

ЧЕРНЫЙ БАКТЕРИОЗ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР: ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОССИЙСКИХ ШТАММОВ *XANTHOMONAS TRANSLUCENS*

**Е.В. Матвеева, В.А. Политыко, Всероссийский НИИ фитопатологии,
А.Н. Игнатов, Центр «Биоинженерия» РАН**

Несмотря на то что многие бактериальные возбудители были отмечены на зерновых и фуражных культурах, сведения о них в России ограничались несколькими сообщениями о вирулентности и биохимических свойствах. Среди бактериальных болезней зерновых культур в основном выделяют 2 бактериоза, наиболее распространенных во многих странах мира. Это бактериальная штриховатость листьев (Bacterial leaf streak, BLS), вызываемая различными патотипами *Xanthomonas translucens* [5, 8]*. Эта болезнь при поражении колоса носит название черный бактериоз (black chaff) и чаще поражает зерновые культуры в странах с теплым и влажным климатом [2, 3, 4]. Повсеместно обнаружен на зерновых также базальный бактериоз, вызываемый *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* (Mc Culloch) Young и поражающий главным образом колос. Отмечено, что при поражении листьев зерновых преобладает другой патотип этой же группы возбудителей (группа «сиринга») — возбудитель пятнистости листьев *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [7], который широко распростра-

нен в природе [1]. Другие бактериальные болезни, в т.ч. порозовение зерна и мозаичность встречаются значительно реже [4].

В 2001—2005 гг. было проанализировано более 900 образцов зерновых культур (озимой и яровой пшеницы, ржи, ячменя и овса), собранных в различных регионах РФ (Амурская, Брянская, Воронежская, Курская, Московская, Новгородская, Оренбургская, Самарская, Ростовская, Саратовская, Тамбовская области, Приморский край, Башкортостан, Краснодарский край, Северная Осетия, Кабардино-Балкария и др.). В результате проведенных обследований в различных климатических зонах России обнаружено повсеместное распространение бактериальных болезней на посевах зерновых культур, но наиболее распространенным в южных регионах нашей страны (Краснодарский край, Кабардино-Балкария, Осетия и Центральная Черноземная зона) был черный бактериоз. По нашим данным, потери урожая от этой болезни не превышали 10—15%, но в отдельные годы в период жаркого лета были значительно выше. Мы подробно изучили биологические свойства этого возбудителя. Выделение бактерий проводили общепринятыми в фитобактериологии методами из растений и семян с симптомами бактериальных пятнистостей и штриховатости на полуселективные питательные среды. Инкубацию проводили при 28°C в течение 4—7 сут. Выросшие отдельные колонии бактерий пересевали на питательные среды и хранили на агаровых косяках под слоем минерального масла при комнатной температуре и при 4°C. Часть штаммов была лиофилизирована и криоконсервирована. Идентификацию бактерий проводили традиционными методами изучения морфологических, культурально-биохимических и патогенных свойств [6]. Окраску по Граму проводили с использованием стандартной процедуры окрашивания 48-часовой культуры, выросшей на PSA или YDS или методом Рая с использованием 3%-го KOH. Определяли тип дыхания (O/F), оксидазу, каталазу, аргининдигидролазу, фосфатазу, уреазу, гидролиз крахмала, твина 80, желатина, редукцию нитратов в нитриты, образование кислоты из углеводов. Гидролиз казеина определяли следующим образом: 10 г казеина растворяли в 80 мл 0,1N NaOH в течение 20—30 мин, доводили pH до 7,2 с помощью 1N раствора HCl, и добавляли в основную среду K_2HPO_4 — 1,0 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0, NaCl — 1,0, пептон — 5, агар — 20,0 г/л, среду нагревали до расплавления агара и стерилизовали в течение 20 мин при 121°C. Зоны просветления вокруг растущей культуры указывали на положительную реакцию.

Определение сверхчувствительной реакции проводили на листья табака и герани.

Для определения патогенности использовали различные методы инокуляции растений.

