Защита картофеля

№ 2, 2014

Научно-практический журнал
ISSN 2221-2396

Учредитель и главный редактор –
С.Н. Еланский

Редколлегия: Б.В. Анисимов,
М.А. Кузнецова, А.В. Николаев,
К.А. Пшеченков, Е.А. Симаков,
А.Н. Смирнов, З.А. Сташевски,
А.В. Филиппов.

E-mail: kartofelorg@yahoo.com
Сайт: http://www.kartofel.org
© Защита картофеля, 2014

В номер журнала вошли материалы
Международной
научно-практической конференции
«Бактериальные и фитоплазменные
болезни сельскохозяйственных куль-
тур: научные и практические аспекты»,

ВНИИ фитопатологии,
п. Большие Вяземы, Одинцовский р-н.,
Московская обл.
15-18 октября 2014 г.

*Полная или частичная
перепечатка материалов
только с письменного согласия
редакции.*

Содержание

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПЯТНИСТОСТЬ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ВЕШЕНКИ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ЕЁ ВРЕДОНОСНОСТИ
К.Л. Алексеева, Л.Г. Сметанина **4**

ФИТОПЛАЗМОЗЫ ДРЕВЕСНЫХ В САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ
Д.З. Богоутдинов **5**

КОНТАМИНАЦИЯ РАСТЕНИЙ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ И ОЗДОРОВЛЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*
А.Б. Бургутин, Л.А. Волкова, Н.А. Кузовова, А.Н. Игнатов, А.О. Марченко, Б.Н. Милкус, А.И. Сопин, В.И. Сусов, Д.В. Терешонок, Н.В. Феоктистова, С.Н. Чирков **9**

ПРОНИКНОВЕНИЕ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* ЧЕРЕЗ КОРНЕВУЮ СИСТЕМУ И ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТА
А.А. Ванькова, Л.А.Свиридова **11**

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ
С.В. Виноградова, Е.И. Кырова, А.Н. Игнатов **15**

ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛОМА В РЕЗУЛЬТАТЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ *PHYSCOMITRELLA PATENS*
С.В. Виноградова, А.Н. Князев, Г.П. Арапиди, И.А. Фесенко, Е.Р. Закиев, Р.А. Хазигалеева, А. Шаварда, А.Н. Игнатов **17**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ СЕМЯН КАПУСТЫ ОТ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА
Во Тхи Нгок Ха, Ф.С. Джалилов **19**

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА В РОССИИ: ПОЛИМОРФИЗМ ПЦР ФРАГМЕНТОВ
Во Тхи Нгок Ха, Ф.С. Джалилов, С.В. Виноградова, Е.И. Кырова, А.Н. Игнатов **21**

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА В РОССИИ: РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ
Во Тхи Нгок Ха, Ф.С. Джалилов, С.В. Виноградова, Е.И. Кырова, А.Н. Игнатов **26**

РАСПРОСТРАНЕНИЕ НОВОГО ГЕНОТИПА *XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS* В РОССИИ В 2012 ГГ.
Во Тхи Нгок Ха, Ф.С. Джалилов, Е.С. Мазурин, Е.И. Кырова, С.В. Виноградова, Н.В. Шаад, Д. Ластер, А.Н. Игнатов **28**

ФИТОПЛАЗМЕННЫЕ БОЛЕЗНИ КАРТОФЕЛЯ И ИХ ПЕРЕНОСЧИКИ В ЦЕНТРАЛЬНОМ РЕГИОНЕ РОССИИ
Н.В. Гирсова, Т.Б. Кастальева, К.А. Можаева, Ю.И. Мешков **31**

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA* И *PSEUDOMONAS SYRINGAE* К МЕДЬСОДЕРЖАЩИМ ФУНГИЦИДАМ
А.А. Джаймурзина, М.М Исин, Ж.З. Умиралиева, Б.К. Копжасаров **33**

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *XANTHOMONAS*, ПОРАЖАЮЩИЕ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА МЯТЛИКОВЫЕ
М.С. Егорова, А.Н. Игнатов, Е.С. Мазурин **35**

ДИАГНОСТИКА НОВОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ПАТОГЕНА ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР *XANTHOMONAS ARBORICOLA* МЕТОДОМ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»
М.С. Егорова, А.Н. Игнатов, Е.С. Мазурин **39**

ПРЕПАРАТ «ЗЕРОКС» НА ОСНОВЕ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО СЕРЕБРА КАК ЭЛЕМЕНТ ЭФФЕКТИВНОЙ БОРЬБЫ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ И ГРИБНЫМИ ЭПИФИТОТИЯМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННО ЗНАЧИМЫХ РАСТЕНИЙ
П.М. Жеребин, А.Н. Игнатов, С.Н. Еланский, М.А. Побединская, Г.В. Лисичкин, А.Н. Денисов, Ю.А. Крутяков **43**

БАКТЕРИОЗЫ КАРТОФЕЛЯ КАК ФИТОСАНИТАРНАЯ ПРОБЛЕМА СЕМЕНОВОДСТВА
М.И. Жукова, Г.М. Середа **45**

РАСПРОСТРАНЕНИЕ *DICKEYA DIANTHICOLA* И *DICKEYA SOLANI* В РОССИИ С 2001 ПО 2013 ГГ.
А.Н. Игнатов, А.Н. Карлов, Ф.С. Джалилов, В.Е. Карандашов, М.С. Князькина, К.П. Корнев, Э.Ш. Пехтерева **50**

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ БАКТЕРИОЗОВ РАСТЕНИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
А.Н. Игнатов **53**

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФИТОПЛАЗМ, ВЫЗЫВАЮЩИХ БОЛЕЗНИ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ В РОССИИ
Т.Б. Кастальева, Н.В. Гирсова, К.А. Можаева **57**

КОРНЕВОЙ РАК *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS (SMITH ET TOWSEND) CONN.* И КОСМАТЫЙ КОРЕНЬ *A. RHIZOGENES (RIKER ET AL.) CONN.* ПЛОДОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ В ЦЕНТРАЛЬНОМ ЧЕРНОЗЕМЬЕ РОССИИ
Д.А. Колесова **61**

СИМБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ ПАУТИННЫХ КЛЕЩЕЙ РОДА *TETRANYCHUS*
Н.Д. Коноплёв, А.Н. Игнатов, С.Я. Попов **63**

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *XANTHOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ ТОМАТА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ
К.П. Корнев, В.А. Политыко, Е.И. Кырова, С.В. Виноградова, Н.В. Шаад, Д. Ластер, А.Н. Игнатов **66**

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBPS. *MICHIGANENSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ ТОМАТА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ
К.П. Корнев,В.А. Политыко, Е.И. Кырова, С.В. Виноградова, Н.В. Шаад, Д. Ластер, А.Н. Игнатов . . **71**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ОБЗОР ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ НАСЕКОМЫХ И КЛЕЩЕЙ
Н.Д. Коноплёв, С.Я. Попов, А.Н. Игнатов **78**

АНАЛИЗ ПОЛНОГО ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИОЗА ЗЛАКОВ, КАПУСТНЫХ И СЛОЖНОЦВЕТНЫХ КУЛЬТУР ШТАММА 3004 *XANTHOMONAS ARBORICOLA*
Е.И. Кырова, С.В. Виноградова, В.А. Политыко, А.Н. Игнатов **82**

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОДГОТОВКИ И ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ МЕЖЛАБОРАТОРНЫХ СЛИЧИТЕЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ *RALSTONIA SOLANACEARUM*
Е.С. Мазурин, М.Г. Кабдулова, И.О. Камаев, М.Б. Копина, Г.Н. Мугол Хан **83**

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ В СОЧЕТАНИИ С ПРЕПАРАТОМ СЕРЕБРА «ЗЕРОКС®» ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЯДА БАКТЕРИОЗОВ РАСТЕНИЙ
М.В. Ходыкина, В.А. Политыко, Е.И. Кырова, Ю.А. Крутяков, П.М. Жеребин, А.Н. Игнатов **84**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В КАЧЕСТВЕ ФАКТОРА ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ РИСА К ПИРИКУЛЯРИИ
П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Е.В. Дубина, Ж.М. Мухина **87**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРАТРЕДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОТРАВЛИВАНИЯ СЕМЯН И ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ
В.В. Котляров, Н.В. Сединина, Д.В. Котляров, Д.Ю. Донченко **89**

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ ГЕНТИПИРОВАНИЕ *XANTHOMONAS ARBORICOLA* РОССИЙКОЙ ПОПУЛЯЦИИ
Е.И. Кырова, С.В. Виноградова, А.Н. Игнатов **91**

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ВРЕДОНОСНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА МОРКОВИ
А.М. Лазарев, И.Н. Надточий, Ю.Б. Рогачев **94**

АРЕАЛ И ЗОНА ВРЕДОНОСНОСТИ УГЛОВАТОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ФАСОЛИ
А.М. Лазарев, И.Н. Надточий, В.А. Коробов **98**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПРЕПАРАТАМИ ПРОТИВ ПОЛОСАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ (PSEUDOMONAS ANDROPOGONI) НА СОРГОВЫХ КУЛЬТУРАХ В ЛЕСОСТЕПИ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ
Е.В. Матвиенко **101**

СОСУДИСТЫЙ БАКТЕРИОЗ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В ЦЧР
Г.А. Селиванова, Л.Н. Путилина **104**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФИТОПЛАЗМИНА ПРОТИВ ПРИКОРНЕВОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГНИЛИ ОГУРЦА
О.Н. Смирнова, Л.Г. Сметанина, К.Л. Алексеева **108**

БОРОДАТОСТЬ КОРНЕЙ ТЕПЛИЧНОГО ОГУРЦА В РОССИИ
М.В. Ходыкина, Э.Ш. Пехтерева, Е.И. Кырова, С.В. Виноградова, А.К. Ахатов, В.Н. Юваров, И.П. Борисова, А.Н. Игнатов **110**

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АБИОГЕННЫХ ЭЛИСИТОРОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ К ПОРАЖЕНИЮ ПОРАЖЕНИИ ФУЗАРИОЗОМ
Е.К. Яблонская, В.В. Котляров **112**

ПОДГОТОВКА МАГИСТРОВ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ В РУДН
Е.Н. Пакина, В.Г. Плющиков, В.В. Введенский **115**

CONTENT

ON BACTERIAL BLOTCH OF PLEUROTUS AND MEANS OF ITS CONTROL
K.L. Alekseeva, L.G. Smetanina **4**

PHYTOPLASMA DISEASES OF WOOD PLANTS IN SAMARA REGION OF RUSSIA
D.Z. Bogoutdinov **5**

CONTAMINATION OF PLANTS BY PHYTOPATHOGENIC MICROBES AND THEIR CONTROL IN CULTURE *IN VITRO*
A. Burgutin, L. Volkova, N. Kuzova, A. Ignatov, A. Marchenko, B. Milkus, A. Sopin, V. Susov, D. Tereshonok, N. Feoktistova, S. Chirkov **9**

PENETRATION OF *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VIA ROOTS AND INFLUENCE ON THE DEVELOPMENT OF TOMATO PLANTS
A.A. Vankova, L.A. Sviridova **11**

COMPLETE GENOME SEQUENCING OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA
S.V. Vinogradova, E.I. Kyrova, A.N. Ignatov **15**

METABOLOME CHANGES DUE TO BACTRIAL PATHOGEN ATTACK ON PHYSCOMITRELLA PATENS
Vinogradova S.V., Kniazev A.N., Arapidi G.P., Fesenko I.A., Zakiev E.R., Khazigaleeva R.A., Shavarda A., Ignatov A.N. . . **17**

USE OF ESSENTIAL OILS FOR DISINFECTION OF CABBAGE SEED FROM BLACK ROOT
Vo Thi Ngoc Ha, F.S. Dzhalilov **19**

GENETIC DIVERSITY OF BLACK ROT PATHOGEN IN RUSSIA: PCR POLYMORPHISM
Vo Thi Ngoc Ha, F.S. Dzhalilov, S. Vinogradova, E. Kyrova, A. Ignatov 21

GENETIC DIVERSITY OF BLACK ROT PATHOGEN IN RUSSIA: PLANT REACTION
Vo Thi Ngoc Ha, F.S. Dzhalilov, S.Vinogradova, E. Kyrova, A. Ignatov 26

APPEARANCE OF A NEW GENOTYPE OF X*ANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS* IN RUSSIA AT 2012
Vo Thi Ngoc Ha, F.S. Dzhalilov, E.S. Mazurin, E. Kyrova, S. Vinogradova, N.W. Schaad, D. Luster, A. Ignatov 28

PHYTOPLASMA DISEASES OF POTATO AND THEIR VECTORS SPECIES IN CENTRAL REGION OF RUSSIA
N.V. Girsova, T.B. Kastalyeva, K.A. Mozhaeva, Yu.I. Meshkov 31

THE SENSITIVITY OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA* AND *PSEUDOMONAS SYRINGAE* TO COPPER-CONTAINING FUNGICIDES
A.A. Dzhaimurzina, M.M Isin, Zh.Z. Umiralieva, B.K. Kopzhasarov 33

DIVERSITY PHYTOPATHOGENIC BACTERIA XANTHOMONAS, CAUSING DISEASES OF CEREALS (*POACEAE*)
M.S. Egorova, A.N. Ignatov, E.S. Mazurin 35

DIAGNOSTIC NEW BACTERIAL PATHOGENS OF CEREALS *XANTHOMONAS ARBORICOLA* BY REAL - TIME PCR
M.S. Egorova, A.N. Ignatov, E.S. Mazurin 39

«ZEROKS»- SILVER-BASED PREPARATE FOR AN EFFECTIVE CONTROL OF BACTERIAL AND FUNGAL EPIDEMIC DISEASES OF AGRICULTURAL PLANTS
P.M. Zherebin, A.N. Ignatov, S.N. Elansky, M.A. Pobedinskaya, G.V. Lisichkin, A.N. Denisov, Y.A. Krutyakov 43

POTATO BACTERIOSISES AS A PHYTOSANITARY PROBLEM OF SEED PRODUCTION
M.I. Zhukova, G.M. Sereda 45

SPREADING OF POTATO BLACK LEG CAUSED BY *DICKEYA DIANTHICOLA* AND *DICKEYA SOLANI* IN RUSSIA AT 2001 - 2013
A. Ignatov, A. Karlov, F. Dzhalilov, V. Karandashev, M. Knyazkina, K. Kornev, E. Pekhtereva 50

OCCURANCE OF EMERGING BACTERIAL PLANT PATHOGENIS IN RUSSIA
A.N. Ignatov 53

GENETIC DIVERSITY OF PHYTOPLASMAS INFECTING CULTURAL AND WILD PLANTS IN RUSSIA
T.B. Kastalyeva, N.V. Girsova, K.A. Mozhaeva 57

CROWN GALL CAUSED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS (SMITH ET TOWSEND)* CONN. AND HAIRY ROOTS CAUSED BY *A. RHIZOGENES (RIKER ET AL.) CONN.* ON FRUIT TREES IN THE CENTRAL CHERNOZEMIE REGION OF RUSSIA
D.A. Kolesova 61

SYMBIOTIC BACTERIA OF *TETRANYCHUS* SPIDER MITES
N.D. Konoplev, A.N. Ignatov, S.Ya. Popov 63

BACTERIA OF THE GENUS XANTHOMONAS FOUND ON TOMATO PLANTS IN RUSSIA
K.P. Kornev, V.A. Polityko, E.I. Kyrova, S.V. Vinogradova, N.W. Schaad, D. Luster, A.N. Ignatov 66

CHARACTERISTICS OF BACTERIA CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBPS. MICHIGANENSIS EXTRACTED FROM PLANTS TOMATO IN RUSSIA
K.P. Kornev, V.A. Polityko, E.I. Kyrova, S.V. Vinogradova, N.W. Schaad, D. Luster, A.N. Ignatov 71

COMPARATIVE REVIEW OF INSECTS' AND MITES' SYMBIOTIC MICROORGANISMS' SPECIES DIVERSITY
N.D. Konoplev, S.Ya. Popov, A.N. Ignatov 78

ANALYSIS COMPLETE GENOME OF THE PATHOGEN OF BACTERIOSIS CEREALS, CABBAGE AND ASTERACEAE CULTURE OF STRAIN 3004 *XANTHOMONAS ARBORICOLA*
E.I. Kyrova, S.V. Vinogradova, V.A. Polityko, A.N. Ignatov 82

INVESTIGATION OF THE CONDITIONS OF PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES COLLATION INTERLABORATORY TESTS TO DETECT AND IDENTIFY THE CAUSATIVE AGENT OF BACTERIAL BROWN ROT OF POTATO *RALSTONIA SOLANACEARUM*
E.S. Mazurin, M.G. Kabdulova, I.O. Kamala, M.B. Kopin, G.N. Mugol Khan 83

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ANTIBIOTICS AND SILVER COMPAUND "ZEROKS®" AGAINST SOME PLANT PATHOGENIC BACTERIA
M.V. Khodykina, V.A. Polityko, E.I. Kyrova, Y. Krutyakov, P.M. Zherebin, A.N. Ignatov 84

GENE TRANSFER AS FACTOR OF INDUCED RESISTANCE OF RICE PLANTS TO PYRICULARIA PATHOGENS
P.I. Kostylev, E.V. Krasnova, A.A. Redkin, E.V. Dubina, Zh.M. Mukhina 87

HUSE NITRATE-REDUCING ABILITY OF PSEUDOMONAS *FLUORESCENS* FOR PRODUCHION OF MICROBIOLOGICAL PREPARASHION FOR SEED FND PLANT PROTECHION
V.V. Kotlyarov, N.V. Sedinina, D.V. Kotlyarov, D.Y. Donchenko. 89

MULTILOCUS GENOTYPING OF RUSSIAN POPULATION OF *XANTHOMONAS ARBORICOLA*
E.I. Kyrova, S.V. Vinogradova, A.N. Ignatov 91

DISTRIBUTION AND HARM CAUSED BY BACTERIAL BLIGHT OF CARROT PLANTS
A.A. Lazarev, I.N. Nadtochii, Ju. B., Rogachev 94

DISTRIBUTION AND HARM CAUSED BY BACTERIAL LEAF SPOT DISEASE OF COMMON BEENS
A.A. Lazarev, I.N. Nadtochii, V.A. Korobov 98

EFFICIENCY OF PRESEEDING PROCESSING OF SEEDS PREPARATIONS AGAINST STRIPED SPOTTINESS (PSEUDOMONAS ANDROPOGONI) ON SORGOVY CULTURES IN THE FOREST-STEPPE OF THE SAMARA REGION
E.V. Matvienko 101

VASCULAR BACTERIOSIS OF SUGAR BEET IN THE CENTRAL BLACK-EARTH REGION
G.A. Selivanova, L.N. Putilina 104

ON THE EFFECTIVENESS OF PHYTOPLAZMIN AGAINST THE BACTERIAL ROOT ROT OF CUCUMBER
O.N. Smirnova, L.G. Smetanina, K.L. Alekseeva 108

HAIRED ROOTS OF GREENHOUSE CUCUMBERS IN RUSSIA
M.V. Khodykina, E.SH. Pekhtereva, E.I. Kyrova, S.V. Vinogradova, A.K. Akhatov, V.N. Yuvarov, I.P. Borisova, A.N. Ignatov 110

THE INFLUENCE OF ABIOGENIC ELICITORS ON WINTER WHEAT DAMAGE BY FUSARIUM
E.K. Jablonskay, V.V. Kotlyarov 112

MASTER PROGRAMS IN PLANT PROTECTION IN RUSSIAN PEOPLE'S FRIENDSHIP UNIVERSITY
E.N. Pakina, V.G. Plyuschikov, V.V. Vvedenskii 115

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПЯТНИСТОСТЬ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ВЕШЕНКИ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ЕЁ ВРЕДОНОСНОСТИ

К.Л. Алексеева, Л.Г. Сметанина

Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства, e-mail: vniio@yandex.ru

ON BACTERIAL BLOTCH OF PLEUROTUS AND MEANS OF ITS CONTROL

K.L. Alekseeva, L.G. Smetanina

Russian Research Institute of Vegetable Growing, Moscow region

Summary

The effect of water soluble concentrate of Phytolavin (based on antibiotic isolated from the soil actinomycete Streptomyces spp.) on bacterial blotch of Pleurotus was investigated. Its biological efficacy was shown to be about 75%. The optimal concentration dose (1,5%) and timing for Phytolavin use are recomended. The standard production was about 96,8%.

Вешенка обыкновенная – *Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr.) Kumm.* относится к широко распространенным видам культивируемых съедобных грибов, представляют собой ценный продукт питания с лечебно-профилактическими свойствами, имеет важное значение для расширения ассортимента внесезонной грибной продукции защищенного грунта. Для выращивания вешенки применяется относительно простая технология приготовления субстрата, а организация производства не требует высоких материальных затрат и дорогостоящего оборудования (Алексеева, Девочкина, 2009; Сметанина, 2013). Однако, в результате интенсивных способов ведения культуры происходит накопление вредных организмов, которые снижают выход грибной продукции и ухудшают её товарное качество.

Наиболее распространённой болезнью плодовых тел вешенки является бактериальная пятнистость (возбудитель *Pseudomonas tolaasii Paine*), которая проявляется как на молодых, так и на взрослых, полностью сформировавшихся плодовых телах. Симптомы заболевания выражаются в образовании на поверхности шляпок слегка вдавленных водянистых желтовато-бурых пятен, имеющих округлую или неправильную форму. На ранних стадиях развития заболевания пятна имеют размер 1-3 мм, что снижает товарный вид грибной продукции. Постепенно пятна разрастаются и сливаются. Так же симптомы болезни могут выражаться в пожелтении молодых плодовых тел и остановке их роста. При сильном поражении грибы превращаются в гниющую массу, и потери урожая могут составлять 50% и более, что наносит значительный ущерб производству, резко снижая его экономические показатели. Развитию бактериозов способствует высокая относительная влажность воздуха, плохая вентиляция и неравномерное распределение воздушных потоков в культивационном помещении. Такие условия вызывают конденсацию водяных паров и образуют водяную плёнку на поверхности плодовых тел, что является благоприятным условием для развития бактериальной пятнистости шляпок (Алексеева, 2001). Болезнь поражает плодовые тела вешенки и в послесборовый период, что снижает сроки хранения грибов. Поражённые грибы теряют товарный вид и становятся непригодными как для употребления в свежем виде, так и для переработки. Основные причины – сбор переувлажненных грибов сразу после полива, нарушение режимов хранения, развитие скрытых форм поражения.

