-------------------|--------------------------------------|--|--|
| | 18 штаммов | <i>Pantoea agglomerans</i> 5-штаммов | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 3-и штаммы | <i>Curtobacterim flaccumfaciens</i> 4-и штаммы |
| Подвижность | + | + | + | + |
| Окраска за Граммом | + | - | - | + |
| Оксидаза | - | - | - | - |
| Редукция нитратов | - | - | - | - |
| Лакмусовая сыроватка | - | Щ | К | - |
| Использование молока | З | | С/П | С |
| Производство H ₂ S | - | - | + | - |
| Гидролиз желатина | + | + | - | + |
| Использование: | | | | |
| Глюкозы (аэробно) | - | + | - | - |
| Глюкозы (анаэробно) | - | + | - | - |
| Лактозы | - | - | К | - |
| Мальтозы, Сахарозы, Маниту, Рафинозы, Ксилозы | - | К | К | - |
| Галактозы | - | К | -/К | - |
| Дульциту | - | К | - | - |
| Сорбиту | - | К | - | - |
| Яблочной кислоты | - | - | Щ | - |

Примечание: “-” - отсутствие признака, п - пептонизация, с - сворачивание, к - образование кислоты; щ - образование щелочи;

По данным ПЦР-фингерпринтинга визуально наблюдается генетическая удаленность изолятов *C. flaccumfaciens* от *P. savastanoi* pv. *glycinea* и *P. syringae* pv. *syringae*, что было ожидаемым и согласовывается с результатами изучения биологических свойств возбудителей, несмотря на близкую симптоматику заболевания. Что подтверждается результатами расчета полученных данных ПЦР-фингерпринтинга, которые представлены в виде дендрограммы (рис. 3).

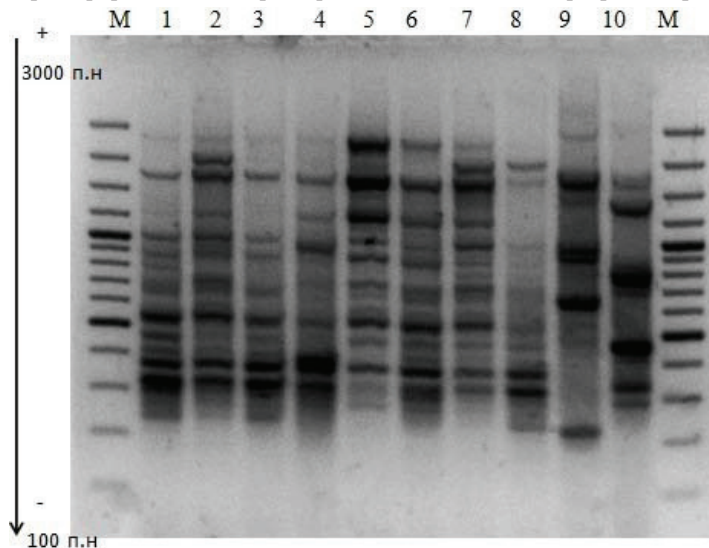


Рис. 2. Электрофорез в 1,5% агарозном геле продуктов ПЦР с BOX-A1R праймером.

1 - *C. flaccumfaciens* 2vB, 2 - *C. flaccumfaciens* 4B, 3 - *C. flaccumfaciens* 3B, 4 - *C. flaccumfaciens* 4vB, 5 - *C. flaccumfaciens* 17B, 6 - *C. flaccumfaciens* 6565, 7 - *C. flaccumfaciens* 6566a, 8 - *C. flaccumfaciens* 6567, 9 - *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, 10 - *P. savastanoi* pv. *glycinea* УКМ В-1150, М - маркер молекулярной массы.

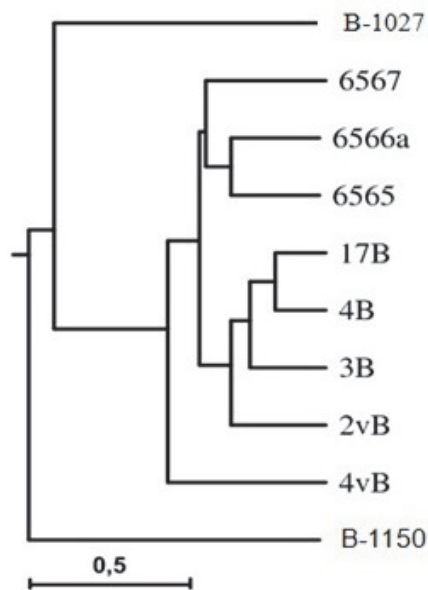


Рис. 3. Дендрограма аналізу генетических дистанцій між штаммами с використанням методу UPGMA

На дендрограмі чітко помітна дистанція між штаммами попередньо ідентифікованих як *C. flaccumfaciens* і *P. savastanoi* pv. *glycinea* УКМ В-1150 і *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. В свою чергу, спостерігалося розділення штаммів *C. flaccumfaciens* на два близькорідственних кластера. Перший з них включав в себе представників колекційних штаммів, виділених з фасоли, а другий - ізолюваних з уражених рослин сої.