Таблица 1. Список изученных штаммов <i>Xanthomonas translucens</i>		
Штамм	Сорт	Регион
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i> — пшеница		
W-51, W-53, W-62, W-1264	Тарасовская-29	Московская область
W-11	Спартанка	Кабардино-Балкария
W-1009, W-1269	L-503	Саратовская область
W-1270	Саратовская-90	
W-1242, W-1251	Демора	Краснодарский край
W-1243, W-1244	Крошка	
W-1250, W-1252	Ютина	
W-1253	Офелия	
W-1268	Заря	Смоленская область
W-1247	Приокская	Татарстан
W-1248	Саратовская-6	
W-2000, W-1300	Лютесценс	Башкортостан
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>secalis</i> — рожь		
R-1007	Чулпан	Московская область
R-38-1	Новозыбковская	Калужская область
R-18	Таловская-15	
R-212, R-410, R-415	Восход-1	
R-31, R-63	Пурга	
R-1008, R-2003	Чулпан	Башкортостан
R-187-5, R-185-6, R-185-7	Эра	Ленинградская область
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>translucens</i> — ячмень		
B-1265	Гонор	Смоленская область
B-3003, B-3004, B-3005	Прима Белоруссии	Брянская область
B-1	Зазерский-85	Московская область
B-606, B-30, B-27	Зазерский-85	Саратовская область
B-3.2	Вавилон	Кабардино-Балкария
B-76-4, B-76-6, B-76-10	Красноуфимский	Челябинская область
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i> — овес		
O-173-1, O-173-2, O-173-4, O-173-6, O-173-7, O-173-10	—	Камчатская область

Таблица 2. Физиологические и биохимические свойства российских штаммов *Xanthomonas translucens*

Тест	Типовой штамм <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i> , 926	Штаммы из пшеницы (20)*	Штаммы из ржи (15)*	Штаммы из ячменя (16)*
Реакция сверхчувствительности на табаке и герани	***	+	+	+
Жгутикование	1-полярный	1-полярный	1-полярный	1-полярный
Оксидаза	**	-	-	-
O/F	0	0	0	0
Форма колоний	S**	S	S или R**	S или R
Редукция нитратов	-	-	-	-
Гидролиз крахмала	-	-	-	-
Казеина	+	+	+ или слабо	+ или слабо
Желатина	+	+	+ или слабо	+ или слабо
Твина 80	+	+	+ или слабо	+ или слабо
Производство индола, NH ₃ , H ₂ S, ацетоина	-	-	-	-
MR	-	-	-	-
Аргенин дигидролаза	-	-	-	-
Фосфатаза	+	+	+	+
Уреаза	-	-	-	-
Производство 2-кетоглюконата	-	-	-	-
Гидролиз эскулина	+	+	+	+
Кислота из глюкозы, сахарозы, лактозы, арабинозы, галактозы, мальтозы	+	+	+	+
Кислота из сорбита, маннита, инозита	-	-	-	-
Лакмусовое молоко	Щ**	Щ	Щ	Щ
Реакция на молоке	Редукция	Редукция	Редукция	Редукция

* - количество штаммов;

** - - - отрицательная реакция, + - положительная реакция, S - колония слизистая, R - колония морщинистая, Щ - щелочная реакция

Таблица 3. Вирулентность различных штаммов *Xanthomonas translucens* при инокуляции семян ржи (сорт Крона)

Штамм	Всхожесть, %*	Балл**	Группа вирулентности
Контроль	81,2±2,1	-	
R-31	79,2±4,2	0,0	0
R-18	66,6±3,7	1,0	1
R-1007	58,4±3,2	2,0	1
R-38-1	55,1±3,9	2,0	2
R-63	52,6±2,8	2,0	2
R-1008	51,4±2,8	2,0	2
R-410	50,0±2,4	3,0	3
R-212	48,2±2,1	3,0	3
R-187-2	41,6±3,9	3,0	3
R-415	33,1±7,8	3,0	3
R-27-2	23,1±5,6	3,0	3
W-53	62,8±1,2	1,0	1
W-1009	63,4±2,8	1,0	1
W-1265	52,6±3,4	2,0	2
W-11	50,9±2,9	2,0	2
W-51	51,7±1,4	2,0	2
В-6	50,6±3,9	2,0	2
В-3003	40,8±3,5	3,0	3
В-1265	43,6±2,7	3,0	3