В основе системы защиты вешенки от бактериальной пятнистости - поддержание оптимальных условий микроклимата, достаточная интенсивность циркуляции воздуха в культивационных помещениях, не допускающая длительного скопления капельно-жидкой влаги на поверхности грибов, полив не менее, чем за 12 часов до сбора грибов. Важное значение имеют санитарно-гигиенические и профилактические мероприятия, дезинфекция помещений, оборудования и инвентаря, своевременное удаление отходов и зараженных плодовых тел. Для улучшения санитарного состояния производственных помещений и снижения вредоносности бактериоза традиционно применяют гипохлорит натрия (Oh S. J. et al., 2000). Для чередования препаратов важное значение имеет подбор бактерицидов, имеющих другой механизм действия. В задачу исследований входило оценить эффективность препарата фитолавин ВРК (д.в. антибиотик фитобактериомицин (ФБМ) на основе *Streptomyces. spp.*), рекомендо-ванного против бактериальных болезней овощных культур. Обработки субстратных блоков проводили при появлении первых симптомов бактериоза между сборами плодовых тел с интервалом две недели. Концентрация рабочей жидкости 1,5 %, расход

400 л/га. Работа проводилась на базе одного из грибоводческих хозяйств Московской области в осеннее-зимних оборотах 2012 – 2013 гг. Выращивание вешенки осуществляли по общепринятой технологии с использованием субстратных блоков массой 12 кг. Для посева использовали мицелий вешенки штамма НК-35. Площадь опытной делянки 10 м^2, учётной - 5 м^2. Количество субстратных блоков на 1 м^2 – 4 штуки. Повторность опыта 4-х кратная. Распространенность болезни оценивали по числу пораженных плодовых тел на учётной делянке. Степень развития заболевания оценивали по 4-х балльной шкале: 0 баллов – поражение отсутствует, 1 балл – поражения единичные, 2 балла – поражено от 5 до 20% площади поверхности шляпки, 3 балла – от 20 до 50%, 4 балла – более 50%. Результаты представлены в таблице 1, из которой следует, что биологическая эффективность фитолавина превышает эталон и составляет 75,8%. За счет снижения потерь от болезни в результате обработок фитолавином урожайность грибов в варианте 3 составила 12,1 кг/м^2, что достоверно превышало этот показатель в контрольном и эталонном вариантах опыта соответственно на 2,5 и 0,9 кг/м^2 . Обработки субстратных блоков фитолавином в концентрации 1,5% повышают выход стандартной грибной продукции без признаков поражения бактериальной пятнистостью. Доля стандартных грибов в варианте опыта 3 составляет 96,8%, что превышает контроль и эталон.

Таблица 1.
Биологическая эффективность препарата фитолавин против бактериальной пятнистости вешенки

Вариант	*Степень развития болезни, %*	*Биологическая эффективность,%*	*Урожайность, кг/ м^2*	*Доля стандартной продукции, %*
1. Контроль (вода)	12,8	-	9,6	82,2
2. Гипохлорит натрия, 0,5% - эталон	4,5	64,8	11,2	94,3
3. Фитолавин, 1,5 %	3,1	75,8	12,1	96,8
НСР 05 1,5				

Проведённые испытания показали эффективность применения фитолавина против бактериальной пятнистости плодовых тел, что позволяет рекомендовать этот препарат для дальнейших испытаний с целью регистрации на культуре вешенки.

Литература

Алексеева К.Л. Защита культивируемых грибов от вредителей и болезней /К.Л. Алексеева //Рекомендации. – М., 2001. - 27 с.

Алексеева К.Л., Девочкина Н.Л. Выращивание вешенки в теплицах // Теплицы России. – 2009, № 2, С. 41-42.

Сметанина Л.Г. Усовершенствование технологических процессов выращивания вешенки обыкновенной (Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm.). – Автореф. к.с-х.н., М., 2013 - 26 с.

Oh S. J., Kim H. K., Kim H. K et al. Effect of sodium hypochlorite for controlling bacterial blotch in Pleurotus ostreatus //Mycobiology. – 2000.- V. 28, №4 – p.123-126.

ФИТОПЛАЗМОЗЫ ДРЕВЕСНЫХ В САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

Д.З. Богоутдинов

Самарская государственная сельскохозяйственная академия, e-mail: ssaa-samara@mail.ru

PHYTOPLASMA DISEASES OF WOOD PLANTS IN SAMARA REGION OF RUSSIA

D.Z. Bogoutdinov

Samara state agricultural academy, e-mail: ssaa-samara@mail.ru

Summary

In 2012-2013 yr in the Samara region of Russia is detected of phytoplasmas 3 groups in 25 forms of wood and bushy plants of 11 families. Are examined the characteristic symptoms of the phytoplasma diseases of wood and the prevalence of the groups of the insects of the possible vectors.

Древесные растения являются средообразующими доминатами, определяющими состав и условия развития многих биогеоценозов. Неоценимо их экономическое, экологическое, санитарное и эстетическое значение, они влияют на микроклиматические факторы и устойчивость растениеводства. Многообразие видов и форм древесных определяют их незаменимость при конструировании

искусственных ландшафтов, многие древесные являются медоносами, используются для производства плодов и в медицине. Несмотря на долговечность и экологическую выносливость древесные подвержены действию разного рода патологиям, среди которых фитоплазменные до сих пор в России не были изучены.

С 2010 года после острозасушливых летних сезонов в Самарской области многие старые (от 20 лет и более) искусственные насаждения разного назначения подвержены усыханию. Анализ причин массового усыхания древесных свидетельствует о наличие признаков фитоплазменного поражения. Наряду с повышенной кустистостью на многих живых и усохших деревьях отмечены плодовые тела базидиальных грибов: трутовиков и щелелистника, а также наросты бактериального рака (на тополях и берёзе). В старых садах на деревьях с признаками фитоплазменного поражения впервые в изобилии выявлен редкий для флоры России гриб саркодонция шафранно – жёлтая. Отмечено, что деревья с признаками фитоплазмоза легче возгораются при весенних низовых пожарах. Тем не менее, грибные и бактериальные инфекции не были постоянными спутниками усыхающих деревьев, в то время как повышенная ветвистость выявлена во всех случаях, что свидетельствует о значимости фитоплазм в гибели деревьев. За рубежом фитоплазмозы также считаются основной причиной усыхания садов.

Проведённые в 2012, 2013 гг. во ВНИИФ молекулярные исследования установили наличие 6 групп фитоплазм в 34 видах древесных и кустарниковых растений из 14 семейств. Фитоплазмы группы столбура (16SrXII-A) были выявлены в берёзе повислой, бобовнике анагироидном, винограде культурном, бузине красной, вишне обыкновенной, вязе мелколистном, груше домашней, иве белой, иве краснотале, каштане конском, можжевельнике казацком, розе морщинистой, спартиуме, спирее зверобоелистной, тамариксе изящном, туе западной и черёмухе виргинской. Фитоплазмы группы желтухи астр (16SrI) определены в акации белой и вишне обыкновенной, а фитоплазмы группы пролиферации клевера (16SrVI) в вязе гладком и клёне ясенелистном. В растениях липы мелколистной, малины обыкновенной, миндаля низкого (бобовника) и черёмухи обыкновенной, ясеня обыкновенного определены фитоплазмы группы «Икс»-болезни персика (16SrIII), в растении спиреи зверобоелистной фитоплазмы желтухи вяза (16SrV) и в растении жимолости татарской фитоплазмы группы ведьминой метлы каянуса (16SrIX). В растениях сосны обыкновенной выявлены неопределённые виды фитоплазм, а в образцах алычи, берёзы повислой, боярышника крупноплодного, вяза мелколистного, каштана конского, клёна ясенелистного, сирени обыкновенной, спиреи биллиарда, тополя белого и чёрного, яблони домашней и ясеня обыкновенного обнаружены неидентифицированные смеси фитоплазм. Таким образом, в Самарской области в древесных растениях преобладают фитоплазмы группы столбура и смесь фитоплазм разных групп. Следует отметить, что в нашем регионе фитоплазмы столбура были преобладающим и травянистых растениях.

По нашим наблюдениям признаки повышенной кустистости, как признак фитоплазмозов четко диагностируется в начальные годы роста деревьев (типично для яблони, вяза, ясеня, хвойных) и в возрастных насаждениях от 20-40 лет. Кроме повышенной кустистости и крайней формы её проявления - ведьминой метлы, у древесных отмечается измельчение листьев и их деформация: скручивание, изменение типичной формы, а также гофрированность поверхности. Часты изменения окраски листвы от темно зелённой, до красной, желтой и белой, охватывающей как всю поверхность, так и отдельные части листа: края, меж жилок или по жилкам. Повышенное побегообразование отмечается как на всем дереве, или на верхушках побегов в виде ведьминых метел, так и в виде приствольной поросли. Проявление ведьминых метел часто наблюдается на вязе мелколистном и сосне. Для фитоплазмозов древесных часты также суховершинность или отсутствие доминирующего роста верхушки. «Зонтичный» тип проявления фитоплазмозов древесных характерен для южных районов и можно часто наблюдать в природе, так и на пасторальных пейзажах европейских и русских художников с 15 века и на японских акварелях стиля «сансуй».

У древесных поражённых фитоплазмами также имеет место пирамидальный тип габитуса, плакучие, карликовые и стелящиеся формы, удачно используемые в декоративном садоводстве через вегетативные способы размножения.

Согласно современным представлениям, в многолетних растениях северного полушария фитоплазмы сохраняются в сосудах корней. Механизм патологического воздействия связан с закупоркой фитоплазмами ситовидных элементов флоэмы, что вызывает дисбаланс эндогормонов и пластических веществ. При недостатке влаги, концентрация эндогормонов увеличивается, что изменяет их механизм действия из стимулирующего рост в ретардантно-гербицидное. Это отражается в изменение габитуса растений. Избыток гормонов приводит к затормаживанию роста или отмиранию верхушки. В последующие более влагообеспеченные периоды или сезоны происходит стимуляция

роста пазушных побегов, что и вызывает повышенную кустистость, в том числе ведьмины мётлы. По нашему мнению, именно поэтому наиболее ярко фитоплазмозы проявляются на молодых и старо-возрастных растениях. В молодом возрасте деревья имеют слабо развитую поверхностную корневую систему, в связи с чем, растения в засушливые сезоны испытывает недостаток влаги, и как следствие они проявляют признаки фитоплазмоза. Интенсивный рост молодых древесных растений (без искусственного орошения) отмечается через 5 -10 лет после посадки, этот период связан с интенсивным развитием корней и достижением их уровня стабильной влагообеспеченности. С возрастом размеры кроны увеличиваются и при неизменном или уменьшающемся уровне влагообеспеченности и по ряду других сопутствующих причин опять интенсивно проявляются признаки фитоплазмозов, часто приводящие к гибели деревьев. По нашему убеждению фитоплазмы являются убиквистами для многолетних растений и могут определять срок жизни растений в конкретных климатических условиях. Для увеличения срока жизни старых деревьев закономерны омолаживающие формирующие обрезки, которые уменьшают размер кроны, а, следовательно увеличивают влагообеспеченность и уменьшают патологическое действие фитоплазм. Подобные обрезки приняты в частном и декоративном садоводстве. Вместе с тем, несмотря на то, что признаки повышенной кустистости растений являются типичными для фитоплазмозов, они не являются уникальными. Во влажные сезоны, и в районах с повышенной влагообеспеченностью, многие грибные паразиты способны вызывать также подобные признаки, в том числе ведьмину мётлу. Они характерны для тафриновых грибов на косточковых розоцветных, а также на березе и других древесных в центральных и северных областях. В данном случае ведьмины мётлы формируются на отдельных ветвях кроны и не охватывают всё дерево, а при микроскопировании обнаруживается спороношение гриба. Так, в образцах вишни с признаками ведьминой метлы, проанализированных ПЦР в 2013 г. фитоплазмы не выявлены, а при последующем микроскопическом анализе выявлено спороношение гриба. При фитоплазмозах, к примеру, у берёзы отмечается отмирание верхушек и последующее образование ведьминых мётел по всей кроне. Поэтому для достоверного анализа следует использовать молекулярные методы исследований. Тем не менее, даже при наличии типичных признаков фитоплазм на дереве, не всегда их можно выявить в образце. Признаки могли явиться результатом воздействия фитоплазм в прошлые сезоны, а условия текущего сезона не позволили достигнуть фитоплазмами верхушечных побегов, которые принято отбирать для анализа. За рубежом сообщается, что причиной отсутствия положительных данных при определении фитоплазм может быть также наличие в растениях и других флоэмных организмов бактериальной и грибной природы, антагонистически воздействующих на фитоплазмы.

В природных условиях переносчиками фитоплазм являются цикадки и псиллиды, известно также три случая их передачи клопами. Для определения распространения возможных переносчиков вирусных и фитоплазменных заболеваний в 2012 году проведены учёты комплекса насекомых на ряде древесных культур. Учеты проводились методом кошения сачком – по 4 взмаха (с каждой стороны света) на десяти деревьях, или 40 взмахов на один вид древесных. Результаты учётов (таблица 1) свидетельствуют о том, что сосущие насекомые на ряде видов являлись доминирующими и составляли в среднем 51% (0-86%). Количество их менялось в зависимости от даты учёта, вида дерева и биологических особенностей насекомых. Существенную роль могли играть и другие виды насекомых, половина из которых являлись хищниками и паразитами.

Из проанализированных видов деревьев наибольшая численность цикад была выявлена на вязе гладком и иве белой. Псиллиды в большем количестве встречались на берёзе пушистой, вязе гладком и тополе чёрном. Возможно, именно с этим связано наибольшее проявление признаков фитоплазмозов на данных породах деревьев. Вместе с тем, на яблоне в даты учётов количество сосущих насекомых не превышало 18- 62 % (от общего числа отловленных) с нарастанием их к концу августа. В Европе на яблоне имеет широкое распространение заболевание, вызываемое фитоплазмами группы пролиферации яблони (16SrX), вектором которого является яблоневая псиллида (Seemuller E. and Schneider B., 2004). Основным хозяином данного насекомого является яблоня, на которой псиллида сохраняется в виде яйца в зимний период, развивается в начальной стадии и мигрирует в период вегетации на травянистую растительность, возвращаясь осенью на яблоню для завершения развития и откладки яиц. В Самарской области псиллида в отдельные годы отмечалась на яблоне в массовом количестве (до 10 экз. на лист) до середины мая и с момента приобретения первыми листьями максимального размера покидала деревья. Замечено, что наибольшее количество псиллиды на яблоне отмечается в затенённых местах и загущенных старых посадках. Массовое возвращение их на деревья отмечается в середине августа, а в сентябре заметны повреждения на листьях. В сентябре 2013 г. на листьях отдельных сортов яблони количество псиллид достигало

1,5 - 2 экземпляров на лист. Так как учёты проводились вне указанных сроков, то и численность псиллид на яблоне выявлена не высокой – 1 - 3 экз. на 40 взмахов сачка. В 2013 г. при обследовании трёх садов в разных районах Самарской области признаки фитоплазменного поражения выявлены на 14 - 73% деревьев яблони (Богоутдинов, Белоусова, 2013)

Таким образом, в Самарской области России имеют широкое распространение фитоплазменные болезни древесных растений. Определены фитоплазмы трёх групп и их комплексы в 25 видах древесных и кустарниковых растений из 11 семейств. Охарактеризована фауна возможных переносчиков фитоплазм 17 видов древесных.

Автор выражает благодарность сотрудникам группы вирусологии ВНИИФ, проведшим молекулярные исследования образцов.

Литература

Богоутдинов Д.З., Белоусова О.А. Сравнительная поражённость сортов яблони заболеваниями. // Сборник статей международной конференции, Саратовский СГАУ, 2013, с.149-150.

Seemuller E. and Schneider B. «’Candidatus Phytoplasma mali’ sp. nov., ‘Candidatus Phytoplasma pyri’ sp. nov. and ‘Candidatus Phytoplasma prunorum’ sp. nov., the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectiviely.» Int. J. Syst. Evol. Microbioljgy, 2004, № 54, p.1217-1226.

Таблица 1.
Распространённость групп насекомых на древесных растениях

Вид растения	*Дата учёта*	*Сосущие насекомые**				*Другие*	∑	*Сосущие насекомые, %*
		Ц	*П*	*К*	*Т*			
Берёза повислая	05.06	3	8	43	12	12	78	85
	15.06	1	3	17	9	12	42	71
	29.07	1	0	16	1	12	30	60
Берёза пушистая	05.06	0	26	9	0	17	52	67
Вяз гладкий	05.06	**134**	**43**	11	0	30	218	86
	15.06	33	5	0	0	30	68	56
	27.06	7	2	3	0	22	34	35
Вяз мелколистный	05.06	3	12	27	0	12	54	78
	15.06	1	0	9	0	11	21	48
	24.08	12	2	2	1	12	29	59
Дуб черешчатый	27.05	0	2	2	0	11	15	27
	15.06	0	2	0	0	24	26	8
	24.08	0	0	0	0	9	9	0
Ель колючая	29.07	0	0	9	0	19	28	32
Ива белая	05.06	**113**	0	16	0	29	158	82
	24.08	15	1	0	0	28	44	36
Ива белая, плакучая форма	05.06	25	0	3	0	31	59	47
Липа сердцевидная	29.07	9	1	59	0	26	95	73
Липа крупнолистная	29.07	0	0	102	0	42	144	71
Плосковеточник восточный	29.07	1	3	0	6	10	20	50
Рябина обыкновенная	05.06	0	7	0	0	8	15	47
	15.06	0	1	0	1	6	8	25
	24.08	0	0	8	0	4	12	67
Сосна обыкновенная	05.06	1	2	0	7	13	23	43
	15.06	0	2	0	6	13	21	38
	24.08	7	1	0	0	10	18	44
Тополь чёрный	05.06	**18**	2	25	0	12	57	79
	15.06	0	**16**	1	0	7	24	71
	24.08	1	1	1	0	3	6	50
Тополь чёрный пирамидальный	29.07	1	1	10	0	8	21	62
Яблоня домашняя	05.06	0	3	0	0	14	17	18
	15.06	2	1	0	3	9	15	40
	24.08	4	3	5	0	8	21	62
Ясень обыкновенный	27.05	0	1	0	0	3	4	25

Примечание: * Ц - цикадки, П - псиллиды, К - клопы, Т - тли.

КОНТАМИНАЦИЯ РАСТЕНИЙ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ И ОЗДОРОВЛЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

А.Б. Бургутин[1], Л.А. Волкова[1], Н.А. Кузовова[1], А.Н. Игнатов[2], А.О. Марченко[6], Б.Н. Милкус[3], А.И. Сопин[1], В.И. Сусов[4], Д.В. Терешонок[1], Н.В. Феоктистова[1], С.Н. Чирков[5]

[1] Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва;
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Голицыно;
[3] Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова, Одесса;
[4] Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва;
[5] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет;
[6] Приморская государственная сельскохозяйственная академия, Уссурийск.
e-mail: burgutin@yahoo.com

CONTAMINATION OF PLANTS BY PHYTOPATHOGENIC MICROBES AND THEIR CONTROL IN CULTURE *IN VITRO*

A. Burgutin[1], L. Volkova[1], N. Kuzova[1], A. Ignatov[2], A. Marchenko[6], B. Milkus[3], A. Sopin[1], V. Susov[4], D. Tereshonok[1], N. Feoktistova[1], S. Chirkov[5]

[1] Instutute of Plant Physiology, Moscow;
[2] Russian Institute of Phytopathology, Bolshie Vyazemy;
[3] Institute of grapevine and wine production, Odessa, Ukraine;
[4] Russian State Agrarian University, Moscow;
[5] Moscow State University, Biology Faculty;
[6] Primorskaya State agrarian Academy, Ussuriisk.
e-mail: burgutin@yahoo.com

Summary

The present work describes establishing disease-free grapevine cultivars collection in vitro for Central Russia. Plants had particular traits after long-term sterile culture. Most common contaminating microbs were identified by 16S rRNA gene sequencing. The common sources of contamination were microbes from plant leaves, rhizosphere and human opportunistic pathogens.

Культура *in vitro* - наиболее эффективный способ освобождения растения от контаминации фитопатогенными микроорганизмами. Экономическое преимущество оздоровленного растительного материала однолетних и многолетних растений подтверждено достоверными данными и практикой (8). Такой подход применяется более полувека (7) для оздоровления значимых форм растений. В настоящее время, для большинства видов растений, используемых человеком в сельском и лесном хозяйстве, декоративном садоводстве, культура растения *in vitro* с привлечение термотерапии и чувствительных молекулярных методов выявления фитопатогенов стала повседневной практикой.

В нашей *in vitro* коллекции растений (картофель, виноград, черешня, хавортия и др.) некоторые формы поддерживаются более 30 лет. При применении щадящих условий в стерильной культуре, имеющиеся в коллекции формы картофеля, винограда, хавортии неоднократно возобновлялись в почвенной культуре в вегетационных условиях фитотрона Института физиологии растений (ИФР) РАН и подтверждалась их нативность и сортовая идентичность. Так, сорт винограда «Подарок Магарача», введенный в пробирочную культуру в 1981 году (1), неоднократно переводили в вегетационные условия оранжереи и опытного участка ИФР. Клоны этого крымского сорта с 2006 года вегетируют в горшечной культуре на открытой площадке Института (условия города Москвы), зимуют на улице (легкое почвенное укрытие корневой системы) и ежегодно, с 2010 года, дают урожай ягод. Отсутствие пяти важнейших вирусных болезней винограда для этого сорта установлено имунно-ферментным анализом. В совместной работе с Институтом им. Таирова (Одесса) введены в культуру in vitro ряд подвойных форм винограда и подтверждено для этих клонов отсутствие значимых вирусных болезней и агробактериальной контаминации (не опубликованные данные). О коллекции *in vitro* ряда генотипов виноградной лозы, условиях культивирования и способе адаптации к почвенной культуре сообщалось ранее (2, 5, 6).

С 2010 года ведется работа по созданию банка *in vitro* оздоровленных растений комплексо-устойчивых форм винограда для региона Центральной России. При подборе таких форм из существующего

ассортимента (http://vinograd.info/) учитывались следующие основные характеристики: раннеспелость, повышенная морозостойкость, устойчивость к грибным заболеваниям, качество урожая. В настоящее время на опытном участке ИФР в горшечной культуре вегетируют около 50 форм, полученных из разных регионов (Украина, Ставрополье, Белгородская область, Свердловская область, Подмосковье, Москва, Курган-Тюбе) из частных питомников, коммерческой сети и научно-исследовательских учреждений. Подтверждена сортовая идентичность некоторых испытуемых клонов (сорта: «Новый русский», «Галбена Ноу», «Галахад», «Таежный», «Агат донской», «Жаворонок», «Кристалл») и ряда гибридных форм. Клоны проверяются на зимостойкость в условиях открытого грунта на широте Москвы: из 20 растений, зимовавших в открытом грунте зимой 2012-2013 гг. выпадов не наблюдали; из 45 растений в зиму 2013-2014 гг. выпало 5 растений (из них два растения из Средне-Азиатского региона, что, по-видимому, закономерно). У части вновь поступающих клонов, вегетирующих на участке и в вегетационном домике отмечены явные признаки заболеваний по морфологическим показателям: резкое отставание в росте, пожелтение листьев, мозаичность листовых пластинок разного характера, скручивание листовой пластинки, искривление побегов и другие нарушения. Принятие достоверных решений о конкретной фитопатологии по визуальным признакам без анализа на индикаторных растениях не представляется возможным ввиду сильной изменчивости искомых характеристик. Привлечение растений-индикаторов требует длительных (порой многолетних) наблюдений, специальной квалификации и трудоемко (3). Намечено применение имунно-ферментного анализа и полимеразной цепной реакции. Для создания оздоровленного банка сортов к настоящему времени введены в пробирочную культуру десять генотипов (в виде 48 клонов).

