

# ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИОЗОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА В РОССИИ И ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

**Е.В. Матвеева, В.А. Политыко, В.Г. Фокина, К.П. Корнев, А.Н. Игнатов, Всероссийский НИИ фитопатологии**

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) — основная масличная культура России, однако его экономическое значение особенно возросло в последние годы. Подсолнечник поражается болезнями грибного, бактериального и вирусного происхождения. При этом растения дают урожай на 20–40% ниже и значительно снижают содержание масла в семенах. В различных странах мира выделены следующие бактериозы подсолнечника: бурая пятнистость (*Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*), бактериальная гниль (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) и ожог листьев (*Xanthomonas campestris*). Описаны и другие возбудители — *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *Pseudomonas cichori* (Swingle) Stapp, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum* [7].

Изучению бактериальных болезней подсолнечника в России уделялось недостаточно внимания, сведения о них в большинстве случаев отрывочны и не систематизированы. Впервые бактериальные болезни подсолнечника отмечены нами в 1988 г. в Белгородской и Пензенской обл., Краснодарском крае и Молдавии [3]. В 2006 г. бактериозы зарегистрированы в Московской обл., Краснодарском крае и Северной Осетии. Отмечалось три типа поражений: бактериальный ожог, бурая пятнистость листьев, гнили корзинок и стеблей.

Выделение возбудителей и изучение их морфологических, биохимических и генетических характеристик проводили согласно методам, описанным в руководстве Schaad et al. [11]. Определяли окраску по Граму, тип дыхания (тест О/Ф), наличие оксидазы, каталазы, уреазы, аргининдигидролазы, тирозиназы, фосфатазы, разжижение желатина, гидролиз крахмала, эскулина, казеина, твинов 40, 60 и 80, способность редуцировать нитраты в нитриты и др. Первичную проверку патогенных свойств изолятов определяли реакцией сверхчувствительности на растениях комнатной герани и табака. Заражение подсолнечника осуществляли различными методами: заражением семян, обрезанием листьев ножницами (смоченными в бактериальной суспензии), методом укола и инъекции в стебель. Растения помещали во влажную камеру до и после инокуляции на сутки. Концентрация бактериальной суспензии —  $10^7$ – $10^8$  кл/мл. Опытные и контрольные растения выдерживали в климатической камере при дневной температуре 22–24°C, ночной — 20°C, влажности 80%, фотопериоде 16 ч. ПЦР-анализ проведен с праймерами iaaN1/H2, BOX A, REP1/REP2, C-152. ДНК изолировали из бактериальных культур в соответствии с методикой [11]. ПЦР-амплификацию проводили в термодиклере. Стандартная реакционная смесь содержала 75 мМ Трис-НСl, рН=8.8; 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Твин 20; 200 мкМ каждого dNTP; 10 пкМ каждого праймера;

2 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1 единицу Taq ДНК-полимеразы и 2 нг ДНК. Окончательный объем смеси — 25 мкл. После реакций около 10 мкл амплифицированных продуктов разделяли на 1,5%-м агарозном геле, окрашенном бромидом этидия, затем фотографировали под УФ-светом. Каждую реакцию дублировали.

## Бактериальный ожог подсолнечника

Ожог листьев подсолнечника, вызываемый представителями рода *Xanthomonas* sp. — наименее изученная болезнь, впервые описанная в 1981 г. в США [9]. Выделенный возбудитель отнесен к *Xanthomonas campestris*. Позже эта болезнь была отмечена в России и Бразилии [3, 10]. Основные симптомы ее проявления в России — бурые пятна на листьях и стеблях, растрескивание стебля и образование на нем язв. Сосуды растений, как правило, имели бурый цвет, из них при надавливании вытекала серая слизистая масса. Микроскопический анализ подтвердил наличие бактерий в сосудах. Стебель пораженных растений растрескивался чаще в продольном направлении, был ребристым и твердым. Корзинки развивались мелкими и деформированными. Из пораженных растений выделены желтопигментные слизистые бактерии, патогенность которых доказана в тепличных и камерных условиях. Выделенные изоляты по своим фенотипическим свойствам не отличались от типового штамма *X. campestris* (табл. 1). На питательных средах с углеводами PSA и YDC изоляты образовывали светло-желтые слизистые колонии с прозрачными ровными краями. Бактерии — строгие аэробы, каталазоположительные, оксидазо-, аргининдигидролазо- и уреазо-отрицательные, имели окисли-