*. Инокуляция семян, концентрация млрд колонеобразующих единиц (кое/мл), средний процент всхожести из трех повторностей по 20 семян в каждой;

** - шкала учета вирулентности штаммов: 0 - неvirulentный штамм, 1 - слабовирулентный штамм (всхожесть семян >60%), 2 - средневирulentный штамм (всхожесть семян <60%), 3 - высокоvirulentный штамм (всхожесть семян <50%)

Экспресс-метод заражения семян. Предварительно простерилизованные семена пшеницы, ячменя и ржи замачивали в бактериальной суспензии в течение 3 ч (КОЕ 10⁸/мл), после чего раскладывали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Коха. Для каждого штамма использовали 3 повторности по 10—15 семян в каждой. Отмечали всхожесть семян в каждом варианте.

Клиппинг-метод. Четырехнедельные проростки пшеницы, ржи и ячменя инокулировали методом обрезания кончиков листьев ножницами, смоченными в бактериальной суспензии (10⁸ КОЕ/мл). Контроль — обрезка листьев ножницами, смоченными в воде.

Заражение через корни. Корни проростков зерновых, кончики которых предварительно обрезаны ножницами, погружали в бактериальную суспензию (10⁸ КОЕ/мл) на 5 мин. Контроль — погружение корней в воду.

Метод укола. Четырехнедельные проростки зерновых культур заражали методом укола в стебель препаровальной иглой с нанесенной на нее бактериальной слизи. Растения выдерживали в климатической камере (температура — день — +26...28°C, ночь — +20°C, влажность — 90%, фотопериод — 16 ч).

Для изучения генетического разнообразия фитопатогенных бактерий были использованы новые молекулярно-генетические методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифическими и генонеспецифическими (random) праймерами.

Список изученных штаммов представлен в табл. 1.

Фенотипические свойства этого вида были охарактеризованы следующим образом (табл. 2). На питательных средах с углеводами представители этого вида образовывали светло-желтые слизистые колонии с прозрачными ровными краями, которые ничем не отличались от типовых ксантомонад. Все штаммы имели окислительный тип дыхания, были оксидазоотрицательными, не имели аргининдигидролазу, уреазу, не образовывали сероводород, индол, 2-кетоглюконат, были отрицательными по реакции MR и Фогес-Проскауэра и не редуцировали нитраты в нитриты. Реакция была положительной на гидролиз казеина, эскулина, твина 80 и желатина. В отличие от большинства других видов рода *Xanthomonas*, *Xanthomonas translucens* из пшеницы, ячменя, ржи и овса (патотипы *undulosa*, *translucens*, *secalis* и *cerealis*) были крахмал-отрицательными и лактозо-положительными. Бактерия имеет один полярный жгутик. Выделенные штаммы не росли при добавлении в среду 0,1%-го 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида. Большинство штаммов использовали цитрат, лактат, малонат и сукцинат и быстро редуцировали лакмусовое молоко. Образование кислоты наблюдали на арабинозе, лактозе, маннозе, сахарозе и галактозе. РСЧ была положительной на табаке и герани. Штаммы, выделенные из различных растений-хозяев, имели в основном идентичные фенотипические свойства. Диаметр зон гидролиза твина 80 у различных штаммов был неодинаков. Был проведен кластерный и факторный анализ 20 желто-пигментных штаммов из различных растений-хозяев (пшеница, рожь и ячмень), по результатам которого штаммы были отнесены к 3 кла-