Иной, конкретный результат, получен при анализе культуры *in vitro* черешни сорта «Овстуженка» и вишни сорта «Ливенская». Опуская детали введения в культуру и подбора условий мультиразмножения данных растений, тем более, что феноменология культуры *in vitro* косточковых известна (4), остановимся на проблемах эндогенной контаминации. В марте 2006 года при введении в культуру *in vitro* изолированных почек черешни и вишни отбирали клоны растений без визуальных признаков микробиологического «загрязнения» (визуальный тест на помутнение агаровой среды). Первые два-три субкультивирования полученных побегов контаминации не наблюдали. При дальнейшем культивировании для некоторых клонов наблюдали беловатую, либо желтоватую слизь в основании побега на поверхности питательной среды; в дальнейшем эта контаминация распространялась и в толще среды. При мультиразмножении и/или черенковании контаминированных побегов отмечали либо отсутствие контаминанта, либо возобновление заражения. При длительном пассаже некоторые клоны растений погибали. Постепенно все клоны черешни и вишни оказались контаминированы. Применение антибиотика клафорана (цифотоксим) вводимого в питательную среду в концентрации 500-700 мг/л привело к успеху в случае вишни (контаминация не наблюдалась в последующих субкультивированиях). Но для черешни окончательная картина была неоднозначна и со временем все клоны черешни *in vitro* оказались контаминированы и погибли; остались клоны черешни, переведенные к тому моменту в почвенную культуру. Для выяснения причины заражения и гибели растений проанализировали выделенную на питательной среде культуру контаминанта и пораженные ткани растений; бессимптомные ткани не анализировали. Были изучены несколько морфологических типов бактерий, выделенных из культуральной среды и тканей *in vitro* растений вишни и черешни и проведена их идентификация методом секвенирования фрагмента гена 16S rRNA. Выделенные бактерии представляли собой смесь различных видов и демонстрировали непостоянство биохимических и морфологических свойств. Для идентификации бактерий выделенная суммарная ДНК была амплифицирована с универсальными праймерами на ген 16S rRNA: 27F (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) и 765R (CTG TTT GCT CCC CAC GCT TTC). Продукты ПЦР были клонированы и секвенированы. Всего изучено 32 клона контаминант. Согласно наибольшему сходству с последовательностями, представленными в Генбанке, полученные клоны принадлежали бактериям следующих родов: для черешни – *Acinetobacter, Cupriavidus, Pseudomonas*; для вишни – *Burkholderia, Escherichia, Stenotrophomonas, Wautersia.* По предварительным данным нашего анализа источниками заражений растений *in vitro* являются ризосферная, эпифитная и эндофитная микрофлора растений и болезнетворная микрофлора человека.

Сохранившиеся в почвенной культуре растения черешни сорта «Овстуженка» были переданы в Мичуринский сад МСХА и высажены в питомник. Одно растение оставлено в ИФР для наблюдений. Растения в питомнике (в открытом грунте) и в ИФР (в горшечной культуре в открытом грунте) одновременно цвели (2011, 2012, 2013, 2014 гг.) и дали плоды в 2012, 2013 годах, таким образом демонстрируя ювенилизацию при введении в культуру *in vitro*. Растения вишни в горшечной культуре также зацвели не ранее, чем через пять лет, после высадки *ex vitro*.

Литература

1. Бургутин А.Б., Бутенко Р.Г., Катаева Н.В., Голодрига П.Я. Быстрое клональное размножение виноградного растения//С.- х. биология. 1983. № 7. С. 48-50.
2. Бургутин А.Б. Микроклональное размножение винограда//Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М. «Наука». 1991. С. 216-220.
3. Вирусные и вирусоподобные болезни винограда, часть 4 / В сборнике: Вирусные болезни ягодных культур и винограда. (перевод с англ.). М. «Колос». 1975. С. 264-383.
4. Высоцкий В.А., Алексеенко Л.В. Регенерация плодовых и ягодных растений в культуре каллусной ткани, пыльников, листовых и стеблевых эксплантов//Садоводство и виноградарство. 2008. № 2. С. 17-20.
5. Тищенко О.С., Бургутин А.Б. Культура апикальных меристем виноградной лозы//Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда. 7-ая Международная конференция. М. 25-28 ноября, 1997. С. 467-468.
6. Burgutin A.B., Butenko R.G., Mekhalevskaya O.B. Grapevine multiplication in vitro//Plant tissue and cell culture – application to crop improvement: Intern. symp.: Abstracts. Olomouc. 1984. P. 19.
7. Galzy R. Confirmation de la nature virale du courtnouéde la vigne par des essays de thermotherapy sur des cultures in vitro//C. r. Acad. sci. D. 1961. Vol. 253. P. 706-708.
8. Strange R.N., P.R. Scott P.R. Plant Disease: A Threat to Global Food Security//Annu.Rev.Phytopathol. 2005. 43:83-116

ПРОНИКНОВЕНИЕ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* ЧЕРЕЗ КОРНЕВУЮ СИСТЕМУ И ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТА

А.А. Ванькова, Л.А.Свиридова

Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А.Тимирязева
e-mail: mbiol@timacad.ru

PENETRATION OF *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VIA ROOTS AND INFLUENCE ON THE DEVELOPMENT OF TOMATO PLANTS

A.A. Vankova, L.A. Sviridova

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy
e-mail: mbiol@timacad.ru

Summary

Data reveal that phytoplasma Acholeplasma laidlawii can penetrate into tomato plants via roots from native soil, migrate up to oversoil parts of plants and persist there for a long time. The pathogens have been detected in leaves and stems for 75 days after infection by PCR method. The results prove that soil can play a role of transit habitat between sick and healthy plants. Persistence of infection agent in plant tissues call out morphological and physiological changes varied for different tomato sorts that genetically determined.

Фитоплазменные болезни сельскохозяйственных культур широко распространены во многих регионах РФ - Астраханской, Ульяновской, Саратовской, Самарской, Воронежской, Волгоградской, Московской, Новосибирской областях, Ставропольском и Алтайском крае. Возбудителями фитоплазменных заболеваний являются фитоплазмы – молликуты филогенетически близкие к родам *Anaeroplasma/Acholeplasma* (Kuske et al.,1992; Namba et al., 1993). Фитоплазмы вызывают более 600 заболеваний растений из 96 семейств (Борхсениус и др., 2002). В России зарегистрировано 416 видов растений с признаками фитоплазмозов (Богоутдинов, 2013). Фитоплазмозы наносят огромный ущерб сельскому хозяйству России, снижая урожай пшеницы на 80-90%, картофеля – на 18-20%, томатов и других пасленовых на 25-38% (Власов и др., 1985, 2000; Скрипаль, 1988; Борхсениус и др., 2002; Самсонова, 2000).

К наиболее распространённым и вредоносным фитоплазмозам относится столбур пасленовых, возбудителями которого являются фитоплазмы из группы столбура (16SrXII группа) (Богоутдинов, 2013). Столбур томатов (Marcone et. al, 1999; Власов и др., 2000; Angeline et. al, 2001), картофеля, баклажанов (Богоутдинов, 2013; Самсонова и др., 2001) распространен практически повсеместно. В годы эпифитотий столбура томата отмечено снижение урожая с одного растения при слабой степени развития болезни (хлоротическая форма столбура) - на 21-33%, при средней - на 55-77% и при сильной - до 97% (Власов и др., 2000). Поражение растений вызывает различные деформации цветка, вследствие этого цветок может быть стерильным. При проявлении заболевания после формирования

завязи плоды становятся несъедобными, а семена могут прорастать внутри плода (Богоутдинов и др., 2008). Инфицированность растений картофеля может достигать более 80%, что объясняют возможностью передачи инфекции клубнями (Можаева и др., 2013). Возбудитель может сохраняться в растительных остатках и почве (Тарр, 1975). Столбур распространён на всех табачных плантациях мира и, проявляясь ежегодно, может поразить до 50-60% растений табака (Виноградов и др., 2013).

Возбудитель столбура поражает растения и из других семейств (Маревых, Бобовых и др). На многолетних бобовых травах наиболее вредоносным заболеванием является фитоплазмоз («ведьмина метла») люцерны. Отмечено, что ареалы распространения и вредоносности столбура пасленовых и «ведьминой метлы» бобовых совпадают. Фитоплазмы сохраняются в зимний период в корнях многолетних растений, весной требуется сравнительно длительный период для перехода патогенов в вегетативные органы (Богоутдинов, 2013). Поскольку люцерна является незаменимой культурой в орошаемых овощных севооборотах пасленовых, она может быть главным резерватором возбудителей столбура.

Для разработки профилактических мер и способов борьбы с фитоплазменными болезнями растений необходимо знание особенностей циркуляции возбудителя в биоценозе. Ключевым вопросом в решении этой проблемы является способ передачи инфекционного агента. В наших предшествующих исследованиях (Ванькова и др., 2010) показано, что возбудитель фитоплазмоза *Acholeplasma laidlawii* может длительное время сохраняться в почве в жизнеспособном состоянии. Цель настоящего исследования – изучить возможность проникновения возбудителя в растения томата через корневую систему и влияние на рост и развитие растений. В качестве объектов исследования были выбраны 3 сорта томата *Lycopersicum esculentum* – Морковный, Золотая капля и Манимейкер. Проникновение *A. laidlawii* в растения через корневую систему изучали из водной суспензии и почвы.

При изучении способности внедрения *A. laidlawii* из водной суспензии 5-дневные проростки томатов выдерживали в течение суток в водной бактериальной суспензии с исходным титром 10^6 КОЕ/мл, а затем помещали по одному растению в стаканы со 100 г тепличного грунта (pH_{H_2O} 7,1). Опыт проводили в фитотроне при 18-часовом световом дне, температуре +22-24°С и освещённости 5 тыс. лк в 4-кратной повторности. Результаты ПЦР анализа показали присутствие *A. laidlawii* в надземной части 10-дневных проростков всех сортов. В последующие сроки отбора образцов положительный ответ зарегистрирован в растениях сортов Морковный и Манимейкер. В растениях же сорта Золотая капля присутствие *A. laidlawii* не установлено (Таблица 1). Это может быть связано с тем, что ткани растений сорта Золотая Капля обладают устойчивостью к фитопатогену в результате действия механизмов иммунной защиты, которые включаются в ответ на проникновение микроорганизма.

При изучении проникновения *A. laidlawii* через корневую систему в растения томата из почвы в стаканы с 25 г черноземной почвы равномерно вносили водную суспензию *A. laidlawii* (титр 10^9 КОЕ/г почвы), затем высаживали проросшие семена томата сорта Манимейкер. В качестве контроля служили растения, выращенные без внесения фитоплазм в почву.

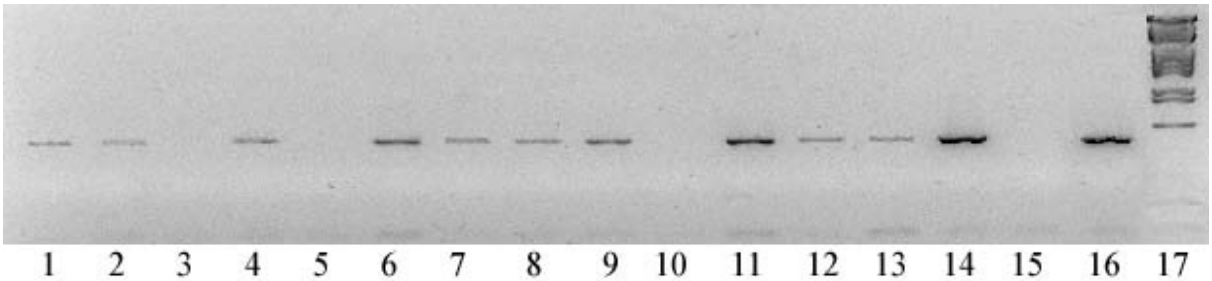


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов 3-х сортов томата через 10 дней после инфицирования.

1-4 - растения томата сорта Золотая капля, инфицированные *A. laidlawii* (4 повторности).
5 - неинфицированные растения томата сорта Золотая капля (контроль).
6-9 - растения томата сорта Морковный, инфицированные *A. laidlawii* (4 повторности).
10 - неинфицированные растения томата сорта Морковный (контроль).
11-14 - растения томата сорта Манимейкер, инфицированные *A. laidlawii* (4 повторности).
15 - неинфицированные растения томата сорта Манимейкер (контроль).
16 - чистая культура *A. laidlawii* (положительный контроль).
17 - маркер размеров ДНК

Таблица. 1.

Идентификация *A. laidlawii* в надземной части растений томата методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Сорт томата	*Срок отбора (дни)*				
	10	*14*	*18*	*22*	*75*
Морковный	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-
Золотая капля	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
Манимейкер	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-

инфицированное растение

контроль

Опыт проводили в фитотроне при 18-часовом световом дне, температуре +22…+24?С и освещённости 5 тыс. лк. в 3-кратной повторности. Для проведения анализа с помощью ПЦР отбирали в первый срок всё растение, в остальные – надземную часть и корни. Отбор проб растений проводили на 10, 14, 18, 22, 30 сутки после интродукции фитоплазм в почву. Присутствие фитоплазм в растениях установлено на 10, 14, 22, 30 сутки после интродукции. *A. laidlawii* может проникать из почвы в растение томата и мигрировать в надземные части растения. Проникновение фитоплазм в этом случае происходит через корневую систему томата непосредственно из почвы, так как это единственное звено контакта фитоплазм и растений. ДНК *A. laidlawii* обнаружена как в корнях, так и надземной части растений (Рис. 2). Таким образом, фитоплазмы могут проникать в растения через корневую систему непосредственно из почвы. Этот факт позволяет утверждать, что почва играет роль транзитной среды между зараженными и здоровыми растениями. В процессе онтогенеза фитоплазмы способны мигрировать от корней в надземные части растений и длительно в них сохраняться.

Влияние *A. laidlawii* на морфологические особенности томата изучали в условиях вегетационного опыта. Инфицирование растений проводили путем замачивания 5-дневных проростков в водной суспензии *A. laidlawii* как описано выше. Условия выращивания растений аналогичные. Контролем служили неинфицированные растения каждого сорта.

Результаты биометрических измерений растений в динамике показали, что длина эпикотиля и площадь листовой поверхности у инфицированных растений томата сортов Морковный и Манимейкер больше, чем у контрольных. У сорта Золотая капля достоверных различий между инфицированными и контрольными растениями по этим показателям не выявлено (Рис. 3, 4). В растениях томата этого сорта *A. laidlawii* выявлялась только в 1-й срок отбора проб – на 10-й день после инфицирования проростков. В последующие сроки анализа фитоплазмы не выявлялись, в то время как в растениях других сортов положительный ответ регистрировался в течение всего опыта (75 суток). Длительная персистенция *A. laidlawii* в вегетирующих растениях томата

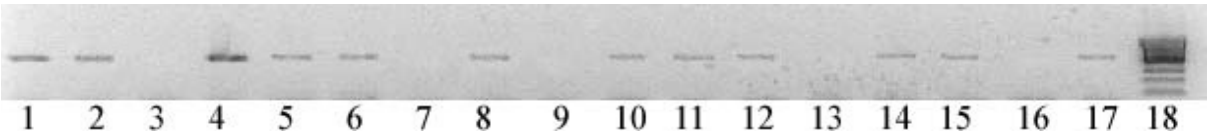


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов томата сорта Манимейкер. 1-3 – корни + надземная часть растений томата 10 дней после инфицирования *A. laidlawii*

4-6- надземная часть растений 14 дней после инфицирования *A. laidlawii*

7 - корни 14 дней после инфицирования *A. laidlawii*

8-10 - надземная часть растений 22 дня после инфицирования *A. laidlawii*

11- корни 22 дня после инфицирования *A. laidlawii*

12-14 - надземная часть растений 30 дней после инфицирования *A. laidlawii*

15 - корни 30 дней после инфицирования *A. laidlawii*

16 - неинфицированные растения томата, отрицательный контроль.

17 – положительный контроль - *A. laidlawii*. 18 - маркер размеров ДНК.

сортов Манимейкер и Морковный стимулировала их развитие: активизировала метаболические процессы и способствовала интенсивному росту растений, что, очевидно, связано с адаптационными реакциями организма-хозяина на инфекционный агент. В течение всего опыта инфицированные растения не обнаруживали характерных для фитоплазмозов симптомов таких как пожелтение, увядание, скручивание листьев, мелколистность, кроме более интенсивного роста растений.

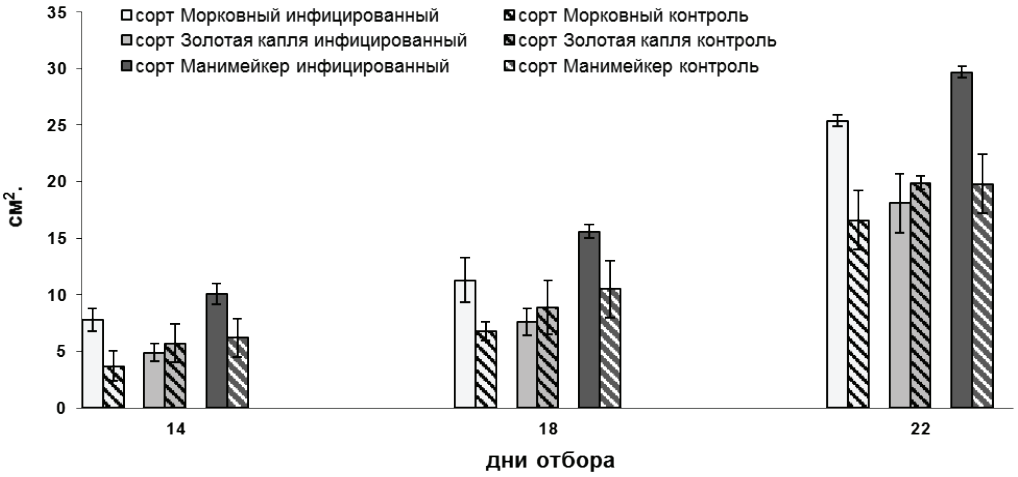


Рис. 3. Влияние *A. laidlawii* на площадь листовой поверхности растений томата.

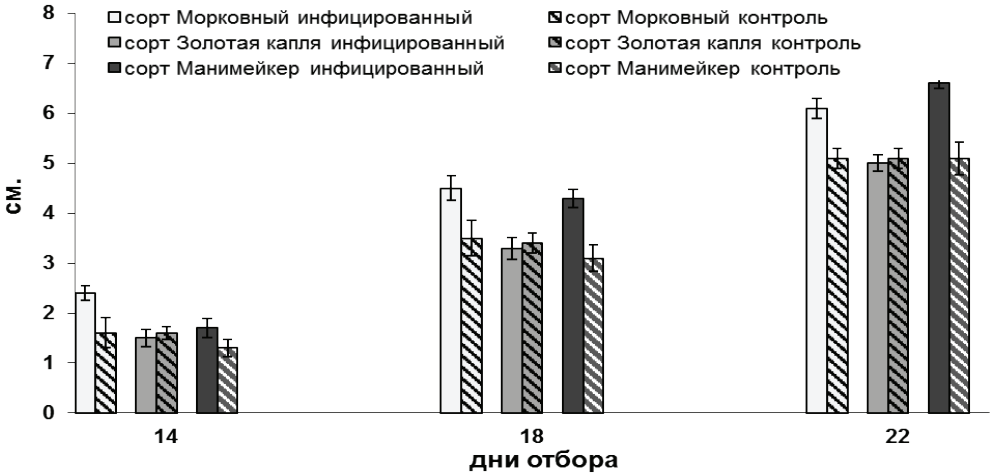


Рис. 4. Влияние *A. laidlawi*i на длину эпикотиля растений томата.

В рассматриваемой системе фитоплазма – растение важную роль играет реорганизация геномов взаимодействующих организмов. Известно, что фитоплазменные инфекции индуцируют образование перестроек в хромосомах растительных клеток (Борхсениус и др., 2002). Установлено также, что в процессе взаимодействия происходит трансформация ахолеплазм в некультивируемые формы, сопровождающаяся перестройками в их геноме. Фитоплазмы имеют очень высокий темп мутирования – до 10% в каждой генерации популяции оказываются мутантными. В этой связи персистенция в растительных клетках фитоплазм может обусловливать постоянный «всплеск» защитных реакций растения (окислительный взрыв и синтез физиологически высокоактивных соединений), которые и лежат в основе наблюдаемых морфофизиологических изменений. Что касается сорта Золотая капля, то в данном случае представляется возможным констатировать подавление микроорганизма иммунной системой растения. Отсутствие признаков инфекционного процесса у зараженных фитоплазмами растений позволяет предположить, что существенное значение для реализации фитоплазмоза имеет генотип растений. В этой связи особый интерес представляют генетически детерминированные факторы, определяющие невосприимчивость растений к фитоплазменным инфекциям, которые еще предстоит идентифицировать.

Литература

Богоутдинов Д.З. Ведьмина метла люцерны (фитоплазмоз): этиология болезни, состояние изученности // Вестник защиты растений. - 2013. - № 3. - С.26-33.

Богоутдинов Д.З., Д. Валюнас Д., Навалинскене М., Самуйтене М. О видовой идентификации возбудителей фитоплазмозов пасленовых культур // Сельскохозяйственная биология. - 2008. - N 1. - С.77-80.

Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. –С.-Пб:Наука, 2002.-320с.

Власов Ю.И., Гените Л.П., Самсонова Л.Н. Ахолеплазмы-патогены растений. – Вильнюс: Мин-во сельского хозяйства Литовской ССР, 1985.-76с.

Власов Ю.И., Самсонова Л.Н. Об устоичивости томатов к фитоплазменному заболеванию столбуру// Вестник защиты растений. -2000. №2.-С.26-28.
Ванькова А.А., Васильева Л.В., Свиридова Л.А. Поведение интродуцированной популяции *Acholeplasma laidlawii* в почве. Ученые записки Орлов. гос. университета. Серия: естественные, технические и медицинские науки, 2010. № 4 (38), С.63-70.
Виноградов В.А. Устойчивость сортов табака к столбуру // Защита и карантин растений. - 2013. - N 5. - С. 30-31.
Можаева К.А., Гирсова Н.В., Кастальева Т.Б. Особенности проявления фитоплазменных болезней в 2012г. // Защита и карантин растений. // Защита и карантин растений. - 2013. - № 4. - С.51-52 .
Самсонова Л.Н. Вредоностность и распространение фитоплазмозов // Агро XXI.-2000.-№5.-С.4-5.
Самсонова Л.Н., Цыпленков А.Е., Якуткина Т.А. Диагностика вирусных и фитоплазменных болезней овощных культур и картофеля.-СПб.: ВИЗР, ООО «Инновационный центр защиты растений», 2001.-48с.
Скрипаль И.Г. Микроорганизмы возбудители болезней растений. В: Микоплазмы Киев: Наукова Думка,1988.-С.326-372.
Тарр С. Основы патологии растений.-М.:Мир, 1975.
Angeline E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. Flavescence doree in France and Italy – Occurrence of closely related phytoplasma isolates and yellows and an alder yellows phytoplasma//Vitis.-2001.-Vol.40.№2.P. 79-86.
Kuske C.R., KirkpatrickB.C. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasmalike organisms and other prokaryotes established by 16S r RNA gene sequence//Int.J.Syst.Bacteriol.-1992.-Vol.42.-P.226-233.
Marcone C., Netmark H., Ragozzino A., Layer U., Seemuller E. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups// Phytopathology.-1999.-Vol.89.№9.-P.805-810.
Namba S., Jyaizu H., Kato S., Iwanami S., Tsuchizaki T. Phylogenetic diversity of phytopathogenic Mycoplasmalike Organisms//International Journal of Systematic Bacteriolog.-1993.-Vol.43.№3.-P.461-467.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

С.В. Виноградова[1,3], Е.И. Кырова[3], А.Н. Игнатов[1,2,3]
[1]Центр «Биоинженерия» РАН, Москва
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Голицыно
[3]Российский университет дружбы народов, Москва.
e-mail: an.ignatov@gmail.com

COMPLETE GENOME SEQUENCING OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

S.V. Vinogradova[1,3], E.I. Kyrova[2], A.N. Ignatov[1,2,3]
[1]Center “Bioengineering” of RAS, Moscow
[2]Ruaaian Research Institute of Phytopathology, Golicyno
[3]Russian Peoples’ Friendship University, Moscow.
e-mail: an.ignatov@gmail.com

Summary

Complete genomes were obtained for strains Rathayibacter festucae Ac-1390, Rathayibacter iranicus Ac-1602, Pseudomonas syringae 1845, Pseudomonas syringae 2507, Dickeya solani D12, Dickeya dianthicola D9, Xanthomonas arboricola 1392, Rathayibacter caricis Ac-179904, Clavibacter michiganensis sbsp michiganensis 1217 and Xanthomonas arboricola 3004.