**Таблица 1. Сравнительная характеристика желтопигментных штаммов, выделенных из подсолнечника с известными видами рода *Xanthomonas***

Тест	<i>X. campestris</i>	<i>X. fragariae</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>X. populi</i>	Изоляты из подсолнечника
Слизистый рост на YDC	+	+	+	+	+	+
Рост при 35°C	+	—	—	+	+	+
Гидролиз: желатина	V	+	V	+	—	+
эскулина	+	—	+	+	—	+
крахмала	+	+	—	+	—	+
Протеолиз молока	+	—	—	—	Слабый	+
Лакмусовое молоко	Щелочная	Щелочная	—	Щелочная	—	Щелочная
Уреаза	—	—	—	—	—	—
Рост с NaCl, %	2,0–5,0	0,5–1,0	0,5	1,0	0,4–0,6	2,0
Кислота из: арабинозы	+	—	—	—	—	+
глюкозы, сахарозы	+	+	+	+	+	+
маннозы	+	+	+	—	+	+
галактозы	+	—	V	—	+	+
треголозы	+	—	—	+	+	+
целлобиозы	+	—	—	—	—	+
глицерина	+	—	+	—	—	+

Примечание: — — реакция отрицательная, + — реакция положительная, V — вариационно

тельный тип дыхания, не образовывали сероводород, индол, 2-кетоглюконат, отрицательные по реакциям MR и Фогес-Проскауэра, не редуцировали нитраты в нитриты. Реакция была положительной на гидролиз казеина, эскулина, твина 80, крахмала и желатина. Бактерии из различных географических зон России имели одинаковые фенотипические свойства (табл. 2). Большинство штаммов использовали цитрат и пептонизировали молоко с последующей редукцией лакмуса. Все изученные штаммы при посеве на среду Логана разжижали пектат натрия, вызывали реакцию сверхчувствительности на табаке, герани, пленкрантусе и заражали подсолнечник. В то же время штаммы из Белгорода, Краснодара и Молдавии различались по ПЦР анализу. Ксантомонады по биохимическим свойствам были близки к *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, но генетически более близки к *Xanthomonas gardneri* (типовому штамму GA2) на основании ПЦР анализа с праймерами iaaH1/H2, BOX A, REP1/REP2, C-152. Средняя вирулентность 8 штаммов (517, 518, X.C.C. 39, 516, 53, 515, S5) на различных сортах подсолнечника (при использовании метода введения бактериальной суспензии шприцом в узел или листовую пластинку при концентрации инокулюма 10 млн кл/мл) была примерно одинаковой и составляла 1–2 балла через 5–7 дн. после инокуляции. Несколько выше была вирулентность у штамма 518 на сорте Лаудер. Однако через 3–4 нед. все штаммы индуцировали высокую пораженность подсолнечника и часть растений погибла. Из 8 испытанных сортов и гибридов (Кубань 999, Триумф, Санэй, СПК, Березанский, Родник, Флагман, ВНИИМК 8883, Мастер, Луидор, Юпитер) относительно устойчивыми к наиболее вирулентному штамму возбудителя были Юпитер, Березанский и ВНИИМК, наиболее восприимчивым — гибрид Луидор.