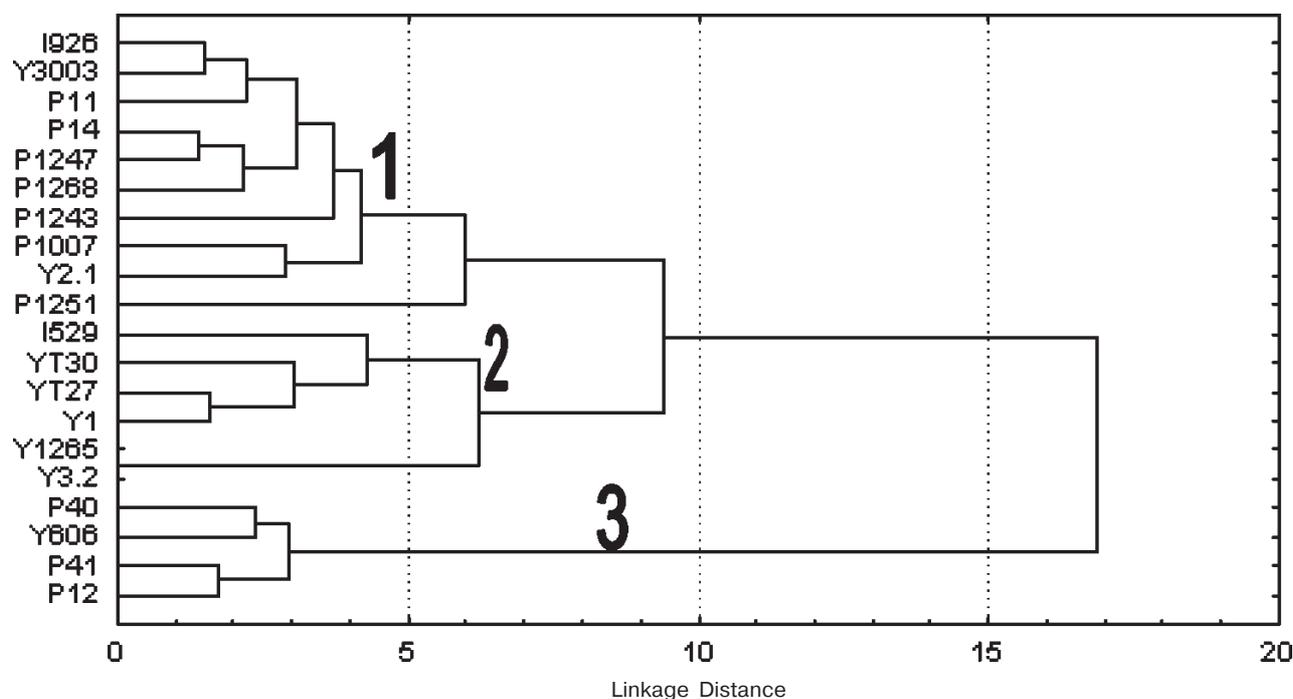


Рис. 1. Кластерный анализ биохимических признаков 20 изолятов желтопигментных бактерий из зерновых

1 — изоляты из пшеницы и ржи; 2 — изоляты из ячменя; 3 — другие желтопигментные изоляты

Таблица 4. Специализация различных патотипов *Xanthomonas translucens*

Вид, штамм	Пшеница, сорт Энита	Пшеница, сорт Мироновская-808	Рожь, сорт Пурга	Ячмень, сорт Биос	Ячмень, сорт Риск	Овес, сорт Скакун
<i>X. translucens</i> pv. <i>secalis</i> , R-1007	Слабый некроз	Слабый некроз	Слабый некроз	Слабый некроз	Слабый некроз	Хлороз
<i>X. translucens</i> pv. <i>undulosa</i> , W-11	Слабый некроз	Слабый некроз	Нет реакции	Нет реакции или слабый некроз	Нет реакции или слабый некроз	Нет реакции
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i> , B-3003	Нет реакции	Нет реакции	Слабый некроз	Обширный некроз	Обширный некроз	Нет реакции
<i>X. translucens</i> pv. <i>cerealis</i> , O-168-15	Нет реакции	Нет реакции	Слабый некроз	Обширный некроз	Слабый некроз	Обширный некроз
<i>X. translucens</i> pv. <i>cerealis</i> , O-168-19	Нет реакции	Нет реакции	Слабый некроз	Обширный некроз	Слабый некроз	Обширный некроз
<i>Xanthomonas</i> sp. из суданской травы	Нет реакции	Нет реакции	Обширный некроз	Обширный некроз	Слабый некроз	Обширный некроз

* - - реакции нет, С - хлороз, + - слабый некроз, ++ - обширный некроз

стерам. Группа 1 — большинство штаммов из пшеницы и ржи, группа 2 — большинство штаммов из ячменя, группа 3 — ярко-желтые изоляты (рис. 1). Все изоляты имели фрагмент равной длины, амплифицированный праймерами T1 и T2.