Геномы фитопатогенных бактерий секвенировали методом шотгана на платформе GAIIx Illumina platform. Сборка нуклеотивов была выполнена с использованием комбинации Пакетов анализа (SOAP) De Novo (1) и Velvet (2).

Филогенетический анализ на основе последовательности генома проводили в сравнении с доступными геномами родственных видов бактерий с использованием программы Unus, RATT (3). Первичную аннотацию генов проводили при помощи программ FrameD, OrthoMCL (4, 5).

Геном *Xanthomonas arboricola* str. 3004. Сборка генома имеет общую длину 4 765 897 н.п., G/C состав 65,3 %. Мы частично аннотировали полученную геномную сборку, используя сервер RAST *132 контига длиной от* 98 173 до 528 н.п. и выявили 4 113 кодирующих последовательности и 55 РНК организованных в 450 “подсистем”. Наиболее близкородственный организм по структуре организации генома, определенный по базе данных RAST, основанной на нуклеотидной идентичности это *Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306*. Упорядочивание контигов было выполенено в программе Mauve Assembly Metrics 2.3.1. Геном частично аннотирован сервером RAST (rapid annotation using Subsistem technology). Предварительное число уникальных генов - 63. Для проверки надежности сиквенса был сделан Blastn анализ

с ранее секвенированными генными фрагментами для MLST/MLSA. Фрагменты генов *gyrB, dnaK, fyuA, rpoD, prpC, fabB, nrdB* были обнаружены и имеют 100% идентичность. Так же в последовательности генома с помощью сервера phast была найдена фаговая последовательность длиной 21 kb.

Геном штамма *Clavibacter michiganensis sbsp. michiganensis 1272* собран в контиги с помощью программы Velvet assembler 1.2.10. В результате получен геном, представленный 227 контигами. Длина наибольшего - 118 429 н.п., наименьшего - 710 н.п. В качестве референсного генома на основе результатов Blast был выбран геном *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* NCPPB 382.

Геном частично аннотирован сервером RAST (rapid annotation using Subsistem technology). Выявлено 2452 кодирующих последовательности. Предварительное число уникальных - 114. (Про)фаговых последовательностей не найдено.

Штамм *Pseudomonas syringae pv. syringae 1845.* Сборка дала геном, представленный 91 контигами. Длина наибольшего – 484 017 н.п., наименьшего 636 н.п. Упорядочивание контигов было выполенено в программе Mauve Assembly Metrics 2.3.1. Геном частично аннотирован сервером RAST (rapid annotation using Subsistem technology). Выявлено 5277 кодирующих последовательностей. Предварительное число уникальных – 164. Найдена 18.9 kb последовательность фага Entero SfV.

Dickeya dianthicola D12. Сборка дала геном, представленный 36 контигами. Длина наибольшего – 855 988 н.п., наименьшего 550 н.п. Упорядочивание контигов было выполенено в программе Mauve Assembly Metrics 2.3.1. В качестве референсного генома на основе результатов Blast был выбран геном *Dickeya dadantii* 3937.

Геном частично аннотирован сервером RAST (rapid annotation using Subsistem technology). Выявлено 4649 кодирующих последовательностей. Предварительное число уникальных - 95. Найдена 14,1 kb последовательность фага PHAGE *Feldma species virus.*

Pseudomonas syringae pv. syringae #2. В результате сборки получен геном, представленный 97 контигами. Длина наибольшего – 393 775 н.п., наименьшего 559 н.п. В качестве референсного генома на основе результатов Blast был выбран геном *Pseudomonas syringae pv. syringae* B728a. Геном частично аннотирован сервером RAST (rapid annotation using Subsistem technology). Выявлено 5485 кодирующих последовательностей. Предварительное число уникальных – 164. Найдена 27.5kb последовательность фага Entero BA14.

Штамм PA1393/1 связанный с растениями зараженными *Xanthomonas* sp. В результате сборки получен геном, представленный 121 контигами. Длина наибольшего – 239 990 н.п., наименьшего 508 н.п. Упорядочивание контигов было выполенено в программе Mauve Assembly Metrics 2.3.1. В качестве референсного генома на основе результатов Blast был выбран геном *Pantoea vagans* C9-1.

Геном частично аннотирован сервером RAST (rapid annotation using Subsistem technology). Выявлено 4777 кодирующих последовательностей. Найдена 34.3 kb последовательность фага Salmon SP 004.

Stenotrophomonas maltophilia SD23, связанный с растениями зараженными *Dickeya sp.* Получен геном, представленный 36 контигами. Длина наибольшего – 855 988 н.п., наименьшего 550 н.п. Упорядочивание контигов было выполенено в программе Mauve Assembly Metrics 2.3.1. В качестве референсного генома на основе результатов Blast был выбран геном *Stenotrophomonas maltophilia* JV3.

Геном частично аннотирован сервером RAST (rapid annotation using Subsistem technology). Выявлено 4924 кодирующих последовательностей. Предварительное число уникальных - 129. Найдена 12,1 kb последовательность фага PHAGE Burkho ST79.

Геном штамама 3004 был депонирован в генбанк: WGS submission SUB402092, submission ID SUB402092, accession number AZQY00000000.

Поиск генов-кандидатов, обуславливающих широкий спектр растений-хозяев

Для поиска генов кандидатов, было выполнено выравнивание на геном более специфичного штамма соответствующего рода. Выравнивание генома *Xanthomonas arboricola* str. 3004 было выполнено против референсного генома *Xanthomonas axonopodis pv. Citr*i 306, по алгоритму Progressive Mauve. По предварительным данным были обнаружены уникальные последовательности в позиции 4 636 244-4 765 897. Число уникальных последовательностей 80, из них 4% организованы в подсистемы.

Основные функции уникальных подсистем приведены в таблице:

Virulence, Disease and Defense	Resistance to antibiotics and toxic compounds	Cobalt-zinc-cadmium resistance	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA	fig|6666666.53917.peg.11
Virulence, Disease and Defense	Resistance to antibiotics and toxic compounds	Cobalt-zinc-cadmium resistance	Cation efflux system protein CusA	fig|6666666.53917.peg.11
Stress Response	Osmotic stress	Synthesis of osmoregulated periplasmic glucans	Cyclic beta-1,2-glucan synthase (EC 2.4.1.-)	fig|6666666.53917.peg.2

Так как в кластере уникальных последовательностей генов, возможно относящихся к генам вирулентности нами обнаружено не было, то был проведен Blast-анализ против генов T3SS системы Xanthomonas. Так как гомологии ни по одному из известных генных фрагментов обнаружено не было, то данный штамм считается не специфичным к растению-хозяину и способен поражать широкий круг растений.

Выравнивание генома Pseudomonas str. 2 было выполнено против референсного генома Pseudomonas syringae pv. syringae B728a . По предварительным данным были обнаружены уникальные последовательности в позиции 5 724 019- 5 944 881. Предварительное число уникальных последовательностей 172. 17% из них организованы в подсистемы (8 подсистем). 146 последовательностей не имеют системной градации.

Для исследуемых штаммов рода *Pseudomonas* были найдены гены системы секреции IV типа, не присущие более специализированным штаммам этого рода. Таким образом, они являются генами-кандидатами обуславливающими возможность поражение широкого круга растений.

Литература

1. Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z, Li Y, Li S, Shan G, Kristiansen K, Li S, Yang H, Wang J, Wang J. 2010. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. Genome Res. 20:265–272.
2. Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res. 18:821– 829.
3. Otto TD, Dillon GP, Degrave WS, Berriman M. 2011. RATT: rapid annotation transfer tool. Nucleic Acids Res. 39:e57.
4. Schiex T, Gouzy J, Moisan A, de Oliveira Y. 2003. FrameD: a flexible program for quality check and gene prediction in prokaryotic genomes and noisy matured eukaryotic sequences. Nucleic Acids Res. 31:3738–3741.
5. Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome Res. 13:2178 –2189.

ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛОМА В РЕЗУЛЬТАТЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ PHYSCOMITRELLA PATENS

С.В. Виноградова[1,2], А.Н. Князев[3], Г.П. Арапиди[4],И.А. Фесенко[4], Е.Р. Закиев[4], Р.А. Хазигалеева[4], А. Шаварда[5], А.Н. Игнатов[1,2,6]

[1] Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, Москва; [2] Российский Университет Дружбы Народов, Москва;
[3] Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва;
[4] Институт биоорганической химии Российской академии наук, Москва;
[5] Санкт-Петербургский государственный университет, Научно-исследовательский центр ресурсов для молекулярной и клеточных технологий, Санкт-Петербург;
[6] Всероссийский НИИ фитопатологии, Б. Вяземы, Московская область

e-mail: coatprotein@bk.ru

METABOLOME CHANGES DUE TO BACTRIAL PATHOGEN ATTACK ON PHYSCOMITRELLA PATENS

Vinogradova S.V. [1,2], Kniazev A.N.[3], Arapidi G.P.[4], Fesenko I.A.[4], Zakiev E.R.[4], Khazigaleeva R.A.[4], Shavarda A.[5], Ignatov A.N. [1,2,6]

[1] Centre “Bioengineering” of Russian Academy of Sciences, Moscow;
[2] Peoples’ Friendship University of Russia, Moscow, Russia; [3] Russian Timiryazev State Agrarian University, Moscow;
[4] Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow;
[5] Saint-Petersburg State University, Research Resource Center for Molecular and cell technologies, St. Petersburg;
[6] Russian Research Institute for Phytopathology, B.Vyazyomy, Moscow Region

Summary

Physcomitrella patens is a convenient system to study plant-pathogen interactions and functional analysis of plant immune system genes and their evolution. But limited information is available on phytopathogenic bacteria infection strategies of P. patens and defense mechanisms activated by invasion. We have evaluated the virulence of several species of pathogenic bacteria to P. patens and optimized the method of its in vitro inoculation. 6-weeks old moss gametophores were inoculated by several phytopathogenic bacteria: Xanthomonas campestris pv. campestris, X. c. pv. armoraciae, X. c. pv. raphani, X. arboricola, Pseudomonas syringae, P. viridiflava, Pantoae vagans. After inoculation we made metabolome profiling of inoculated gametophores.

This work was supported by RFBR research project No.13-04-40104-H.

Мхи *(Bryophytes)* отделились от последнего общего предка с покрытосеменными растениями более чем 450 млн лет назад. Сравнительное изучение реакции мхов на заражение фитопатогенов помогает понять эволюцию механизмов устойчивости – метаболитов и генов, контролирующих их синтез во время патогенеза.

После получения полной последовательности генома мох *Physcomitrella patens* стал привлекательной моделью для изучения генов растений, участвующих в реакции на стресс. Цель нашей работы – найти новые способы повышения устойчивости растений к биотическим стрессом. Ранее, была изучена реакция гаметофоров *Physcomitrella patens* к некротрофным патогенам с широким спектром хозяев патогенов (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* и некоторым грибам), которые убивают ткани хозяина производя ферменты и токсины, и используют содержимое умирающих клеток. Это исследование посвящено изучению накопления вторичных метаболитов в рамках запуска защитных механизмов *P. patens,* индуцированных инокуляцией специфичных патогенных бактерий *Pseudomonas syringae, Xanthomonas arboricola* и невирулентного патогена *Xanthomonas campestris* в сравнении с непатогенной бактерией *Pantoea vagans.* Гаметофоры *Physcomitrella patens* выращивали на агаризованной среде Кнопа и заражали штаммами *Pseudomonas syringae* (2 шт.), *Xanthomonas arboricola* (2), *Xanthomonas campestris* (4) и не патогенной бактерией *Pantoea vagans* как описано ранее (Schaad и др., 2001). Все штаммы были получены из коллекции Центра «Биоинженерия» РАН, их видовая принадлежность была подтверждена мультилокусным или полногеномным секвенированием. Растительный материал был собран в течение 10 дней после инокуляции. Профилирование первичных метаболитов проводили с помощью масс-спектрометрии методом газовой хроматографии (ГХ-МС), как описано ранее (Lisec и соавт. 2006). В общей сложности были обнаружены 28 различных метаболитов, имеющие концентрацию выше, или меньше, чем в контроле (инокуляция водой): Непатогенные бактерии *P. vagans* не влияли на обменные процессы в *Physcomitrella patens*. Все патогенные бактерии индуцировали накопление глицерина, глицерин-фосфата, глюкозы, миоинозитола. Глицерин-3-фосфат (G3P) является важным компонентом метаболических процессов углеводов и липидов. Существуют доказательства того, что уровень G3P в растениях связан с защитной реакцией растений против патогена *Colletotrichum higginsianum*. Мио-инозитол является важным питательным веществом, который используется для построения фосфатидилинозита и его производных у эукариот (Schaaf и др. 1995). При специфическом взаимодействии между мхом и *Pseudomonas syringae* мы обнаружили увеличение концентрации трегалозы, треонина, лионил-карнитина (AC18: 2N6) и снижение малата, кампестерола, стерол-карнитина (AC18: 0) и фитола. В случае специфического взаимодействия между растением и 5-ю штаммами *Xanthomonas campestris* дисахарида накапливались выше контроля, а фитадиен – снижался. В специфическом взаимодействии между растением и *Xanthomonas arboricola* аккумулировались гликозиды. В целом можно заключить, что *Xanthomonas* сатре*stris* не вызвал защитную реакцию *Physcomitrella patens*, но был способен стимулировать синтез соединений, необходимых для размножения бактерий в растении. *Pseudomonas syringae* индуцировал соединения, участвующие в системной устойчивости растений, и снижал уровень соединений важных для местной реакции некроза, и стимулировал метаболиты необходимые для размножения бактерий в растениях. Этот вид был самым агрессивным возбудителем заболевания мха и вызвал симптомы некроза на поздней стадии взаимодействия растение-патогена. *X. arboricola* вызвало сильнейшее накопление нескольких важных для размножения бактерий в растениях, роста растений и системных метаболитов устойчивости.

Работа была поддержана грантом РФФИ No.13-04-40104-Н.

Литература

1. N.W. Schaad, J.B. Jones, and W. Chun (Eds.) 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition
2. Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nat. Protoc. 1, 387–396 10.1038/nprot.2006.59
3. Jorg Schaaf, Michael Herbert Walter, and Dieter Hess. Primary Metabolism in Plant Defense. Plant Physiol. (1995) 108: 949-960

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ СЕМЯН КАПУСТЫ ОТ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА

Во Тхи Нгок Ха, Ф.С. Джалилов
РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, e-mail: labzara@mail.ru

USE OF ESSENTIAL OILS FOR DISINFECTION OF CABBAGE SEED FROM BLACK ROOT

Vo Thi Ngoc Ha, F.S. Dzhalilov
Russian State Agrarian University – MTAA, e-mail: labzara@mail.ru

Summary

Screening of the antagonistic activity against the black rot pathogen of cabbage was carried out for 31 samples of essential oil using disk method. The largest sterile zone was obtained for mountain savory, thyme and oregano, test with resazurin was used as control and showed the least activity. These oils application for treatment of the inoculated by pathogen seed significantly reduced the number of viable cells of bacteria on seeds and disease progress on seedlings of cabbage.

Среди болезней капусты сосудистый бактериоз, вызываемый *Xanthomonas campestris pv.campestris* (Xcc), относится к числу наиболее распространенных и вредоносных [1,9,10].

В настоящее время ни одно из рекомендованных средств предпосевной обработки семян (гидротермическая обработка, обработка биопрепаратами Фитолавин, Гамаир и др.) не обеспечивает полного обеззараживания партий семян с высокой зараженностью возбудителем сосудистого бактериоза [2, 3]. Поиск таких средств продолжает оставаться актуальной задачей.

Известно, что эфирные масла проявляют антибактериальное действие по отношению к патогенам человека, животных и растений [6, 7, 8].

Настоящая работа посвящена поиску эфирных масел, способных эффективно снижать зараженность семян сосудистым бактериозом.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- скрининг эфирных масел различных растений по бактерицидному действию *in vitro* по отношению к *X.campestris pv. campestris*;
- оценка эффективности эфирных масел, показавших наибольшую бактерицидную активность *in vitro*, в борьбе с семенной инфекцией.

В работе использовали штамм Xcc 276 NZ, который относится к расе 1. Хранение бактерий проводили двумя способами: в стерильной воде при комнатной температуре и в 15% -м глицерине при -70°С. Для проведения экспериментов бактерии культивировали на среде Кинг Б [5].

Для тестирования использовали эфирные масла 31 вида растений производства ООО «Сириус» (Белгородская обл.), ООО «ТОССА» (Москва) и «Стикс натуркосметик» (Австрия).

Первичный скрининг эфирных масел на антибактериальную активность проводили методом дисков [6].

Для более точной количественной оценки антибактериального эффекта определяли минимальную ингибирующую концентрацию (MIC) в тесте с резазурином [11].

Резазурин (натриевая соль) - ароматическое соединение, имеющее формулу $C_{12}H_7N_1O_4$ и представляющее собой окислительно-восстановительный индикатор. Тест с резазурином используется для выявления бактериального заражения молока, жизнеспособности клеток и в других целях.

Принцип метода заключается в том, что краситель резазурин при наличии роста бактерий окисляется, превращаясь во флуоресцирующий резофурин и меняет цвет питательной среды с синего на розовато-лиловой, а потом на розовый.

Показавшие наивысшую антибактериальную активность в условиях *in vitro* эфирные масла были отобраны для обработки зараженных сосудистым бактериозом семян. Эмульсии масел в воде в концентрациях 0,9 %, 0,45 % и 0,15 % были приготовлены обработкой ультразвуком на приборе Sartorius Labsonic M при экспозиции 20 секунд и амплитуде 70 %.

Инокуляцию семян возбудителем сосудистого бактериоза проводили в условиях вакуума, как было описано ранее [4]. Затем семена подсушивали при комнатной температуре 24 часа и замачивали в эмульсиях эфирных масел на 30 минут. В качестве положительного контроля зараженные семена замачивали в воде, а отрицательным контролем служили здоровые семена, замоченные в воде. После обработки и подсушивания на фильтровальной бумаге из семян экстрагировали возбудителя. Проводили посев 100 мкл из каждого разведения экстракта семян на селективную среду с крахмалом [5]. Подсчет гидролизующих крахмал колоний проводили через двое суток. В сомнительных случаях использовали раствор Люголя.

Рассчитывали количество колониеобразующих единиц бактерий в исходном экстракте (КОЕ/мл).

Для оценки биологической эффективности обработки эфирными маслами семена высевали в торфяной субстрат в 49-и ячеечные рассадные кассеты. Температура в период эксперимента в теплице составляла 20-26°С. Проводили учет лабораторной и оранжерейной всхожести семян, а также зараженности рассады сосудистым бактериозом. Опыт проводили в двух повторностях по 49 растений в каждой.

В качестве эталона использовали рекомендованный для предпосевной обработки от сосудистого бактериоза Фитолавин, ВРК, 0,2%. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом дисперсионного анализа со сравнением средних по критерию Дункана анализа с помощью пакета Statistica 6.0.

Из всех испытанных эфирных масел при тестировании методом дисков лишь масло сантала белого и табака обыкновенного не дали стерильной зоны (она была равна 6мм, т.е. диаметру самого диска). У остальных масел размер стерильной зоны варьировал от 10,2 мм у шалфея лекарственного до 52,4 мм у чабера садового.

Корреляционный анализ выявил тесную связь между размером стерильной зоны и минимальной ингибирующей концентрацией, r_1 = -0,837, m_r = 0,105, p ≥99%.

У тестированных образов эфирных масел минимальная ингибируюшая концентрация варьировала от 1,0 до 0,125%. Для оценки эффективности обработки семян были отобраны масла с минимальной ингибирующей концентрацией по отношению к *Xcc* равной 0,125%. В эту группу попали чабер горный, тимьян обыкновенный и душица обыкновенная.

Учет содержания КОЕ патогена в экстрактах семян после обработки показал, что эффективность испытанных эфирных масел была достоверно выше эталонного варианта, т.е. содержание жизнеспособных клеток патогена на семенах после замачивания их в эмульсиях эфирных масел тимьяна обыкновенного, душицы обыкновенной и чабера горного было существенно ниже, чем варианте с обработкой семян фитолавином, ВРК и положительным контролем. Между эффектами трех видов масел в трех испытанных концентрациях не было установлено существенных различий.

Обработка эфирными маслами не привела к существенному изменению лабораторной и оранжерейной всхожести. Масло тимьяна обыкновенного, душицы обыкновенной и чабера горного при предпосевной обработке семян значительно снизили зараженность рассады капусты. Биологическая эффективность этой обработки варьировала от 55,9% до 86,5% и статистически не отличалась от эталона – фитолавина, ВРК.

Была обнаружена тесная связь между содержанием КОЕ возбудителя в экстракте семян после обработки и зараженностью рассады, r = 0,816; m_r = 0,193; p ≥ 99%.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлена перспективность использования эфирных масел тимьяна, душицы и чабера против сосудистого бактериоза капусты. Этот прием может занять свое место в технологиях выращивания экологически безопасной продукции, а также в личных подсобных хозяйствах. Впоследствии, после идентификации физиологически активных веществ, содержащихся в этих маслах, которые ответственны за проявление антибактериального эффекта, возможно создание нового поколения бактерицидов для использования в защите растений от бактериальных инфекций.