**Таблица 2. Характеристика российских штаммов *X. campestris*, изолированных из подсолнечника в различных регионах России**

Тест	Типовой штамм <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 2286	Штаммы из подсолнечника S1-S5 518-520 (Белгородская обл., Молдавия)	Штаммы из подсолнечника 515-517, 1329-1331 (Краснодарский край)	Штаммы подсолнечника 1332-1341 (Северная Осетия)
РСЧ	+	+	+	+
Жгутикование	1-полярный	1-полярный	1-полярный	1-полярный
Оксидаза	—	—	—	—
Аргенин дигидролаза	—	—	—	—
Тип дыхания	O	O	O	O
Форма колоний	S	S	S	S
Редукция нитратов	—	—	—	—
Гидролиз крахмала, желатина, эскулина и твина 80	+	+	+	+
Продукция индола, аммиака, ацетона	—	—	—	—
Разжижение пектата	+	+	+	+
Эмиссия сероводорода	+	+	+	+
Фосфатаза	+	+	+	+
Уреаза	—	—	—	—
Продукция 2-кетоглюконата	—	—	—	—
Образование редуцирующих сахаров из сахарозы	+	+	+	+
Кислота из арабинозы, глюкозы, фруктозы, сахарозы, галактозы, мальтозы, трегалозы, целлобиозы	+	+	+	+
Кислота из сорбита, инозита, альфа-метилглюкозида	—	—	—	—

Примечание: — — реакция отрицательная, + — реакция положительная, S — слизистая колония, O — окислительный тип дыхания

#### Бурая бактериальная пятнистость

Бурая бактериальная пятнистость подсолнечника впервые была описана в Японии в 1934 г., в Канаде — в 1976 г.; возбудитель идентифицирован как *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*. Симптомы болезни выражались в появлении бурых угловатых пятен на листьях и побурении сосудистого кольца. Позже болезнь обнаружена в Индии, Румынии, Испании, Югославии [4, 5, 7]. Этот бактериоз распространен во многих регионах России, но впервые зарегистрирован в стране в 1991 г. [3].

На молодых листьях появляются сначала небольшие светло-зеленые угловатые пятна (до 1 мм), постепенно они увеличиваются и буреют. Листья иногда скручиваются. При сильном поражении весь лист становится серым и отмирает. На пораженных листьях во влажную погоду обнаруживается бактериальный экссудат. Бурые пятна появляются также на семядолях и стебле.

Изученные штаммы, выделенные из различных географических мест и растений, представляли довольно гомогенную группу и согласно системе ЛОПАТ (Л — наличие левана, O — оксидаза, П — размягчение картофеля, А — аргининдигидролаза, Т — реакция сверхчувствительности) отнесены к группе 1a рода *Pseudomonas* виду *P. syringae*. На среде Кинга Б бактерии имеют зеленый флуоресцирующий пигмент. Все изоляты — подвижные палочки с пучком жгутиков, строгие аэробы, не имеют ни спор, ни капсул, оксидазо- и аргининдигидролазо-отрицательные, каталазоположительные, не гидролизуют крахмал, активно разжижают желатин, гидролизуют эскулин и арбутин, редуцируют нитраты, вариабильны по образованию фосфатазы и гидролизу твинов. На картофельном агаре колонии округлые с едва приподнятым центром, полупрозрачные, голубоватые в проходящем свете. На среде с 5% сахарозы продуцируют леван. На МПБ и молоке образуют муть со слабой флуоресценцией. Молоко слегка створаживают с дальнейшей пептонизацией. Все штаммы не ферментируют лактозу, мальтозу, дульцит и раффинозу. Кислоту продуцируют на глюкозе, сахарозе и галактозе. Некоторые штаммы подкисляют также среды с маннитом и глицерином. Все изоляты хорошо растут на средах с солями лимонной, янтарной и молочной кислот, но не используют соли шавелевой, уксусной и яблочной кислот, редуцируют метиленовую синь и лакмус. Штаммы лишены уреазы, не образуют индол и ацетилметилкарбинол.

#### Бактериальная гниль подсолнечника

Болезнь впервые описана в Югославии [4, 5], а затем зарегистрирована во многих странах [6, 8]. Бактериальная гниль обнаружена в Белгородской обл. и Краснодарском крае, а также в Молдавии [1, 2, 3]. Выделенные возбудители активно разжижали картофель и образовывали зоны гидролиза пектата на пектатной среде Логана. Для разде-