При использовании различных методов заражения (инокуляция семян, клиппинг, заражение через корневую систему и клиппинг + опрыскивание) не было установлено существенных различий в проявлении симптомов болезни, но отмечалось некоторое ускорение развития болезни при заражении клиппинг-методом с последующим опрыскиванием бактериальной суспензией. Установлено, что бактериальные штаммы этой группы бактерий имеют различную вирулентность. Заражение семян и инокуляция проростков ржи сорта Крона выявили 3 группы вирулентности среди патотипов *Xanthomonas translucens*: слабо-, средне- и высоковирулентные штаммы.

Всхожесть семян при обработке слабовирулентными штаммами снижалась незначительно, но высоко вирулентные штаммы снижали всхожесть более чем на 50% (табл. 3).

По степени восприимчивости к возбудителю черного бактериоза зерновые культуры были распределены следующим образом: более восприимчив — яч-

мень, затем — рожь и менее восприимчива — пшеница. Испытанные сорта ячменя поражались в значительной степени даже некоторыми штаммами, выделенными из пшеницы и ржи. Напротив, многие сорта пшеницы слабо поражались этими штаммами. При изучении специализации выделенных штаммов группы *Xanthomonas translucens* на различных растениях (пшеница, рожь, ячмень и овес) в климатической камере (температура: день — +26...+28°C, ночь — +20°C, влажность — 85%, фотопериод — 16 ч) с использованием клиппинг-метода (10⁷ КОЕ/мл) не было установлено существенных различий по приуроченности штаммов к различным зерновым культурам. Несмотря на некоторые вариации в вирулентности штаммов *Xanthomonas translucens* на исследованных генотипах пшеницы и ячменя, среди них не были обнаружены расы, как это установлено для других видов фитопатогенных бактерий (табл. 4).

Таким образом, мы провели изучение генетического разнообразия 51 штамма ксантомонад на основании профилей амплификации со случайными RAPD, AP- и rep-PCR праймерами; праймерами, специфичными к инсертонным элементам (транспозонам) IS1112 и IS50, полуконсервативным праймером для tRNA генов, и реакции со

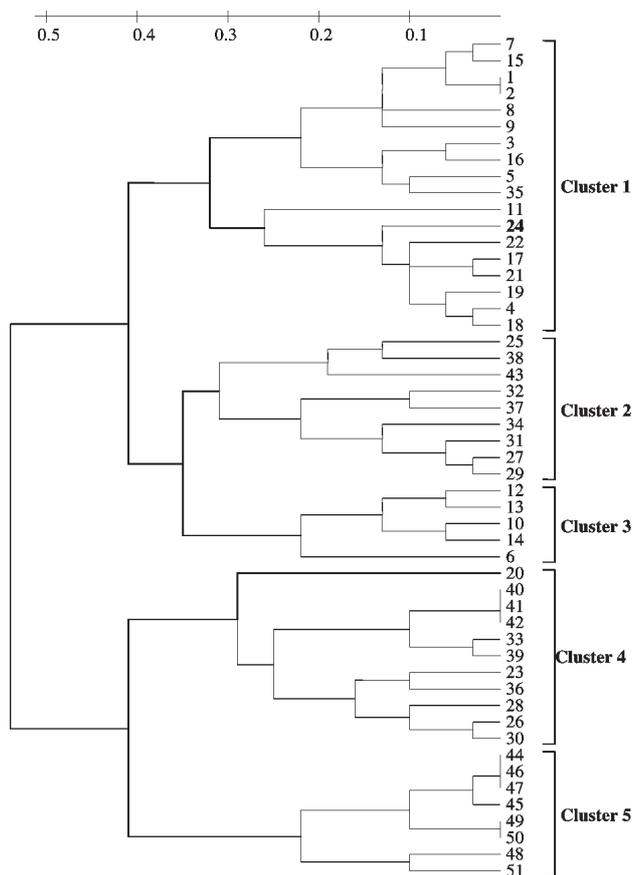


Рис. 2. Кластерный анализ штаммов по ПЦР маркерам

1—4 — *Xanthomonas*, выделенные из зерновых
5 — штаммы из капусты, риса, хлопка и тыквенных