Литература

1. Джалилов Ф.С., Монахос Г.Ф., Тивари Р.Д. Вредоносность сосудистого бактериоза капусты // Известия ТСХА. 1989. Вып.3. С.169-172.
2. Джалилов Ф.С., Тивари Р.Д., Андреева Е.И., Амосова С.В., Иванова Н.И. Эффективность гидротермической обработки и протравливания семян капусты против сосудистого бактериоза // Известия ТСХА. 1989. Вып.5. С.102-105.
3. Джалилов Ф.С., Во Тхи Нгок Ха Защита капусты от болезней в период вегетации //Картофель и овощи. 2014. № 1. С. 20-23.
4. Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н., Варицев Ю.А. Усовершенствование диагностики зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза методом иммуноферментного анализа // Известия ТСХА. 2009. Вып.1. С. 66-72.
5. Laboratory guide for identification of plant-pathogenic bacteria /Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. eds. 3rd ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul. Mn., 2001.
6. Marina S., Jasmina G., Petar D.M., Dejan B., Leo J.L.D. van Griensven Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *In Vitro* model // Molecules. 2010. V. 15. P. 7532-7546.
7. Nevas M., Korhoven A., Lindstrom M., Tupkki P., Korkeala H. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria // Journal of food protection. 2004. V.67. No.1. P. 199-202.
8. Pradhanang P. M., Momol M. T., Olson S. M. and Jones J. B. Effects of plant essential oils on Ralstonia solanacearum population density and bacterial wilt incidence in tomato // Plant Disease. 2003. V.87. P. 423-427.
9. Schaad N.W., Sitterly W.R., Humaydan H. Relationship of incidence of seedborne Xanthomonas campestris to black rot of crucifers // Plant Disease. 1980. V.64. №1. P. 91-92.
10. Williams P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers // Plant Disease. 1980. V. 64. № 8. P.736-742.
11. Van der Wolf J.M., Birnbaum Y., P.S. Van der Zouwen, Groot, S.P.C. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts // Seed science and technology. 2008. V.36. P. 76-88.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА В РОССИИ: ПОЛИМОРФИЗМ ПЦР ФРАГМЕНТОВ

Во Тхи Нгок Ха[1], Ф.С. Джалилов[1], С.В. Виноградова[2], Е.И. Кырова[2,3], А.Н. Игнатов[2,3]

[1] РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, e-mail: labzara@mail.ru
[2] Центр Биоинженерия РАН, Москва.
[3] Университет дружбы народов, Москва

GENETIC DIVERSITY OF BLACK ROT PATHOGEN IN RUSSIA: PCR POLYMORPHISM

Vo Thi Ngoc Ha[1], F.S. Dzhalilov[1], S. Vinogradova[2], E. Kyrova[2,3], A. Ignatov[2,3]

[1] Russian State Agrarian University – MTAA, e-mail: labzara@mail.ru
[2] Center "Bioengineering" RAS
[3] People's Friendship University, Moscow

Summary

Black rot of brassicas is one of the most devastating diseases of vegetables across the World. Comparison of the pathogen strains collected at 2012 in different regions of Russia and other former USSR countries to the previously studied population (86 strains in total) by PCR amplification with several random and gene-specific primers showed considerable genetic change occurred between 2007 and 2012. The population genetic parameters indicates higher genetic uniformity of new strains.

Капустные растения (семейство *Brassicaceae*) поражаются многими фитопатогенами, и одним из наиболее вредоносных организмов является бактерия *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Pam. (Dow.) (далее *Xcc),* вызывающая сосудистый бактериоз. Штаммы *Xcc*, делятся на физиологические расы, серотипы и генотипы (Игнатов, 2006). Ранее, нами были изучены популяции Xcc из различных географических зон мира. В 2006–2012 гг. был проведен сбор новых штаммов патогена, которые и были изучены в данной работе.

Коллекция, собранная для анализа включала 86 штаммов, выделенных из разных географических регионов, в основном в РФ, в 2006–2012 гг. (Таблица 1). Ряд штаммов из международных коллекций был включен для сравнения с Российскими штаммами.

Таблица 1.
Штаммы, использованные в работе

№	*Название штамма*	*Год*	*Координаты*	*Место происхождения, культура*
1-3	DK-1, DK-2, DK-3	10.2012	54°55′00″ с. ш. 37°24′00″ в. д.	Серпуховский.р-н МО, капуста
4-15	Ram – 1-1, Ram – 1-2, Ram – 1-3, Ram – 2-1, Ram – 2-2, Ram – 2-3, Ram – 3-1, Ram – 3-2, Ram – 3-3, Ram – 4-1, Ram – 4-2, Ram – 4-3	10.2012	55°34′00″ с. ш. 38°13′00″ в. д.	Раменский р-н МО, капуста
16-18	B-1, B-2, B-3	09.2012	55°37′54″ с. ш. 38°05′26″ в. д.	ОПХ Быково МО, капуста
19-21	Tir1, Tir2, Tir3	11.2012	46°50′25″ с. ш. 29°38′36″ в. д.	Город Тирасполь Молдова, капуста
22-25	ХУ-1-1, ХУ 1-2, ХУ 2-1, ХУ 2-2	10.2012	46.63333_N_ 32.60000001_E	Город Херсон Украина, капуста
26-28	DB-1, DB-2, DB-3	10.2012	54°55′00″ с. ш. 37°24′00″ в. д.	Серпуховский р-н МО, капуста
29-33	177NZ, 276NZ, NZ276, 306NZ, NZ306	-	51.710863, 4.839478	Nickerson Zwaan, капуста
34	Eruca	2005	-	США, руккола
35-37	Xok-1, Xok-2, Xok-3	09.2006	45°02′00″ с. ш. 38°59′00″ в. д.	Краснодарский край, капуста

38-43	Tr1, Tr2, Tr3, Tr4, Tr5, Tr6	-	46°50′25″ с. ш. 29°38′36″ в. д.	Тирасполь, Молдова, капуста
44	L_1	-	59°57′00″ с. ш. 30°19′00″ в. д.	Ленинградская обл., капуста
45	A5	2001	55°45′06″ с. ш. 37°37′04″ в. д.	Московская обл, капуста
46	ex 528=NCPPB528T	1957	-	Великобритания, капуста
47-51	Tlo-1, Tlo-2, Tlo-3, Tlo-4, Tlo-5	08.2007	54°12′00″ с. ш. 37°37′00″ в. д.	Тульская обл. , капуста
52	AF-2	2001	55°45′06″ с. ш. 37°37′04″ в. д.	Москва, капуста
53	11390	-	-	Бразилия, капуста
54	11392	-	-	pv. *aberrans*, капуста
55	04-29-B1	2004	-	США, Калифорния, капуста
56	33437	-	-	pv. *raphani* США, Wisconsin, редис
57	11386	-	-	Бразилия, капуста
58	53-4	03.2005	-	США, Калифорния, горчица
59	Bul-K	1999	-	Германия, капуста
60	T5	2007	54°12′00″ с. ш. 37°37′00″ в. д.	Тульская область, капуста
61	Lix16	09.2006	55°05′00″ с. ш. 38°47′00″ в. д.	Коломенск. р-н МО, капуста
62	Xn-13	1997	-	Япония, капуста
63	P4110	1998	-	Германия, капуста
64-65	Bun-1, Bun-2	09.2006	56°21′00″ с. ш. 37°32′00″ в. д.	Дмитровский р-н МО, капуста
66-76	Bel-2, Bel-3, Bel-4, Bel-4-1, Bel-4-2 Bel-4-3 Bel-4-4 Bel-5, Bel-6, Bel-7, Bel-8, Bel-9	10.2006	53°55′00″ с. ш. 27°33′00″ в. д.	Белоруссия, капуста
77-86	Dasch-1 -1, Dasch -1-2, Dasch-2, Dasch-4, Dasch-4 белый, Dasch-4 желтый, Dasch-5, Dasch-8, Dasch-9, Dasch-10	09.2006	54°55′00″ с. ш. 37°24′00″ в. Д	Серпухов.р-н МО, капуста

Результаты амплификации всех штаммов с независимыми (BOXA, ERIC) консервативными (JEL1/2, iaaH,) и специфичными праймерами были проанализированы различными методами (Таблица 2, Рис. 1).

Формальный анализ результатов ПЦР со специфичными праймерами для вида *Xanthomonas campestris* на гены Xcc007-tonB, wxcO, cyt186 (cytP450), на патоварианты *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* и на сцепленный с признаком симптомов листовой пятнистости геном *xopAD* показал, что большинство из 86 штаммов дали положительную реакцию с праймерами на мишени Xcc007-tonB, wxcO, cyt186 (cytP450). Только 52 штамма дали положительную реакцию со специфичными праймерами для патоварианта *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и 11 штаммов - положительную реакцию со специфичными праймерами для патоварианта *Xanthomonas campestris* pv. *raphani.* Вместе с тем, 21 штамм дали аплификацию с праймерами для гена *XopAD,* сцепленного со специфичным локусом *Xanthomonas campestris* pv. *raphani.* Построенное по всей совокупности ПЦР маркеров дерево (Рис. 1) показало достоверное различие штаммов, собранных в 2012 г. (Группа 1) в нескольких регионах РФ от штаммов, собранных в 2006-2007 гг. в тех же регионах. Причем, штаммы группы 1 были наиболее близки к типовым штаммам рас *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, предоставленных компанией Nickerson Zwaan (Нидерланды) в 2009.

Можно предположить, что либо данная группа обладает существенными преимуществами в условиях более жаркой погоды, наблюдавшейся в РФ с 2010 г., либо она преимущественно распространяется вместе с семенами капустных культур, в основном производимых за пределами РФ. Проведенный сравнительный анализ генетического разнообразия внутри и между группами штаммов 2012 и 2006-2007 гг. (Таблица.3) показал существенное снижение разнообразия внутри группы 2012 г. (0.19 против 0.22) и существенное удаление ее от группы 2006-2007 гг. (0.28).

Таблица 2.
Результат амплификации 86 штаммов *Xanthomonas campestris* со специфичными праймерами

№ п.п.	*Название штамма*	*Xc* Xcc007-TonB*	*WXCO*	*CYT186*	*Xcc*	*Xcr*	*XopAD*
1	ДК-1	+	+	+	+/-	+/-	+
2	ДК-2	+	+	+	+/-	-	+
3	ДК-3	+	+	+	+	-	-
4	Рам – 1-1	+	+	+	+	-	+
5	Рам – 1-2	+	+	+	+	-	-
6	Рам – 1-3	+	+	+	+/-	+/-	+
7	Рам – 2-1	+	+	+	+	-	-
8	Рам – 2-2	+	+	+	+	-	-
9	Рам – 2-3	+	+	+	+	-	-
10	Рам – 3-1	+	+	+	+	-	-
11	Рам – 3-2	+	+	+	+	-	+
12	Рам – 3-3	+	+	+	+	-	-
13	Рам – 4-1	+	+	+	+	-	-
14	Рам – 4-2	+	+	+	+/-	+/-	-
15	Рам – 4-3	+	+	+	+	-	-
16	В-1	+	+	+	+/-	+	+
17	В-2	+	+	+	+/-	-	+
18	В-3	+	+	+	+	-	-
19	Tir1	+	+	+	+	-	+
20	Tir2	+	+	+	+	-	-
21	Tir3	+	+	+	+	-	-
22	ХУ-1-1	+	+	+	-	-	-
23	ХУ 1-2	+	+	+	-	+	-
24	ХУ 2-1	+	+	+	+/-	-	+
25	ХУ 2-2	+	+	+	+/-	-	-
26	ДВ-1	+	+	+	+	-	-
27	ДВ-2	+	+	+	+	-	-
28	ДВ-3	+	+	+	+	-	-
29	177NZ	+	+	+	+	-	-
30	276NZ	+	+	+	+	-	-
31	NZ276	+	+	+	+	-	-
32	306NZ	+	+	+	+	-	-
33	NZ306	+	+	+	+	-	+/-
34	Eruca	-	-	-	+/-	-	-
35	Xok-1	+	+	+	+	-	-
36	Xok-2	-	+	+?	+/-	-	-
37	Xok-3	-	-	+?	-	-	-
38	Tr1	+	+	+	+	-	-
39	Tr2	+	+	+	+	+/-	+/-
40	Tr3	+	+	+	+	+/-	-
41	Tr4	+	+	+	+	-	-
42	Tr5	+	+	+	+	-	-
43	Tr6	+	+	+	+	-	-
44	$Л_1$	+	+	+	+	-	-
45	A5	+	+	+	+	-	-

46	ex 528	+	+	+	+	+	-
47	Tlo-1	+	+	+	+	-	-
48	Tlo-2	+	+	+	+	-	-
49	Tlo-3	+	+	+	+	-	+/-
50	Tlo-4	+	+	+	+	-	+/-
51	Tlo-5	+	+	+	+	-	-
52	AF-2	+	+	+	+	-	-
53	11390	+	+	+	-	-	-
54	11392	+	+	+	-	-	-
55	04-29-B1	-	+	+	+	-	-
56	ATCC33437	+	+	+	-	+	-
57	11386	+	+	+	+	-	-
58	53-4	+	+	+	-	-	-
59	Bul-K	+	+	+	+	-	-
60	T5	-	+	+	-	-	+
61	Lix16	+	+	+	+/-	-	+
62	Xn-13	+	+	+	-	-	+
63	P4110	-	+	+	-	-	+
64	Bun-1	-	+	+	+	-	-
65	Bun-2	+	+	+	+	-	-
66	Bel-2	+	+	+	+	-	-
67	Bel-3	+	+	+	+	+/-	-
68	Bel-4	+	+	+	-	+/-	+
69	Bel-4-1	-	+	+	-	-	+
70	Bel-4-2	-	+	+	-	-	+
71	Bel-4-3	-	+	+	-	-	+
72	Bel-4-4	-	+	+	-	-	-
73	Bel-5	-	+	+	+	-	+
74	Bel-6	+	+	+	+	-	-
75	Bel-8	+	+	+	+	-	-
76	Bel-9	+	+	+	-	-	-
77	Dasch-1 -1	+	+	+	-	-	-
78	Dasch -1-2	-	+	+	-	-	+
79	Dasch-2	+	+	+	+	-	-
80	Dasch-4	+	+	+	-	-	-
81	Dasch-4 белый	+	+	+	+	-	+
82	Dasch-4 желтый	-	+	+	Нет данных	-	Нет данных
83	Dasch-5	-	+	+	+/-	-	+
84	Dasch-8	+	+	+	-	-	-
85	Dasch -9	+	+	+	+	-	+/-
86	T5-2	+	+	+	Нет данных	-	Нет данных
Количество положительных реакций из 86		**71**	**84**	**83**	**52**	**11****	**21**

*Для Xc, Xcc и Xcr : + : есть целевой фрагмент; +/-: есть целевой фрагмент но не хорошо видно; - : нет целевого фрагмента.

Для XopAD целевой фрагмент меньше 500 bp **включая слабо видимые фрагменты

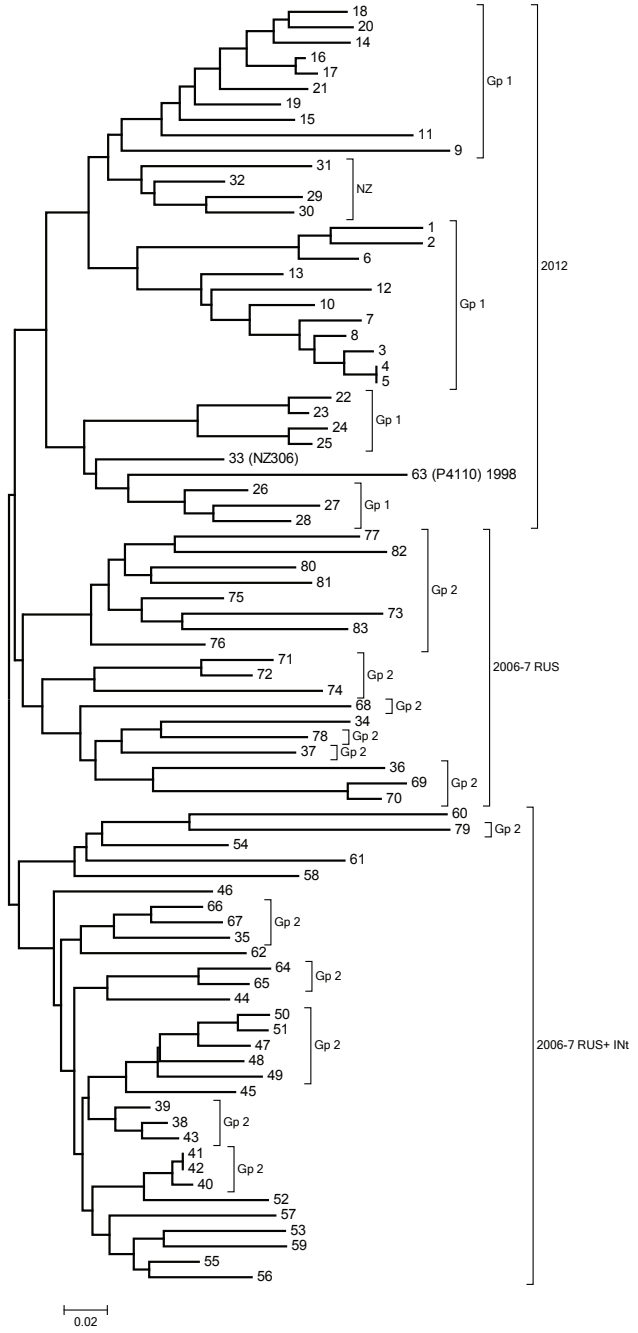


Рисунок 1.

Эволюционные отношения 83 штаммов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris,* построенные методом минимальной эволюции [1] по 71 полиморфному фрагменту. Эволюционные расстояния между штаммами были определены методом п-расстояний [2]. Дерево построено с помощью алгоритмов Close-Neighbor-Interchange (CNI) [2] и Neighbor-joining [3]. Анализ выполнен при помощи программы MEGA5 [4].

Таблица 3.

Генетические внутри и межгрупповые расстояния для изученных 83 штаммов *Xanthomonas campestris pv. campestris*

Группа	***Генетическое расстояние и его средняя ошибка***	
	Группа 1	***Группа 2***
Группа 1 (2012 г.) – 34 штамма	0,189 0,022	:
Группа 2 (2006-7 гг.) – 49 штаммов	0.277 0.027	0,221 0,021

Литература

1. Rzhetsky A. and Nei M. (**1992**). A simple method for estimating and testing minimum evolution trees.*Molecular Biology and Evolution* **9**:945-967.
2. Nei M. and Kumar S. (**2000**). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
3. Saitou N. and Nei M. (**1987**). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406-425.
4. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (**2011**). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА В РОССИИ: РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Во Тхи Нгок Ха[1], Ф.С. Джалилов[1], С.В. Виноградова[2], Е.И. Кырова[2,3], А.Н. Игнатов[2,3]

[1] РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, e-mail: labzara@mail.ru
[2] Центр Биоинженеирия РАН, Москва
[3] Университет дружбы народов, Москва

GENETIC DIVERSITY OF BLACK ROT PATHOGEN IN RUSSIA: PLANT REACTION

Vo Thi Ngoc Ha[1], F.S. Dzhalilov[1], S.Vinogradova[2], E. Kyrova[3], A. Ignatov[1,2,3]

[1] Russian State Agrarian University – MTAA, e-mail: labzara@mail.ru
[2] Center "Bioengineering" RAS
[3] People's Friendship University, Moscow

Summary

Black rot of brassicas is one of the most devastating diseases of vegetables across the World. Comparison of the pathogen strains collected at 2012 in different regions of Russia and other former USSR countries to the previously studied population (86 strains in total) by differential plant reaction using the published elsewhere set of brassicas showed race shift occurred between 2007 and 2012 towards toreduced number of putative avirulence genes and, thus, more virulent phenotype.

Сосудистый бактериоз, вызываемый бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и родственными патовариантами (далее Xcc) – основное бактериальное заболевание капустных культур в России. Штаммы, собранные в 2006-2007 и в 2012 г. с пораженных растений капусты, брокколи, масличного рапса и дикорастущих крестоцветных растений были испытаны на наборе сортов-дифференциаторов для определения расовой реакции бактерий. Коллекция культивируемых видов капустных растений также испытана на устойчивость к наиболее распространенным расам Xcc. При анализе реакции сортов *B.rapa* и *B.juncea*, Kamoun et al. (1992) показали, что штаммы *Xcc* группируются в пять рас, а Игнатов (1992) установил, что реакция образца белокочанной капусты PI436606 также разделяет штаммы на две расы. Позднее, расово-специфичная устойчивость была обнаружена у образцов *B. oleracea* и *B. napus* (Ignatov et al., 1998, 2000). Таким образом, потенциальные источники устойчивости должны быть изучены с учетом расовой вариабельности патогена.

Для получения инокулюма бактерии выращивались в течении 36 ч на среде Кинга Б при 28°С. Были использованы сорта-дифференциаторы описанные Kamoun et al. (1992): Seven Top Green (STG), Tokyo Cross Hybrid (TCH), Just Right Turnip (JRT) (*B. rapa*), и Florida Broad Leaf Mustard (FBLM) (*B. juncea*). Дополнительно были включены устойчивый образец B. carinata PI 199947 и B. napus Cobra (Vicente et al., 2001), восприимчивый контроль - F1 Экспресс и устойчивые к сосудистому бактериозу F1 гибриды Таурус, Браксан, Бронко, Агрессор, Циркон, Синтекс, Тайфун и Церокс (*B. oleracea* var. *capitata*). Семена высевали в 8-см горшки и растения выращивали в климатической камере при стандартных условиях (24/20°С, 16 ч световой день). Растения инокулировали через 6 недель после появления всходов. Три листа на растение инокулировали прищипыванием пинцетом, смоченным в бактериальной суспензии (10^6 клеток/мл). 10 точек инокуляции было сделано на каждом листе. От 2 до 4 растений на штамм были инокулированы. Развитие болезни оценивалось визуально через 16 дней после инокуляции. Варианты со сверхчувствительной реакцией обозначались как 0, варианты с развитием симптомов – как 1.

Результаты представлены в Таблицах 1 и 2. Результаты оценки 9 образцов капусты были статистически обработаны (Таблица 3). Исходые данные были нормализованы по среднему показателю (Nnorm= N/Av) проанализированы факторным методом (факторный анализ).

Основываясь на полученных данных, российские штаммы патогена принадлежат в основном к расам 1, 3 и 4. Штаммы, выделенные в 2006-2007 были более изменчивы по сравнению со штаммами, полученными в 2012 и зарубежными изолятами, типовыми для рас 1-4. Наиболее значительные изменения произошли в частоте реакции вирулентности к растениям с геном R2 (с 18,6% до 2012 г и 56% - после), реакции вирулентности к растениям с геном R1 (с 4,7% до 2012 г и 16% - после), и в реакции к 8 устойчивым ранее генотипам капусты – ни один из них не сохранил свою устойчивость к новым штаммам. Устойчивые к сосудистому бактериозу F1 гибриды Таурус, Браксан, Бронко, Агрессор, Циркон, Синтекс, Тайфун

и Церокс показали расово-специфичную реакцию и полностью поражались штаммами, выделенными в 2012 г., что еще раз подтверждает гипотезу о том, что к 2012 г. в России изменилась структура популяции возбудителя сосудистого бактериоза в сторону более высокой вирулентности.

Таблица 1.