Таким чином, досліджувані штамми на основі фенотипічних і генотипічних властивостей ідентифіковані як представники виду *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, вперше виявленого в Україні в посівах сої.

Отримані результати дозволяють утвердити про можливість розширення кола бактеріальних фітопатогенів у рослин сільськогосподарського призначення на прикладі сої в сучасних динамічних екологічних умовах. Для обмеження подібних процесів необхідні як суворий контроль за вітчизняним і імпортованим насінням, моніторинг нових явищ і тенденцій в розповсюдженні бактеріальних захворювань, так і вдосконалення методів захисту рослин від збудників бактеріозів, які в останнє час все більше переважають серед фітопатогенів рослин.

Т.Т. Гнатюк¹, Н.В. Житкевич¹, Р.В. Грицай², В.П. Патица¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

²Інститут картоплярства НААН України, Немішасве, Київська обл., Україна

CURTOBACTERIUM FLACCUMFACIENS PV. FLACCUMFACIENS - ЗБУДНИК БАКТЕРІАЛЬНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ СОЇ

Резюме

Внаслідок екосистемного моніторингу бактеріальних захворювань сої в Україні виявлено і досліджено новий збудник, який за фенотиповими і генотиповими ознаками ідентифікован як *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Патоген відзначається високою агресивністю до сої і може потенційно становити загрозу зараження для інших зернобобових культур.

Ключові слова: бактеріальне захворювання, збудник, соя, біологічні властивості, плямистість.

T.T. Gnatyuk ¹, N.V. Zhitkevich ¹, R.V. Gritsay ², V.F. Patyka ¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Institute for Potato Research, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences,
PO Nemishaeve, Kyiv region, Ukraine

CURTOBACTERIUM FLACCUMFACIENS PV. FLACCUMFACIENS IS THE AGENT OF BACTERIAL DISEASE OF SOYBEAN

Summary

A new phytopathogen has been identified and investigated as a result of ecosystem monitoring of bacterial soybean diseases in Ukraine which is identified as *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* according to its phenotypic and genotypic characteristics. The pathogen is highly aggressive to soybean and can potentially be a threat of infection to other legumes.

The paper is presented in Russian.

Key words: bacterial disease, agent, soybean, biological properties, spotting.

The authors' address: Gnatyuk T.T., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Бельтюкова К. И., Королева И. Б., Мурас В.А. Бактериальные болезни зернобобовых культур. – Киев: Наук. думка, 1974. – 340 с.
2. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гриник І.В., Патики В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / Під. ред. Патики В.П – Київ: ТОВ «Науково-виробниче підприємство Інтерсервіс», 2011. – 442 с.
3. Герхардт Д.Т. Методы общей бактериологии: в. 3.– М.: Мир, 1983 – Т.1 – 563 с.
4. Житкевич Н. В., Жмурко Л. Г. Розповсюдження бактеріальних захворювань сої у Київській області // Вісник Одеського Національного Університету. – 10, вип.7 (Біологія) – 2005. – С. 244–248.
5. Марингоні А. К., Камара К. Р. Бразильський мікробіологічний журнал. – 2006. – 37, № 4. – 2006. – С. 131–138.
6. Патики В.П., Омелянець Т.Г., Гриник І.В., Петриченко В.Ф. Екологія мікроорганізмів. – Київ: Основа, 2007. – 186 с.
7. Смит И. М., Макнамара Д., Скотт П.Р., Холдернесс М. – Ред. ЕППО / МЦСХБ *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* В: Карантинные вредители для Европы. Второе издание. – Wallingford, Великобритания: CAB INTERNATIONAL, 1996. – С. 245–251.
8. Шкаликів В.А. и др. Защита растений от болезней. – М.: Колос, 2004. – 255 с.
9. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. – 2nd ed.; Proteobacteria. Part... The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilon proteobacteria /Ed. Gevegem.
10. Bradbury J. F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria Bacteriologist. – England: CAB International Mycological Institute, 1986. – 334 p.
11. Dunleavy J. M., Keck J. W., Gobelman K. S., Reddy S., Thomson M. M. Prevalence of *Corynebacterium flaccumfaciens* as incitant of bacterial tan spot of soybean in Iowa // Plant Disease. - 1983. – 67, N 11. – P. 1277–1279.
12. Garcia-Vallve S. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Mol. Biol. and Evolution. – 1999. – 9. – P. 1125–1134.
13. Klement Z., Rudolph K., Sands D. Methods in phytobacteriology. – Budapest: Akademia Kiado, 1990.
14. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction // Nature. –1956. – 178. – P. 703.
15. Smith N. C. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subs. *sepedonicus* // European J. of Plant Path. – 2001. – 107. – P. 739–748.
16. <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>

Отримано 26.11.2012