**Таблица 3. Физиологические свойства штаммов *Erwinia carotovora subsp. carotovora***

Штамм	Количество	Пектолитическая активность на среде Логана	Редукция сахарозы	Кислота из метилглюкозида	Редукция кето-глюконата натрия	Гидролиз желатина	Гидролиз — желатин + 2%-я сахароза	Кислота из этанола
Типовой Есс	1	+	—	—	—	+	+	+
Из подсолнечника	7	+	—	—	—	+	+	+
Из томата	3	+	+		+	±	±	
Из огурца	3	+	+(00)	—	+(30)	—	—	
Из кукурузы	2	+	+(00)	+	+			
Из картофеля	12	+	—	—	—	+	+	+

Примечание: — — отрицательная реакция, + — положительная реакция, (00) — оранжевый осадок, (30) — зеленый осадок

ления представителей рода *Erwinia* на подвиды *carotovora* и *atroseptica* использованы следующие биохимические и физиологические тесты: рост при 37°C, рост на среде с 5% NaCl, образование кислоты из альфа-метилглюкозида, мальтозы, этанола, образование редуцирующих веществ из сахарозы и глюконата калия, способность гидролизовать желатин при наличии 2% глюкозы и в ее отсутствие. Патогенность оценивали по способности размягчать клубни картофеля и корнеплоды моркови. Для этого клубни картофеля (сорт Лорх) тщательно промывали водой и на 40 мин. погружали в 0,5%-й раствор KMnO<sub>4</sub>, затем протирали смоченным спиртом тампоном; после подсыхания клубни разрезали пополам и делали насечку на одной из половинок клубня, куда наносили 0,5 мл бактериальной суспензии. Зараженный клубень закрывали второй половинкой, помещали во влажную камеру и инкубировали

при 28°C. Инокулом содержал 5·10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Штаммы, разжижающие картофель (в течение 24—48 ч), считали вирулентными.

Выделенные изоляты *Erwinia* sp. изучены по физиологическим признакам и определены как *E. carotovora subsp. carotovora* (Есс). Все грамотрицательные штаммы, с подвижными перитрихами и факультативные анаэробы использовали глюкозу в течение 3—5 дн. Колонии на картофельном агаре — белые, округлые или амебоидные, гладкие, прозрачные. Все штаммы пептонизировали лакмусовое молоко, редуцировали нитраты, гидролизовали пектат и были каталазо-положительными, оксидазо-, уреазо-, тирозиназо-отрицательными, устойчивыми к 0,05%-му эритромицину. Штаммы Есс росли при 36°C, не продуцировали кислоту из альфа-метилглюкозида, не редуцировали сахарозу и глюконат натрия (табл. 3). 

#### Литература

1. Бушкова Л.Н и Алексеева А.П. 1969. Бактериальные болезни подсолнечника. Защита растений, 6:49-506
2. Илюхина М.К..1993. Бактериальные болезни подсолнечника. Защита растений, 1:55-56.
3. Матвеева Е..В. и Тихонова Т. 1991. Бактериальные болезни подсолнечника..Защита растений, 7:55-56
4. Arsenijevic, M., 1970. Bacterial soft rot of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 5:317-326
5. Arsenijevic M., and Masirevic, S. 1989. Bacterial leaf spot of sunflower. Nasnik Zastite bilja 12, (2).
6. Gudmestad, N.C., Secor, B.A., Nolte, P., Straley, M.L. 1984. *Erwinia carotovora* a stalk rot pathogen of sunflower in North Dakota. Plant disease, 68:189-192.
7. Kolte, S.J. 1985. Diseases of annual edible oilseed crops. III Bacterial diseases. Press. Inc. Boca Raton, Florida, 58-61. 1.
8. Nemeth J., and Walez, I. 1992. Bacterial diseases of sunflower in Hungary caused by *Erwinia carotovora*. Hella, 15 :79-84.9
9. Richeson, M.L. 1981. Etiology of a late wilt in *Helianthus annuus* Plant disease, 65:1019-1021.
10. Romeiro, R.S. and Moura, A.B. 1998. Bacterial blight of sunflower (*Helianthus annuus* L.), a new disease. Revista Ceres. 45(259):233-243.
11. Schaad et al. 2000 Lab Guide for Identification of Plant Pathogen Bacteria. APS Press .