Взаимодействие между штаммами *Xanthomonas campestris pv. campestris* из России и некоторых других стран и сортами –дифференциаторами по Kamoun (1992) и Vicente (2001).1 –Экспресс, 2- Just right, 3 - Tokyo Cross, 4 - STS1, 5 - STS2, 6 –Cobra, 7 PI99947

Название штамма	*Происхождение*	*1 none*	*2 R4*	*3 R4*	*4 R2*	*5 R?*	*6 R4*	*7 R1*	*Раса*
ДК-1	Серпуховский.р-н МО 10.12г	+	+	+	+	+	+	-	1
ДК-2	-	+	+	+	+	+	+	-	1
ДК-3	-	+	+	+	+	+	+	-	1
Рам – 1-1	Раменский р-н МО 10.12г	+	+	+	-	+	+	-	3
Рам – 1-2	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Рам – 1-3	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Рам – 2-1	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Рам – 2-2	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Рам – 2-3	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Рам – 3-1	-	+	+	+	+	+	+	-	1
Рам – 3-2	-	+	+	+	+	+	+	-	1
Рам – 3-3	-	+	+	+	+	+	+	-	1
Рам – 4-1	-	+	+	+	+	+	+	-	1
Рам – 4-2	-	+	+	+	+	+	+	-	1
Рам – 4-3	-	+	+	+	-	+	+	-	3
В-1	ОПХ Быково МО 09.12г	+	+	+	-	-	+	-	3
В-2	-	+	+	+	-	+	+	-	3
В-3	-	+	+	+	-	-	+	-	3
Tir1	Тирасполь 11.12г.	+	+	+	+	+	+	-	1
Tir2	-	+	+	+	+	+	+	-	1
Tir3	-	+	+	+	-	-	+	-	3
ХУ-1-1	Город Херсон Украина 10.12г	+	+	+	+	+	+	+	6
ХУ 1-2	-	+	+	+	+	+	+	+	6
ХУ 2-1	-	+	+	+	+	+	+	+	6
ХУ 2-2	-	+	+	+	+	+	+	+	6
Всего вирулентная реакция для штаммов после 2012 г., %		100	100	100	56	92	100	16	-
ДВ-1	Серпуховский.р-н МО 10.12г	+	+	+	+	+	+	-	1
ДВ-2	-	+	+	+	+	+	+	-	1
ДВ-3	-	+	+	+	+	+	+	-	1
177NZ	Голландия	+	-	+	-	-	-	-	3
276NZ	-	+	+	+	-	+	+	-	3
NZ276	-	+	+	+	+	+	+	-	1
306NZ	-	+	+	+	-	+	+	-	3
NZ306	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Eruca	США, 2005	+	+	+	-	+	+	-	3
Xok-1	Краснодарский край 09.06г	+	+	+	-	-	+	-	3
Tr1	Неизвестно	+	+	+	-	+	+	-	3
Tr2	Неизвестно	+	+	+	-	+	+	-	3
Tr3	Неизвестно	+	+	+	-	+	+	-	3
Tr4	Неизвестно	+	+	+	-	+	+	-	3
Tr5	Неизвестно	+	+	+	-	+	+	-	3
Tr6	Неизвестно	+	+	+	-	+	+	-	3
Л1	Россия, Ленинградская обл.	+	-	-	-	+	-	-	3
А5	Московская обл., 2001	+	+	+	-	+	+	-	3

ex 528	США	+	+	+	+	+	+	-	1
Tlo-1	Тульская область, 08.07г	+	+	+	-	+	+	-	3
Tlo-2	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Tlo-3	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Tlo-4	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Tlo-5	-	+	+	+	-	+	+	-	3
AF-2	Москва, 2001	+	+	+	+	+	+	+	1
11390	Бразилия, брокколи	+	-	-	-	-	-	-	3
11392	Бразилия, брокколи	+	+	+	-	-	+	-	3
042981	Бразилия	+	+	+	-	+	+	-	3
33437	США, Калифорния	+	+	+	+	+	+	+	6
11386	США, Мериленд, 2005	+	+	-	-	+	-	-	3
Bul-K	Германия, 1998	+	-	-	-	-	-	-	4
Lix16	Коломенск. р-н МО 09.06г	+	-	-	-	-	-	-	4
Xn-13	Япония, 1997 г	+	-	-	-	+	-	-	4
Bun-1	Дмитровский р-н МО 09.06	+	-	-	-	-	-	-	4
Bun-2	-	+	+	+	-	-	+	-	3
Bel-2	респ. Белоруссия 10.06г -	+	+	+	-	+	+	-	3
Bel-3	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Bel-8	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Bel-9	-	+	+	+	-	+	+	-	3
Dasch-4	Серпухов.р-н МО 09.06	+	+	+	-	+	+	-	3
Dasch-9	-	+	-	-	-	+	-	-	4
Dasch-8	-	+	+	+	-	-	+	-	3
Всего вирулентная реакция для штаммов до 2012 г., %.		100	81,4	81,4	18,6	79,1	79,1	4,7	-

РАСПРОСТРАНЕНИЕ НОВОГО ГЕНОТИПА *XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS* В РОССИИ В 2012 ГГ.

Во Тхи Нгок Ха[1], Ф.С. Джалилов[1], Е.С. Мазурин[1], Е.И. Кырова[2], С.В. Виноградова[3], Н.В. Шаад[4], Д. Ластер[4], А.Н. Игнатов[2,3,5]

[1] РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, e-mail: labzara@mail.ru;
[2] РУДН;
[3] Центр «Биоинженерия» РАН;
[4] ARS-USDA, USA;
[5] ВНИИ фитопатологии:

APPEARANCE OF A NEW GENOTYPE OF X*ANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS* IN RUSSIA AT 2012

Vo Thi Ngoc Ha[1], F.S. Dzhalilov[1], E.S. Mazurin[1], E. Kyrova[2], S. Vinogradova[3], N.W. Schaad[4], D. Luster[4], A. Ignatov[2,3,5]

[1] Russian State Agrarian University – MTAA, e-mail: labzara@mail.ru
[2] Russian People's Friendship University
[3] Center "Bioengineering" RAS
[4] ARS-USDA, USA
[5] Russian Research Institute of Phytopathology

Summary

Black rot of brassicas is one of the most devastating diseases of vegetables across the World. Comparison of the pathogen strains collected at 2012 in different regions of Russia and other former USSR countries to the previously studied population MLST showed haplotype change occurred between 2007 and 2012. The new predominant type of the pathogen was similar to strain B100 from Germany.

Сосудистый бактериоз, вызываемый бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestri*s и родственными патовариантами (далее Xcc) – основное бактериальное заболевание капустных культур в России. Штаммы, собранные в 2006-2007 и в 2012 г. с пораженных растений капусты, брокколи, масличного рапса и дикорастущих крестоцветных растений были ранее испытаны на наборе сортов-дифференциаторов для определения расовой реакции бактерий и изучены ПЦР фингерпринтингом.

В работе были использованы штаммы патогенные для хотя бы одного вида растений рода Капуста.

Бактериальные штаммы выращивали на среде LB (Bertani. G, 1951) при 28 оС в течение 24-48 часов. Препараты геномной ДНК были получены с использованием методики CTAB-SDS (Birnboim & Doly, 1979). Амплификацию фрагментов генов *cytP450, rpoD, gyrB,* и *avrXcc2109* проводили на приборе Mastercycler Eppendorf AG с применением набора «Encyclo» (Evrogen, Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Амплификацию проводили по следующему температурно-временному профилю: начальная денатурация 95 оС (60 сек), далее 30 циклов: денатурация 95 оС (30 сек), отжиг праймеров 65 оС (30 сек), элонгация 72 оС (30 сек). Праймерные пары были использованы согласно протоколам Young et al. (2008), Ignatov et al. (2007) и Пуниной (2008). Выделение и очистку фрагментов проводили из ПЦР-смеси с использованием набора «Clean up standard» (Evrogen) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование очищенных ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе DNA Analyzer 3730 («Applied Biosystems», США). Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР.

Полученные de novo нуклеотидные последовательности были выровнены с использованием алгоритма Clustal W, параметры были выставлены по умолчанию. Проверка выравнивания вручную осуществлялась в программе BioEdit v. 7.2.5.. Для каждого из фрагментов с помощью программы NRDB был определен уникальный сиквенсовый тип (аллельный вариант), выполнен тест на наличие отбора Tajima's D (Tajima, 1983), вложенный в пакет программ DnaSP v. 5.

Дендрограммы филогенетических отношений штаммов были построены в программе MEGA 5.1 методом максимального правдоподобия. Значения бутстрепа были получены при 1000 повторениях.

Результаты и обсуждения

Все исследуемые генные фрагменты оптимальны для проведения мультилокусного генотипирования. В результате проведения мультилокусного анализа было выявлено от 5 (*cytP450*) до 20 (*rpoD*) аллельных вариантов. Было отмечены нетипичные для X. campestris варианты гена *rpoD*. При анализе данных полученных на основе дендрограмм филогенетических отношений штаммов было обнаружено то, что все штаммы *X. campestris*, выделенные в 2012 г. имеют аллели гена *rpoD* наиболее близкие к штаммам другого вида (*X. arbiricola*) (Рис. 1), и группировались с двумя атипичными коллекционными штаммами *X. campestris* B100 (Германия) и ICMP6541 (Новая Зелландия). В тоже время, дендрограммы, постренные по другим генам, помещали штаммы, выделенные в 2012 г. вместе с типовыми штаммами вида *X. campestris*.

Данное явление, возможно, указывает на наличие латерального переноса генов, который способствует адаптации бактерий рода *Xanthomonas* к новому кругу растений-хозяев и условиям существования. Таким образом, установлено, что на рубеже 2012 г. в России произошла смена генетического состава популяции возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных. Данный вывод подтверждается рядом других исследований, как доложенных в данном сборнике, так и еще не опубликованных.

Литература

1. Birnboim HC, Doly JA rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
2. Ignatov A. et al. 2007. Phytopathology, 97:803-812.
3. Kimura M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. Journal of Molecular Evolution -1980.
4. Starr M.P. and Stephens W.L.. Pigmentation and taxonomy of the genusXanthomonas. // J. of Bacteriology. -1964. –V. 87. –P. 293–302.
5. Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. 1983 Genetics 105:437-460.
6. Young J.M., et al. 2008. Systematic and Applied Microbiology 31: 366-377
7. Пунина Н. В., Зотов В. С., Кузнецов Б. Б., Игнатов А. Н. Оценка генетического разнообразия межгенного транскрибируемого региона 16s-23s ррнк, гена gyrb и разработка пцр диагностики фитопатогенных ксантомонад // Вестник МГОП -2008.
8. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.

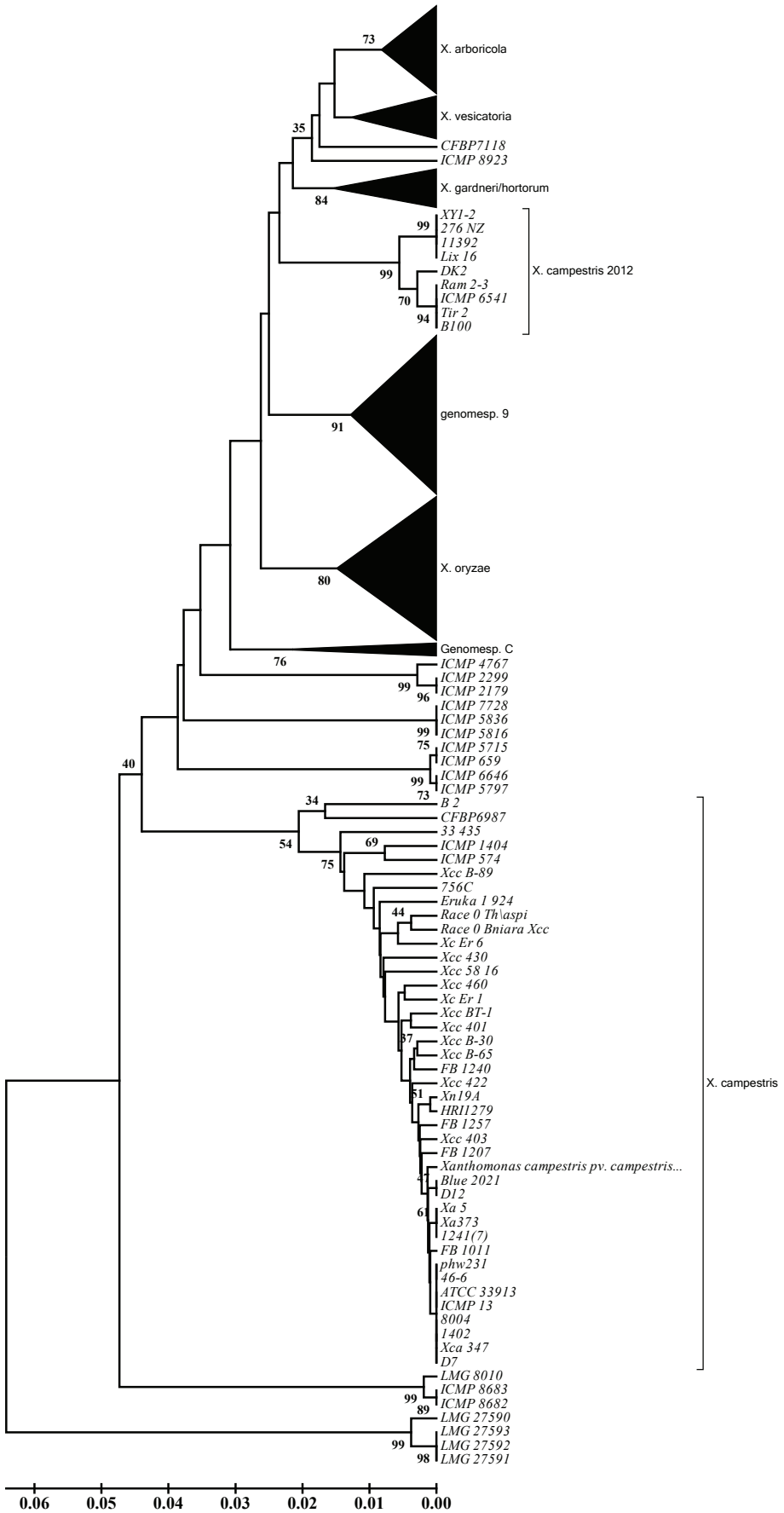


Рисунок 1. Эволюционные отношения для 295 последовательностей фрагмента гена rpoD штаммов рода Xanthomonas. В окончательном элайменте 529 пар оснований. Анализ проведен при помощи программы MEGA 5.1 методом максимального правдоподобия. Значения бутстрепа были получены при 1000 повторениях. [8]. Выделены группы штаммов *Xanthomonas campestris,* собранные в России до и после 2012 г.

ФИТОПЛАЗМЕННЫЕ БОЛЕЗНИ КАРТОФЕЛЯ И ИХ ПЕРЕНОСЧИКИ В ЦЕНТРАЛЬНОМ РЕГИОНЕ РОССИИ

Н.В. Гирсова, Т.Б. Кастальева, К.А. Можаева, Ю.И. Мешков
Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии
e-mail: kastalyeva@vniif.ru

PHYTOPLASMA DISEASES OF POTATO AND THEIR VECTORS SPECIES IN CENTRAL REGION OF RUSSIA

N.V. Girsova, T.B. Kastalyeva, K.A. Mozhaeva, Yu.I. Meshkov
Russian Research Institute of Phytopathology
e-mail: kastalyeva@vniif.ru

Summary

A total of 730 potatoes were collected and the associated phytoplasmas were identified using molecular procedures based on PCR/RFLP analysis of phytoplasma. Four 16S rRNA phytoplasma groups (16SrI, 16SrIII, 16SrVI, and 16SrXII) were identified in the potatoes collected from the Central region. Four leafhopper species carried phytoplasmas. Macrosteles laevis which carried 16SrI and 16SrIII phytoplasmas, was the most prevalent in the Moscow region. The other species, Balclutha punctata, Eupteryx atropunctata,and Macrosteles sexnotatus which carried 16SrI, 16SrXII, and 16SrI/16SrVI, respectively, were present in very low populations.

Картофель – одна из основных продовольственных культур во всем мире. Вегетативный способ размножения этой культуры способствует накоплению и сохранению патогенов в клубнях. Было описано несколько фитоплазменных болезней картофеля, развитие которых может приводить к потерям урожая от 10 – 20 до 100% (Богоутдинов, 2000). Наиболее распространенным заболеванием *Пасленовых* всегда считали столбур. Первые упоминания о нем были сделаны еще в начале 20-х годов XX века, но тогда возбудителем этого заболевания считали вирусы (Ячевский, 1926). В последующие годы советские ученые установили круг растений-хозяев этого патогена, способы переноса и сохранения инфекции, были определены основные насекомые-переносчики.

На территории России и бывшего СССР были выявлены пять фитоплазменных болезней картофеля: столбур, красновершинность (пурпурное закручивание верхушки), ведьмина метла картофеля, желтуха, круглолистность (Богоутдинов, 2000). Названия болезней были даны на основе характерных симптомов, появляющихся на растении в ответ на заражение. Так, для растений, зараженных столбуром, отмечают следующие симптомы: укорачивание междоузлий, разрастание пазушных почек, появление воздушных клубней, скручивание листьев, частичный хлороз долей верхних листьев, измельчение листьев. У растений пораженных красновершинностью наблюдается закручивание и гофрированность листьев на верхушке побега, пурпурное окрашивание листьев, укорачивание междоузлий, возможно образование пазушных побегов и воздушных клубней. Название заболевания «ведьмина метла» картофеля говорит само за себя: при этом заболевании наблюдается уменьшение высоты куста и образование большого количества измельченных тонких светлоокрашенных побегов. Листья редуцируются и часто имеют простую листовую пластинку или с уменьшенным количеством долей. На растениях картофеля зараженных желтухой обычно отмечают скручивание верхушечных листьев и изменение их окраски, при этом наблюдается как пожелтение, так и покраснение листьев, пролиферация побегов, вздутие узлов, образование воздушных клубней и раннее старение растений. Характерным симптомом круглолистности является изменение формы листа; у больных растений увеличивается количество побегов, на которых формируются мелкие листья с округлыми долями. При сильном заражении растений фитоплазмами образуются уродливые мелкие клубни, очень часто отмечается прорастание клубней множеством тонких нитевидных ростков (Богоутдинов, 2000).

Зарубежные авторы делят болезни картофеля на две основные группы: столбур и «ведьмина метла» (Ember et al., 2011). Но, и отечественные, и зарубежные авторы отмечают, что на появление и развитие симптомов влияют очень многие факторы: сорт картофеля, абиотические факторы, концентрация фитоплазм в растении, а также возможность комплексной инфекции, например, фитоплазм и вирусов, фитоплазм и грибной инфекции и т.д. Поэтому, основываясь только на визуальной диагностике, нельзя точно

установить наличие патогена. Использование современных молекулярных методов, таких как ПЦР/ПДРФ, позволяет не только точно определить наличие фитоплазм, но и идентифицировать патоген (Gundersen et al., 1994, Lee et al., 1998, 2000). Так, в соответствии с современной классификацией на основе ПДРФ анализа ПЦР-амплифицированной 16S рРНК идентифицированы фитоплазмы, вызывающие болезни картофеля, принадлежащие, как минимум, к восьми группам (Ember et al., 2011).

Согласно нашим исследованиям в растениях картофеля, выращенного на территории Центрального региона РФ, были определены фитоплазмы, принадлежащие к четырем группам: желтух астр (Aster yellows group – 16SrI), Х-болезни (X-disease group – 16SrIII), пролиферации клевера (Clover proliferation group – 16SrVI) и столбура (Stolbur group – 16SrXII). При этом встречаемость фитоплазм из разных групп варьировала по годам. Так, в 2008 году были идентифицированы фитоплазмы, принадлежащие только к группе Х-болезни, а в 2009 и 2012 годах – фитоплазмы всех четырех групп. В 2010 году большая часть протестированных растений содержала фитоплазмы из группы желтух астр (Aster yellows group – 16SrI), на втором месте по встречаемости были патогены из группы Х-болезни и только в одном из сорока пяти положительных образцов определили столбур. Доля больных растений, протестированных в течение этих лет составляла от 6,6 % до 56,7 %, исключая 2011 год, который отличался необычно низким уровнем фитоплазменной инфекции – 0,75%.

Из года в год фитоплазмы сохраняются в клубнях картофеля, на многолетних сорняках, а от растения к растению переносятся с помощью насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом, в основном из отряда Равнокрылых (*Homoptera*). Наиболее известные переносчики фитоплазм – цикадки и псилиды. Установлено, что в разных регионах России переносчиками фитоплазм являются цикадка вьюнковая *(Hyalesthes obsoletus*), цикадка зеленая (*Cicadella viridis*), пенница слюнявая (*Phylaenus spumarius*), афродес клеверный (*Aphrodes bicinctus*), цикадка корневая (*Pentastiridius leporinus)*, цикадка шеститочечная (*Macrosteles laevis*), цикадка Млокосевича (*Hyalesthes mlokosevieze*), а также цикадки родов: *Orosius*, *Scleroracus* и другие (Богоутдинов, 2000). По данным Богоутдинова и др. (2008) в насекомых *Macrosteles laevis* Rib., и *Empoasca pteridis* Dhlb., собранных в Ростовской области, были определены фитоплазмы из группы желтухи астр (16SrI). Других данных по диагностике фитоплазм в насекомых, собранных на территории РФ, нам не удалось найти, поэтому с 2010 года, наряду с идентификацией фитоплазм в растениях, мы определяли наличие фитоплазм и в индивидуальных особях насекомых.

Летом 2010 года цикадок собирали на картофельном поле ВНИИФ. Было определено 6 видов цикадок, наибольшее количество насекомых принадлежало к видам *Empoasca pteridis* Dhlb. и *Macrosteles laevis* Rib. Доля насекомых первого вида составляла 54,5%, на долю другого вида пришлось 40,6%, остальные четыре вида были представлены единичными экземплярами. По нашим наблюдениям цикадки появлялись на полях картофеля ВНИИФ во время цветения растений, и их численный пик приходился на начало августа, к концу августа число насекомых быстро снижалось. Около 30% собранных насекомых было протестировано на наличие в них фитоплазм, только 5% из числа протестированных насекомых были заражены фитоплазмами; все они принадлежали к виду *Macrosteles laevis* Rib. и были инфицированы фитоплазмами из группы Х-болезней (X-disease group – 16SrIII).

В 2011 году наблюдалась та же тенденция. Доминирующими видами были *Empoasca pteridis* Dhlb. и *Macrosteles laevis* Rib., и так же, как в предыдущий год, фитоплазмы обнаруживались в цикадках *Macrosteles laevis* Rib. (цикадка шеститочечная), но в отличие от 2010 года фитоплазмы принадлежали к разным подгруппам группы желтух астр (16SrI-A, 16SrI-B).

В 2012 году в цикадках *Macrosteles laevis* Rib. фитоплазмы не были найдены, однако в цикадках других видов удалось определить фитоплазмы, принадлежащие к группам 16SrI, 16SrVI и 16SrXII. Это были цикадки *Balclutha punctata Thunb.*, *Macrosteles sexnotatus* Fall. и *Eupteryx atropunctata* (Goeze), соответственно. При этом в отдельных особях *Macrosteles sexnotatus* Fall. были определены фитоплазмы из группы 16SrI и из группы 16SrVI, то есть насекомые этого вида не являются группоспецифическими переносчиками.