специфическими праймерами для *avrBs2* и *iaaH* генов. Штаммы, выделенные из различных регионов России, были разделены на 4 группы (рис. 2). Среди этих групп 16S-23S ITS регион показал вариабельность по общему

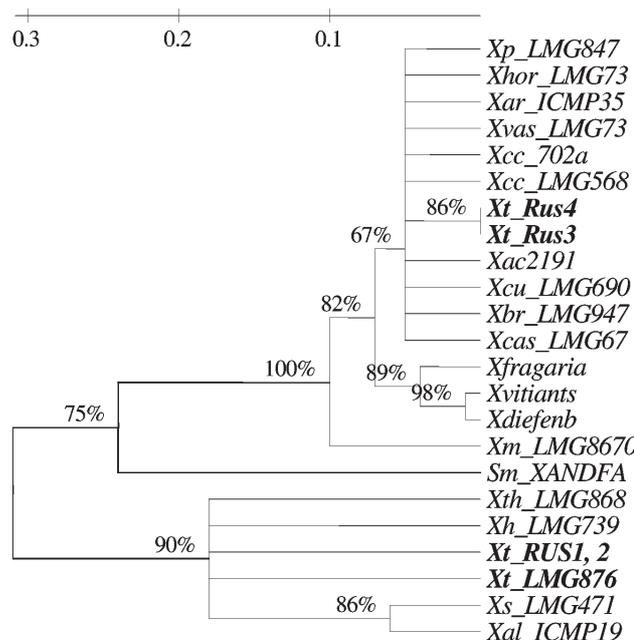


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям 16s—23s rRNA ITS российских штаммов *X. translucens*, представительных для групп 1, 3 и 4, в сравнении с образцами Генбанка

размеру и количеству копий (1 или 2) PCR-RFLP паттернов). Сиквенс межгенника 16S — 23S rRNA отчетливо показал, что только группы 1 и 3 имели высокий коэффициент подобия с типовым штаммом *X. translucens* (98%), а 2 другие группы были более подобны типовому штамму *X. campestris* (99%, рис. 3). Другие желтопигментированные бактерии, выделенные из пораженных образцов зерновых, в соответствии с их морфологическими и биохимическими свойствами были определены как *Pantoea agglomerans*. Штаммы этого вида, часто изолируемые из растений многих семейств, были обычными спутниками различных видов рода *Xanthomonas* в России. [17]

Литература

1. Bradbury, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. — CAB, Kew, England, 1986 — p. 332.
2. Duveiller E. Research of *X. translucens* on wheat and triticale at CIMMYT — Bull. EPPO, 1989 — v. 19, N1 — pp. 97—102.
3. Duveiller, E. Bacterial leaf streak or black chaff of cereals — Bull. EPPO, 1994 — v. 19, N24 — pp. 135—157.
4. Duveiller, E.L., Fucikovsky, L. and Rudolph, K. The bacterial diseases of wheat. In: Concept and methods of disease management. Mexico, D.F., CIMMYT — 1997 — pp. 1—78.
5. Jones, L.R., Jonson, A.G., Reddy, C.S. Bacterial blight of barley. Journal of agricultural research — 1917, N11 — pp/ 625—643.
6. Schaad N.W. et al. Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria — ARS Press Stm Paul, MN, 2000, 3rd.edition.
7. Shane W.W., Baumer, J.S. Population dynamic of *P. syringae* pv. *syringae* on spring wheat. Phytopathology — 1987, v. 77 — pp. 1399—1405.
8. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. Reclassification of *Xanthomonas* — International Journal of systematic bacteriology — 1995, N45 — pp. 472—479.