Таким образом, с 2010 по 2012 гг было протестировано более четырехсот насекомых, собранных в Московской области; фитоплазмы были обнаружены в 16 особях, что составило примерно 3,7%. Видовой состав фитоплазм, выявленных у цикадок и псилид, собранных в Московской области, в целом совпадал с тем, который наблюдался у растений, инфицированных фитоплазмами. Это были фитоплазмы, принадлежащие к четырем группам: желтух астр (Aster yellows group – 16SrI), Х-болезни (X-disease group – 16SrIII), пролиферации клевера (Clover proliferation group – 16SrVI) и столбура (Stolbur group – 16SrXII-A).

Литература

1. Богоутдинов Д.З. Фитоплазмозы картофеля и методы их изучения // Науч.- метод. пособие / Самарская ГСХА. – Самара, 2000. – 35 с.
2. Богоутдинов Д.З., Валюнас Д., Навалинскене М., Самуйтене М. О видовой идентификации возбудителей фитоплазмозов пасленовых культур // Сельскохозяйственная биология. – 2008. - №1. – С. 77-80.
3. Ячевский А.А. Ведьмины метлы картофеля // Материалы по микологии и фитопатологии. – 1926. – Т.5. – Вып.2. – С. 1-12.
4. Ember I., Acs Z., Munyaneza J.E., Crosslink J.M., Kolber M. Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia // Eur J Plant Pathol. – 2011. – Vol. 130. – P. 367-377.
5. Gundersen D.E., Lee I.-M., Rehner S.A., Davis R.E., Kingsbury D.T. Phylogeny of Micoplasmalike Organisms (Phytoplasmas): a Basis for Their Classification // Journal of Bacteriology. – 1994. – Vol. 176. – No. 17. – P. 5244-5254.
6. Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R.E., Bartoszyk I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences // International J. Systematic Bacteriology. – 1998. – Vol. 48. – P. 1153-1169.
7. Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E.. Phitoplasma: phytopathogenic Mollicutes // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – Vol. 54. – P. 221-255.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA* И *PSEUDOMONAS SYRINGAE* К МЕДЬСОДЕРЖАЩИМ ФУНГИЦИДАМ

А.А. Джаймурзина, М.М Исин, Ж.З. Умиралиева, Б.К. Копжасаров

Казахский НИИ защиты и карантина растений

e-mail: ms.umiralieva@list.ru

THE SENSITIVITY OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA* AND *PSEUDOMONAS SYRINGAE* TO COPPER-CONTAINING FUNGICIDES

A.A. Dzhaimurzina, M.M Isin, Zh.Z. Umiralieva, B.K. Kopzhasarov

Kazakh Research Institute of Plant Protection and Quarantine

e-mail: ms.umiralieva@list.ru

Summary

Assessed the sensitivity of pathogenic bacteria Erwinia amylovora – the causative agent of fire blight of fruit and Pseudomonas syringae – the causative agent of necrosis of fruit crops to the copper-containing fungicides. It was established that the zone of growth inhibition depends on the concentration of bacterial preparations. High sensitivity to copper-containing fungicides showed Pseudomonas syringae.

Одними из наиболее опасных болезней плодовых культур являются бактериальный ожог, - возбудитель фитопатогенная бактерия *Erwinia amylovora* (Burrill.) Winslow et al.,и бактериальный некроз, - возбудитель фитопатогенная бактерия *Pseudomonas syringae* van Hall. В садах юго-востока Республики Казахстан бактериальный некроз встречается давно, с 80-х годов, и поражал в основном грушевые деревья и косточковые культуры. Широкого распространения он не имел. Однако в последние годы данный патоген стал часто изолироваться из пораженных болезнью яблонь.

Бактериальный ожог является карантинным заболеванием для республики. В то же время, начиная с 2008 года, стали поступать сигналы о поражении плодовых культур (яблонь и груши) заболеванием, схожим по симптомам с бактериальным ожогом. В 2010 году наблюдалось значительное распространение данного заболевания в плодовой зоне юго-востока Республики. Возможно, это было связано с тем, что с 2003 года, согласно импортных карантинных разрешений, в республику поступал посадочный материал плодовых и декоративных культур из стран, где бактериальный ожог наносил значительный урон.

Учитывая важность данной проблемы, сотрудниками КазНИИ защиты и карантина растений был проведен мониторинг плодовых насаждений юга и юго-востока республики. На основании лабораторных анализов было подтверждено наличие бактериального ожога в этих регионах (Дренова Н.В., Исин М.М., Джаймурзина А.А. и др., 2013). При этом были изолированы и идентифицированы два вида фитопатогенных бактерий (Джаймурзина А.А., Исин М.М., Умиралиева Ж.З., 2014) *Erwinia amylovora* и *Pseudomonas syringae*.

С 2013 года в институте были начаты исследования по бактериальному ожогу и разработке

мероприятий по ограничению его распространения. По данным литературных источников (Израильский В.П., 1979; Гвоздяк Р.И., Матвеева Е.В., Чумаевская М.А. и др., 1987; Сметник А.И., 2003), против бактериальных болезней плодовых культур рекомендуется использовать медьсодержащие фунгициды. В связи с этим, первоначально в лабораторных условиях изучали чувствительность фитопатогенных бактерий *Er. amylovora* и *Ps. syringae* к медьсодержащим фунгицидам. Использовались фунгициды: бордоская жидкость (БЖ), хлорокись меди (ХОМ), 90%, с.п., ордан, с.п., купроксат, 34,5%, т.пс. Учитывая, что БЖ используется в садах в 1% и 4% концентрациях, остальные препараты использовали в этих же дозах. Кроме того, в эксперимент были включены и высокие концентрации – 7 и 10%, для проведения осенней искореняющей обработки в очагах бактериального ожога против накопившейся в течение вегетационного периода инфекции. Обработки планировали проводить осенью после сбора урожая. При этом не следовало опасаться ожогов на листьях и других органах дерева и остатков препарата в плодах.

Изучение чувствительности фитопатогенных бактерий к медьсодержащим фунгицидом проводили методом дисков из фильтровальной бумаги в чашках Петри на картофельном агаре, согласно методическим указаниям (Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С., 1968). В качестве тест объектов использовали чистые культуры фитопатогенных бактерий *Er. amylovora* и *Ps. syringae.*

Стерильные чашки Петри с питательной средой засевали суточной культурой тест объектов, – концентрация суспензии 10^9 по стандарту мутности. На поверхность питательной среды, засеянной тест объектами, раскладывали с помощью пинцета стерильные диски из фильтровальной бумаги, диаметром 10мм, предварительно пропитанные испытываемыми концентрациями препаратов. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 27^0С, оптимальной для роста фитопатогенных бактерий. Через двое суток культивирования бактерий отмечали зоны подавления их роста вокруг бумажных дисков. Зоны, диаметр которых не превышал 15мм, свидетельствуют о слабой чувствительности бактерий к препарату. Зоны от 15 до 25 мм отмечают среднюю чувствительность к их действию, а зоны от 25 мм и выше характеризуют высокую чувствительность.

Результаты лабораторных опытов представлены на рисунках 1-3.

Как показали результаты эксперимента, все испытываемые медьсодержащие фунгициды снижали интенсивность роста бактериальных культур. Оба тест объекта проявили одинаковую чувствительность ко всем испытываемым препаратам (рисунок 1).

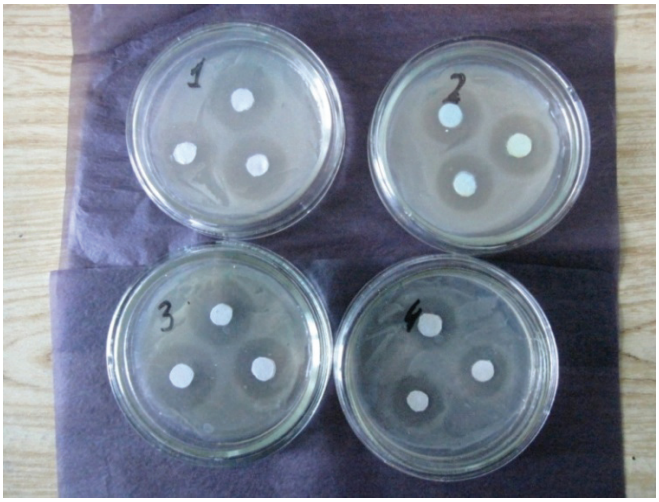


Рисунок 1. Зона подавления чистой культуры *Erwinia amylovora* медьсодержащими препаратами (1 – бордоская жидкость, 2 – хлорокись меди, 3 – ордан, 4 – купроксат), 1%

Однако зона подавления роста бактерий зависила от концентрации фунгицидов. Er. amylovora была слабо чувствительна к БЖ при дозах препарата 0,5 и 1%, - зона подавления роста не превышала 5-10 мм. При более высоких концентрациях – 4%, 7% и 10%, она увеличивалась и превышала 15 мм (рисунок 2).

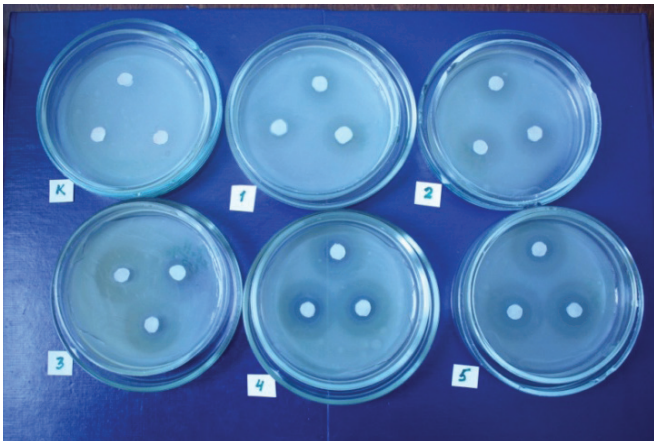


Рисунок 2. Зона подавления бактерий *Erwinia amylovora* в зависимости от разной концентрации бордоской жидкости (К- контроль, 1 – 0,5%, 2 – 1%, 3 - 4%, 4-7%, 5-10%)

Опыты показали неодинаковую чувствительность двух тест-объектов к действию БЖ. Наибольшие бактерицидные свойства её проявились в отношении к *Ps. syringae* (рисунок 3). Зона подавления этого вида бактерии при 0,5 и 1% концентрации превышала 15мм, что свидетельствует о чувствительности данного патогена к препарату. Дозы 4%, 7% и 10% оказывали ещё более сильное бактерицидное действие БЖ в отношении *Ps. syringae.*

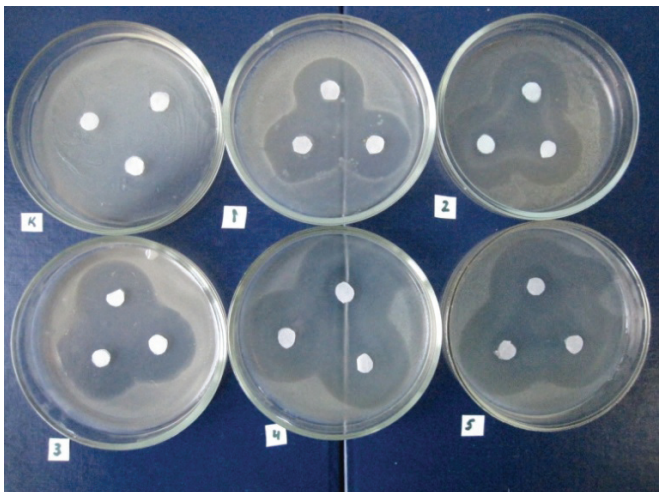


Рисунок 3 - Зона подавления бактерий *Pseudomonas syringae* в зависимости от разной концентрации бордоской жидкости (К- контроль, 1 – 0,5%, 2 – 1%, 3 - 4%, 4-7%, 5-10%)

Таким образом, результаты исследования показали неодинаковую чувствительность фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora* и *Pseudomonas syringae* к действию медьсодержащих фунгицидов. Более высокие бактерицидные свойства они проявили против *Pseudomonas syringae.*

Литература

Бактериальные болезни растений. Под ред. Израильского В.П., Москва, 1979. С. 213-245

Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. Киев, 1968. С. 264-265

Гвоздяк Р.И., Матвеева Е.В., Чумаевская М.А. и др. Методические указания по диагностике и мерам борьбы с бактериальным некрозом и ожогом плодовых культур, М.: ВАСХНИЛ, 1987, С.4-29

Джаймурзина А.А., Исин М.М., Умиралиева Ж.З. Изоляция и идентификация возбудителя бактериального ожога плодовых культур на юге и юго-востоке Республики Казахстан//Защита растений и экологическая устойчивость агробиоценозов. Материалы межд. науч. конф. Алматы, 2014. С. 389-391

Дренова Н.В., Исин М.М., Джаймурзина А.А., Жармухамедова Г.А., Айткулов А.К. Бактериальный ожог плодовых культур в Республике Казахстан//Карантин растений. Наука и практика. Русско-английский журнал – М.:.2013. - №1- С.39-43.

Сметник А.И. Бактериальный ожог плодовых//Защита и карантин растений. – 2003. — №10. – С. 38-39

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *XANTHOMONAS*, ПОРАЖАЮЩИЕ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА МЯТЛИКОВЫЕ

М.С. Егорова [2], А.Н. Игнатов [1], Е.С. Мазурин [2]

[1]Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

[2]ФГБУ Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ ВНИИКР),
Московская область, Раменский район, п. Быково, ул. Пограничная, д. 32
e-mail: masha_0787@mail.ru

DIVERSITY PHYTOPATHOGENIC BACTERIA XANTHOMONAS, CAUSING DISEASES OF CEREALS (*POACEAE*)

M.S. Egorova[2], A.N. Ignatov[1], E.S. Mazurin[2]

[1]Russian People's Friendship University, Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

[2]All-Russian Plant Quarantine Center, Pogranichnaya 32,
Bykovo, Ramenskoe, Moscow region, 140150, Russia

Summary

We review the published data on the species composition of plant pathogenic bacteria of the genus Xanthomonas, damaging cereal plants. As well as its own data obtained from surveys of cereal seeds from different regions of the Russian Federation on the presence of a pathogen. In the study were first identified pathogens X.hortorum, X.campestris, X. cynarae, X. pisi, and X. gardeneri, who earlier in the cereal crops were not detected.

Зерновые колосовые культуры являются ведущими в сельхозпроизводстве России. Поэтому получение высоких и устойчивых урожаев является важнейшей задачей. Вместе с тем на посевах зерновых культур паразитирует ряд возбудителей, снижающих продуктивность агроценозов. К числу главных из них относят бактериозы, которые широко распространены в последние годы. (Котляров, 2009).

Основными причинами увеличения вредоносности бактериозов на основных сельскохозяйственных культурах являются: появление новых, более агрессивных видов и групп фитопатогенных бактерий, изменение климатических условий, нарушение технологий выращивания, уборки и хранения собранных семян, а также отсутствие своевременной и достоверной диагностики возбудителей болезней (Игнатов,2012).

Болезни растений, вызываемые фитопатогенными бактериями рода *Xanthomonas*, приводят к серьезным экономическим потерям, так как они поражают наиболее важные злаковые, крестоцветные, пасленовые, бобовые, цитрусовые и другие сельскохозяйственные культуры.

Бактериозы на зерновых культурах, вызываемые фитопатогенными бактериями рода *Xanthomonas*, являются одними из самых серьезных и вредоносных заболеваний, передающихся семенами и посадочным материалом (Пунина и др., 2008).

Среди *наиболее вредоносных бактерий-возбудителей бактериозов* зерновых культур выделяют бактериальную штриховатость листьев (Bacterial leaf streak, BLS), вызываемую различными патотипами *Xanthomonas translucens* (Jones,1917, Vauterin, 1995). Эта болезнь при поражении колоса носит название черный бактериоз (black chaff) и чаще поражает зерновые культуры в странах с теплым и влажным климатом (Duveiller, 1997). Существует много специализированных форм этого патогена, различающихся по кругу растений-хозяев, а именно: X. *translucens* pv.*undulosa* (патоген пшеницы), X. *translucens* pv. *secalis* (патоген ржи), X. *translucens* pv. *hordei* (патоген ячменя), но в последнее время их объединяют в один вид *X. translucens*.

Информация о заболевания начала появляться, начиная с конца прошлого века; однако, иногда данные были противоречивы, так как симптомы заболевания на ранних стадиях часто путают с симптомами абиотического стресса известного как псевдо черный бактериоз (Broadfoot and Robertson 1933).

Информация о распространении данного возбудителя во многих странах (Аргентине, Бразилии, Китае, Мексике, Пакистане, США, Турции, Эфиопии) начала появляться с 1980 г; однако, иногда данные были противоречивы, так как симптомы заболевания на ранних стадиях часто путают с симптомами абиотического стресса известного как псевдо черный бактериоз (Broadfoot and Robertson 1933; Hagborg 1936).

Возбудитель был впервые выявлен на ячмене (Jones *et al*., 1917), позже на пшенице (Smith *et al.* 1919), ржи (Reddy *et al.*1924), многолетних травах (Wallin 1946a) и, наконец, на тритикале (Zillinsky and Borlaug, 1971).

Черный бактериоз отмечают на всех надземных частях растений (листья, стебли, колосья, зерна), наиболее часто проявляется на колосьях. Это заболевание считают наиболее вредоносным бактериозом пшеницы. В зависимости от зоны выращивания культуры и погодных условий, благоприятных для развития возбудителя бактериоза, эта болезнь может снижать урожай пшеницы на 5-90%. Определено, что при 50%-ном поражении листовой поверхности флагового листа пшеницы потери урожая могут достигать 13-34% (в зависимости от восприимчивости сортов и климатических условий) (В.В.Котляров, 2005).

Одними из наиболее вредоносных видов бактерий являются виды *Xanthomonas oryzae,* которые включают два не встречающихся в Европе рисовых патогена - *pv. oryzae* (BLB) *и pv. oryzicola* (BLS) (Swings и соавт., 1990). Эти бактериальные патогены – близкородственные виды и ранее были названы как патовары *Xanthomonas campestris*. Основным растением-хозяином обоих патоваров является рис, который выращивается в нашей стране на Северном Кавказе, в Краснодарском крае на площади 110 тыс. га и в Приморском крае. Данные бактериозы наиболее опасны для данной сельскохозяйственной культуры во многих рисосеющих странах и представляют фитосанитарный риск для региона ЕОКЗР. Они являются отсутствующими вредными организмами для Российской Федерации.

Впервые бактериальный ожог листьев риса (BLB) обнаружили в Префектуре Фукуока, Япония, в 1884 году на рисе (Ou, 1972).

Бактериальный ожог риса, вызываемый патогеном *X. oryzae* pv. *oryzae* приводит к серьезным экономическим потерям во всем мире (Zhao et al., 2007). Болезнь распространена почти во всех рисосеющих странах Азии, в Африке, Латинской Америки, Австралии (северные территории, Квинсленд), на территории Карибского бассейна (Mew et. al., 1993).

Бактериальную полосчатость риса (BLS) впервые обнаружили на Филиппинах в 1918 г. (Ou, 1972). BLS широко распространена в тропической и субтропической Азии, включая Китай, Таиланд, Малайзия, Индия, Вьетнам, Филиппины и Индонезия, но не встречается в районах с умеренным климатом, таких как Япония и Корея (Awoderu et al., 1991). Кроме того, в последнее время данная болезнь стала серьезной проблемой в Западной Африке, и достигло масштабов эпидемии в Китае (Notteghem, personal communication). В настоящее время не было данных о распространении данного заболевания в США.

В 2001-2008 гг. впервые в РФ был выделен и изучен новый бактериальный патоген злаков *Xanthomonas arboricola* (Vauterin et al, 1995), вызывающий поражение пшеницы, ржи, овса, ячменя, а также подсолнечника и крестоцветных культур. Симптомы, вызываемые данным возбудителем, не отличались от болезней, причиняемых другими вида бактерий рода *Xanthomonas*, специализирующихся на тех же растениях хозяевах.

Бактериальная пятнистость, вызываемая бактериями этого вида, является наиболее вредоносным заболеванием растений таких семейств, как розоцветные, молочайные, ореховые, березовые, банановые и ивовые. Бактериозы растений, вызываемые *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *populi* были отмечены в Российской Федерации (CMI, 1987), но возбудители заболеваний не изучались.

В последнее время появляются сведения о новых агрессивных штаммах фитопатогенных бактерий, которые поражают широкий круг сельскохозяйственных культур, что приводит к повсеместному усилению вредоносности бактериозов и серьезным экономическим потерям. Фитопатогенные бактерии, несвойственные для наших широт, активно распространяются в России, увеличивая число поражаемых ими видов растений.

Для изучения видового состава фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* на растениях сем. Мятликовые мы исследовали более 114 партий семян риса и ячменя (урожай 2011-2012 года) отечественного производства на наличии возбудителей (табл.1). Также совместно с лабораторией бактериальных болезней ГНУ-ВНИИ фитопатологии РАСХН была проанализирована коллекция штаммов *Xanthomonas*, собранная в разные годы на территории бывшего СССР сотрудниками лаборатории на растениях сем. Мятликовые (табл.2).

При экспертизе семян из среднего образца отбирали семена щуплые, недоразвитые, серые, с засохшим экссудатом желтоватого цвета. Бактерии культивировали на среде YDC, (Schaad, 2001): yeast extract 10г, $CaCo_3$ 20г, D-glucose monohydrate - 10г, agar 18г, дистиллированная вода 950mL при 27°С в течение 48 ч. Выросшие отдельные колонии бактерий пересевали и хранили в 15% - ном глицерине при - 70°С.

Определение сверхчувствительной реакции проводили на листьях табака и герани.

Для проведения тестов на патогенность были взяты семена культур семейств Мятликовых (Злаковых), Пасленовых, Капустных, Сложноцветных и Бобовых семеноводческих компаний «Сегрис», «Наш сад» и других. Растения были выращены в 15-см вазонах до стадии 3-5 настоящего листа и инокулированы методами опрыскивания и прищипывания края листа с бактериальной суспензией (концентрация 10^7 КОЕ/мл). Суспензия представляла собой смыв 2-х дневной культуры бактерий, выращенной на агаризованной питательной среде YDC. Растения каждого образца были инокулированы в двух экспериментах трижды для каждого штамма и инкубировались при постоянных температурах 24°С и 28°С. Учет симптомов проводили через 20 дней после заражения по 2-х бальной шкале: 0 – нет поражения, 1 – локальный некроз, или сосудистое поражение в месте инокуляции.

Идентификацию выделенных штаммов проводили с помощью метода ПЦР с использованием специфических праймеров, а также на основании мультилокусного секвенирования штаммов.

Таблица 1.
Распространенность бактерий рода *Xanthomonas* в семенах риса отечественного происхождения

Местонахождение обследуемого объекта	*Число проанализир. образцов*	*Частота встречаемости, % (фактическое число)*		
		X.campestris	*X.vesicatoria*	*X.arboricola*
Кизлярский р-н, Респ. Дагестан	68	8,8 (6)	7,35 (5)	4,4 (3)
Казбековский р-н, Респ. Дагестан	20	-	-	5 (2)
Гунибский р-н, Респ. Дагестан	10	20 (2)		-
Анучинский р-н, Приморский край	16	12,5 (2)	-	6,25 (1)
В среднем		10,3	1,83	3,9
Всего	114			

Из таблицы 1 видно, что из семян риса были выделены бактерии рода *Xanthomonas*: *X.campestris, X. vesicatoria* и *X.arboricola*. Наряду с бактериями рода *Xanthomonas*, в семенах риса, при проведении исследований, были обнаружены бактерии рода: *Curtobacterium* spp, *Pantoea* spp, *Pseudomonas* spp, *Microbacterium* spp.

Совместно с испытательной лабораторией Российской академии наук Институт общей генетик им. Н.И. Вавилова РАН было

проанализировано 19 партий семян ячменя (урожай 2011 года) из 7 регионов РФ: Алтайский край, Воронежская область, Курская область, Рязанская область, Тамбовская область, Амурская область, Омская область на наличие бактериозов. Во всех проанализированных образцах ячменя бактерии рода *Xanthomonas* не выявлены. Наиболее часто встречаемыми видами на семенах ячменя были: *Curtobacterium* spp, *Pantoea* spp, *Pseudomonas* spp, *Microbacterium* spp.

Таблица 2.
Распространенность бактерий рода *Xanthomonas* на злаковых культурах (коллекция ВНИИФ)

растение-хозяин	***Количество проанализир. штаммов***	***Частота встречаемости, % (фактическое число)***						
		X. campestris sp.	***X. arboricola sp.***	***X. cynarae***	***X. hortorum***	***X. pisi***	***X. gardeneri***	***X. translucens***
Рис	12	33 (4)	25 (3)	0	0	0	0	0
Пшеница	24	8,3 (2)	20 (5)	20 (5)	30 (7)	8,3(2)	8,3 (2)	0
Ячмень	20	0	55 (11)	0	10 (2)	0	0	5 (1)
Рожь	11	18 (2)	0	36 (4)	36 (4)	0	9 (1)	0
В среднем		14,8	25	14	19	2	4,3	1,25
Всего образцов	67							

Из таблицы 2 видно, что наиболее часто встречаемым видом в семенах злаковых культур является *X. arboricola*, в среднем частота выделения составила 25%. Данный вид был обнаружен в исследуемых образцах риса, пшеницы и ячменя.

Появление *X. arboricola* в России на новых видах растений одновременно с усилением вредоносности этого вида в зонах традиционного распространения патогена – Турции, Закавказских и Балканских странах,Средней Азии, Китае, США, Австралии и Африке, позволяет предположить расширение ареала патогенна на север европейской части РФ, а также дальнейшее увеличение числа поражаемых видов растений.

Следующим, наиболее распространенным был вид *X.hortorum.* Патовары *X.hortorum* (Vauterin et al, 1995) в различных странах вызывают болезни растений плюща (pv. *hederae*), пеларгонии (pv. *pelargonii*), одуванчика (pv. *taraxaci*), салат (pv. *vitians*). Данный вид был обнаружен в исследуемых образцах пшеницы, ячменя и ржи.

X.campestris был выделен из образцов риса, пшеницы и ржи. Как известно, *X. campestris* поражают только растения из сем. Капустных, Сложноцветные и Пасленовые. Следует отметить, что в 1998 году А.Н. Игнатов выделил бактерии из семян риса, который выращивался на поле после предшественника - капусты. Данные изоляты были определены нами как *X. campestris* pv. *campestris.*

При проведении исследований впервые нами были идентифицированы возбудители *X. cynarae*, *X. pisi*, и *X. gardeneri,* которые ранее на злаковых культурах не выявлялись. Данные виды обычно поражают растения из сем. Астровые, Бобовые, Пасленовые.

В литературных источниках нет данных о вредоносности *X. hortorum, X. campestris X. cynarae*, *X. pisi*, и *X. gardeneri* на растениях семейства Мятликовые, что говорит о том, что данные виды перешли к паразитизму на новых растениях-хозяевах. Фитопатогенные бактерии, несвойственные для наших широт, активно распространяются в России, увеличивая число поражаемых ими видов растений.

Появление неспециализированных патогенов, переходящих с культуры на культуру, затрудняет борьбу с ним агротехническими методами и снижает эффективность контроля чистоты семян и посевного материала. (Игнатов, 2012).

В результате проведенной работы было установлено, что в большинстве случаев на зерновых культурах встречаются *X. arboricola*, *X. campestris, X. hortorum*, *X. cynarae*. В единичных образцах обнаружили виды *X. pisi*, и *X. gardeneri.* Во всех проанализированных образцах ячменя и риса, а также в коллекции ГНУ-ВНИИ фитопатологии возбудитель бактериального ожога риса и бактериальной полосчатости риса не выявлены, что было доказано методом прямого секвенирования, ПЦР со специфичными праймерами на *Xanthomonas oryzae*, а также методом ПЦР «в реальном времени».

Литература

Игнатов А.Н. Бактериозы в России: угроза реальна // Агро XXI, - 2012. - С. 10 - 12.

Котляров В.В. Влияние бактериозов на качество зерна озимой пшеницы /В.В.Котляров, А.А.Дьяченко, Д.В.Котляров //Защита и карантин растений, - 2005. - №12. - С. 25-26.

Котляров В.В. Бактериальные болезни растений глобальная проблема современности/Котляров В.В.// Бактерииль-ные болезни растений — глобальная проблема современности, Материалы Всероссийской научно-практической конференции, г. Краснодар. -2009. - С.75

Пунина Н.В., Зотов В.С., Кузнецов Б.Б., Игнатов А.Н. Оценка генетического разнообразия межгенного транскрибируемого региона 16S-23S рРНК, гена GYRB и разработка ПЦР диагностики фитопатогенных ксантомонад// Вестник Московского государственного областного университета. – 2008. №2. С. 3-17.

Awoderu, V.A., Bangura, N. and John, V.T. Incidence, distribution and severity of bacterial diseases on rice in West Africa //Trop. Pest Manag. – 1991. - № 37. - P.113–117.

Broadfoot, W.C., and Robertson, H.T. Pseudo-black chaff of Reward wheat // Scientific Agriculture. - 1933. - №13. - P. 512-514.

Duveiller, E.L., Fucikovsky, L.and Rudolph, K. The bacterial diseases of wheat // Concept and methods of disease management. Mexico, D.F., CIMMYT. – 1997. – P. 1–78.

EPPO Data sheets on quarantine organisms. // CMI. - 1987. - № 340.

Hagborg, W.A.F. Black chaff, a composite disease. //Canadian Journal of Research. - 1936. - №14. - P.347-359.

Jones, L.R., Jonson, A.G., Reddy, C.S. Bacterial blight of barley// Journal of agricultural research. — 1917, - №11. — P. 625—643.

Mew, T.W., Alvarez, A.M., Leach, J.E. and Swings, J. Focus on bacterial blight of rice // Plant Dis. -1993. - №**77**. - P.5–12.

Ou, S.H. Rice Diseases // Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.- 1972

Reddy, C.S., Godkin, J., and Johnson, A.G. Bacterial blight of rye // Journal of Agricultural Research. - 1924.- № 28.- P. 1039-1040.

Schaad N.W., Jones J.B. and Lacy G. Xanthomonas// Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul. - MN. -2001. - V. 3. – P. 494—495.

Smith, E.F. A new disease of wheat //Journal of Agricultural Research.-1917.-№ 10. - P. 51-54.

Swings J. G., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W. and Kersters K. Reclassification of the causal agents of bacterial blight *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzae* and bacterial leaf streak *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzicola* of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* new species Ex Ishiyama // Int. J. Syst. Bacteriol. -1990.-V. 40. - P. 309–311.

Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. Reclassification of Xanthomonas — International Journal of systematic bacteriology — 1995, №45 — P.472—479.

Wallin, J.R. Parasitism of *Xanthomonas translucens* (J.J. and R.).-1946a.

Zhao W.J., Zhu S.F., Liao X.L., Tan T.W. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specifi c TaqMan probe//Molecular Biotechnology. - 2007. - V.35. - P. 119–127.

Zillinsky, F.J., and Borlaug, N.E. 1971. Progress in developing triticale as an an economic crop //Int. Maize Wheat Improv. Cen. Res. Bull. - 1971.- №, 17.- P.18-21.

ДИАГНОСТИКА НОВОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ПАТОГЕНА ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР *XANTHOMONAS ARBORICOLA* МЕТОДОМ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

М.С. Егорова [2], А.Н. Игнатов [1], Е.С. Мазурин [2]

[1]Кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии, Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

[2]ФГБУ Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ ВНИИКР), п. Быково, Московская область
e-mail masha_0787@mail.ru

DIAGNOSTIC NEW BACTERIAL PATHOGENS OF CEREALS *XANTHOMONAS ARBORICOLA* BY REAL - TIME PCR

M.S. Egorova[1,2], A.N. Ignatov[1,3], E.S. Mazurin[2]

[1] Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology, Russian People's Friendship University
Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

[2]All-Russian Plant Quarantine Center, Pogranichnaya 32, Bykovo, Ramenskoe, Moscow region, 140150, Russia.
e-mail masha_0787@mail.ru

Summary

Primers and Taqman probe were designed based on the analysis of the original and Gene Bank DNA sequences of Xanthomonas arboricola for the real-time PCR detection of this pathogen. The studies were identified temperature, number and duration of cycles of amplification, concentration's of primers and probe that makes the method more sensitive and specific for detection Xanthomonas arboricola. Sensitivity of the real time PCR for identifying Xanthomonas arboricola is not less than 30 CFU/ml.

Сотрудниками ВНИИ фитопатологии в 2001-2008 гг. впервые был выделен и изучен новый для России бактериальный патоген злаковых культур *Xanthomonas arboricola* [6], который вызывает поражение пшеницы, ржи, ячменя, овса, а также подсолнечника и крестоцветных культур. Стоит отметить, что ранее патовары данного вида бактерии паразитировали на ряде многолетних растений [6]: землянике (*X. arboricola pv. fragaria)*, фундуке (*X. arboricola pv. coryliva*), косточковых плодовых деревьях (*X. arboricola pv. pruni*), грецком орехе (*X. arboricola pv. jglandis*), молочае (*X. arboricola pv. poinsetticola*) и тополе (*X. arboricola pv. populi*) [1].

Бактериозы растений, вызываемые *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *populi*, *X. arboricola* pv. *juglandis* были отмечены в Российской Федерации, но возбудители заболеваний не изучались [2]. Известно, что *X. arboricola* pv. *celebensis* может находиться как эпифит или патоген на растениях и семенах пшеницы, ячменя, овса, ржи, кукурузы, моркови, сахарной свеклы, подсолнечника, льна, люцерны, крестоцветных растений, картофеля и люпина, гороха и фасоли [4], а *X. arboricola* pv. *juglandis* способна поражать растения семейства Brassicaceae при искусственном заражении [3].

Штаммы, принадлежащие к виду *Xanthomonas arboricola*, вызывают бактериозы злаков, преимущественно ячменя, и в меньшей степени – пшеницы, ржи и овса. Симптомы вызываемых *Xanthomonas arboricola* заболеваний внешне не отличаются от болезней, причиняемых другими бактериями рода *Xanthomonas*, специализирующимися на тех же растениях-хозяевах [1].

В последнее время усиливается вредоносность *Xanthomonas arboricola* на территории РФ, а также увеличивается число поражаемых им видов растений. Возникает необходимость в своевременной и точной идентификации данного возбудителя. В связи, с чем разработка новых, быстрых и эффективных методов диагностики имеет большое значение.

Целью настоящего исследования являлась разработка методов диагностики зараженности растений и семян *Xanthomonas arboricola* на основе метода ПЦР «в реальном времени».

Объекты и методы исследования. В работе использовали коллекцию бактерий *Xanthomonas* spp. (47 штаммов) ГНУ-ВНИИ фитопатологии РАСХН, типовые штаммы *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. arboricola* pv. *fragariae, X. translucens* pv. *undulosa*, штаммы бактерий, выделенные из семян риса, которые были определены нами как *X. arboricola,* а также разные виды фитопатогенных бактерий.

Бактерии культивировали на среде YDC [5]: глюкоза - 10 гр; дрожжевой экстракт - 10гр; $CaCO_3$ – 20 гр; агар – 18 гр.; дистиллированная вода 950 мл при 27°С в течение 48 ч.

Отбирали 1 петлю культуры и суспензировали в 1000 мкл стерильной воды. ДНК бактерий выделяли набором «Проба ГС» кат. № Р-003/1 («ДНК – Технология», Москва), основанным на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидина тиоцината (GuSCN), и с последующей сорбцией ДНК на носителе. После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она снимается элюирующим раствором.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 для количественного определения НК и белка.

Амлификацию и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США). Для проведения ПЦР «в реальном времени» были разработаны специфичные праймеры и зонд. Подбор праймеров и зонда осуществлялся на основе гена gyr B [7]. Из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) были выбраны нуклеотидные последовательности гена gyr B *Xanthomonas* spp. Также при анализе использовали данные секвенирования штаммов из собственной коллекции. Анализ последовательностей и выбор праймеров проводили с помощью программ «BioEdit» и «Primer 3». Синтез праймеров и зондов проводили в ЗАО «Синтол», Москва.

В процессе оптимизации ПЦР в «режиме реального времени» для праймеров и зонда подбирали температурный режим, число и продолжительность циклов амплификации, концентрацию зонда и праймеров.

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл и включал 2,5 мкл 10хПЦР буфера MagMix (ООО «Диалат Лтд», Москва), 20 пкМ праймеров, 5 пкМ зонда, 5 нг целевой ДНК и стерильную воду. Реакцию проводили при следующих температурно-временных условиях: 1 цикл 95°С – 5 мин; 40 циклов 95°С – 15 сек, 55°С – 40 сек.

Для определения чувствительности подобранного зонда из суточной культуры готовили суспензию и проводили серию 10-кратных разведений. Концентрацию бактерий определяли путем посева по 100 мкл суспензии из каждого разведения на питательную среду для определения КОЕ. Оптическая плотность OD_{600} в исходной пробирке составляла 1,0, а количество КОЕ было равно $2x10^8$ кл/мл, в конечной пробирке количество КОЕ составило $2x10^{-1}$ кл/мл. Из каждого разведения с использованием набора «Проба ГС» выделяли ДНК и проводили ПЦР в реальном времени.

Результаты и обсуждения. Для разработки метода ПЦР «в реальном времени» для диагностики *Xanthomonas arboricola* были проанализированы нуклеотидные

последовательности гена gyr B данного возбудителя, а также других видов рода *Xanthomonas*. На основании выровненных последовательностей, нами были подобраны праймеры X.arb-F/ X.arb-R и зонд X.arb-P, содержащий флуоресцентную метку ROX на 5' конце и гаситель флуоресценции BHQ2 на 3'конце, специфичный для *Xanthomonas arboricola* (табл.1).

Таблица 1.
Праймеры и зонд, разработанные для диагностики *Xanthomonas arboricola*

Праймеры и зонд	*Мишень в геноме*	*Ориентация*	*Последовательность 5'→3'*
X.arb-F	gyr B	правый	GGTGCATCCCACCCTGG
X.arb-R		левый	GCGCTTGGCCTCTTCCA
X.arb-P		зонд	ROX – CTCGGCGTCGCTGG-BHQ2

Экспериментальный подбор оптимальной температуры отжига зонда проводили с использованием градиента температуры отжига (55^0C – 65^0C). В таблице 2 представлены результаты ПЦР «в реальном времени» с праймерами и зондом для *X.arboricola*. Как видно из таблицы, значения порогового цикла детекции флуоресценции различались при использовании различных температур отжига зонда. Было установлено, что оптимальной температурой отжига являлось значение 55^0C, так как при данной температуре регистрировалось минимальное значение порогового цикла (Ct).

Таблица 2.
Определение температуры отжига зонда при постановке ПЦР «в реальном времени» для *X. arboricola*

Температура отжига, С°	*Значение Ct*	*Температура отжига, С°*	*Значение Ct*
65	N/A	58,8	26,97
64,46	N/A	57	26,75
63,27	30,20	55,8	27,44
61,43	27,37	55	24,73

Примечание: NA* - отсутствие сигнала флуоресценции

Для определения оптимальной концентрации зонда и праймеров, были приготовлены реакционные смеси с разным количеством зонда от 5 пМ до 10 пМ и праймеров от 7,5 пМ до 20 пМ. Из таблицы 3 видно, что концентрация зонда и праймеров в составе реакционной смеси сильно влияла на значение Ct. Наилучшие результаты были получены при использовании концентрации зонда 5 пкМ и 20 пкМ каждого праймера в расчете на одну реакцию.

Таблица 3.
Определение оптимальной концентрации зонда и праймеров при постановке ПЦР «в реальном времени»

Концентрация праймера и зонда, на одну реакцию, пмоль	7,5+5	7,5+7,5	7,5+10	15+ 5	15+7,5	15+10	20+5	20+7,5	20+10
Значение Ct	28,88	N/A	30,32	N/A	N/A	N/A	23,68	25,67	31,91

Далее проверяли специфичность зонда. Было установлено, что флуоресценция по красителю ROX регистрировался только при наличии ДНК *Xanthomonas arboricola*. Подобранный зонд не давал ложноположительных реакций с другими видами рода *Xanthomonas* spp, а также другими видами фитопатогенных бактерий (табл.4).

Таблица 4.
Специфичность ПЦР «в реальном времени» с зондом X.arb-P

ДНК возбудителя	*Зонд X.arb-P*	*ДНК возбудителя*	*Зонд X.arb-P*
X. oryzae	NA	*X.pisi*	NA
X.campestris	NA	*X.gardeneri*	NA
X.axonopodis	NA	*Erwinia amylovora*	NA
X.arboricola	24,56	*Dickeya dianthicola*	NA
X.hortorum	NA	*Pantoea agglomerans*	NA
X.cynarae	NA	*Pseudomonas sp.*	NA

При постановке ПЦР «в реальном времени» чувствительность зонда определяли с помощью серии 10-кратных разведений суточной культуры *X. arboricola.* Чувствительность специфичного зонда определялась как минимальное детектируемое количество КОЕ/мл.

Чувствительность разработанного зонда была проверена с помощью ПЦР «в реальном времени», с образцами последовательных разведений суспензий, содержащих известное количество клеток возбудителя. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5.
Значение Ct при разных концентрациях X.arboricola (клеток/мл) при постановке ПЦР «в реальном времени»

Концентрация X.arboricola, клеток/мл	$3x10^8$	$3x10^7$	$3x10^6$	$3x10^5$	$3x10^4$	$3x10^3$	$3x10^2$	$3x10^1$	$3x10^0$	$3x10^{-1}$
Значение Ct	16,56	19,80	22,7	29,70	33,38	35,37	36,60	37,05	NA	NA

Из таблицы видно, что концентрация клеток возбудителя влияла на значение порогового цикла Ct. С уменьшением концентрации, увеличивалось значение порогового цикла, что указывало на снижение содержавшейся ДНК в образце. Таким образом, чем ниже был предел обнаружения возбудителя, тем выше была чувствительность подобранного зонда, которая составила не менее 30 КОЕ /мл.

Выводы

Подобранные праймеры и зонд, меченный флуоресцентным красителем ROX, позволяют проводить ПЦР «в реальном времени» для выявления и идентификации *X. arboricola*.

В результате проведенных исследований были определены оптимальные условия для проведения ПЦР в режиме реального времени для вида *X. arboricola*, которые делают метод более чувствительным и специфичным для выявления данного возбудителя.

Чувствительность разработанного метода ПЦР «в реальном времени» составила не менее 30 КОЕ/мл.

Литература

1. Игнатов А.Н., Пунина Н.В., Матвеева Е.В., Пехтерева Э.Ш., Политыко В.А., Корнев К.П. *Xanthomonas arboricola* – бактериальный патоген сельскохозяйственных культур в России //Защита и карантин растений. - 2010.- № 4. - С. 41-43.
2. Пунина Н.В., Зотов В.С., Кузнецов Б.Б., Игнатов А.Н. Оценка генетического разнообразия межгенного транскрибируемого региона 16S-23S рРНК, гена GYRB и разработка ПЦР диагностики фитопатогенных ксантомонад//Вестник Московского государственного областного университета. – 2008.- №2. С. 3-17.
3. Dye D.W., Lettiot R.A. Genus Xanthomonas // Bushanan. - 1968. - V.-8. - P. 339-345.
4. PQS (Plant Quarantine Service) of Indonesia. 2008. (http://karantina-lampung.deptan.go.id/)
5. Schaad N.W., Jones J.B. and Lacy G. Xanthomonas// Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul.- MN. -2001. - V. 3. – P. 494—495.
6. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. Reclassification of Xanthomonas //International Journal of systematic bacteriology. – 1995. - V. 45. – P. 472—479.
7. Weller S.A., Beresford-Jones N.J., Hall J., Thwaites R., Parkinson N., Elphinstone J.G.. Detection of Xanthomonas fragariae and presumptive detection of Xanthomonas arboricola pv. fragariae, from strawberry leaves, by real-time PCR//Journal of Microbiological Methods. -2007. - V. 70, - P. 379–83.

ПРЕПАРАТ «ЗЕРОКС» НА ОСНОВЕ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО СЕРЕБРА КАК ЭЛЕМЕНТ ЭФФЕКТИВНОЙ БОРЬБЫ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ И ГРИБНЫМИ ЭПИФИТОТИЯМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЗЯЙСТВЕННО ЗНАЧИМЫХ РАСТЕНИЙ

П.М. Жеребин[1], А.Н. Игнатов[2], С.Н. Еланский[1], М.А. Побединская[1], Г.В. Лисичкин[1], А.Н. Денисов[3], Ю.А. Крутяков[1]

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, e-mail: yurii@petrol.chem.msu.ru

[2] ГНУ ВНИИ фитопатологии ФАНО России, 143050, Московская область, Одинцовский район, п/о Большие Вяземы

[3] Группа компаний «АгроХимПром», 656065, Барнаул, ул. Попова, д. 98а

«ZEROKS»- SILVER-BASED PREPARATE FOR AN EFFECTIVE CONTROL OF BACTERIAL AND FUNGAL EPIDEMIC DISEASES OF AGRICULTURAL PLANTS

P.M. Zherebin[1], A.N. Ignatov[2], S.N. Elansky[1], M.A. Pobedinskaya[1], G.V. Lisichkin[1], A.N. Denisov[3], Y.A. Krutyakov[1]

[1] Moscow State University, 119991, Moscow, Lenin Hills, d. 1, e-mail: yurii@petrol.chem.msu.ru

[2] Russian Research Institute of Phytopathology 143050, Moscow region, Odintsovo district, p/b Bolshie Vyazemy

[3] Group of companies «AgroChimProm», 656065, Barnaul, ul. Popova, d. 98a

Summary

Antifungal Activity of «Zeroks®» against P. infestans is over Mancozeb activity and is comparative to such widely used fungicides as chlorothalonil and fluazinam. Fungicidal effect of «Zeroks®» against pathogens of genus Alternaria was higher than for mancozeb, and much higher than that of chlorothalonil. The results show good prospects for the use of «Zeroks®» as a contact fungicide with broad spectrum of activity.

Не секрет, что в последние годы проблема эффективной борьбы с бактериальными и грибными фитопатогенами становится все более актуальной. Это связано с появлением и развитием новых штаммов грибов и бактерий, обладающих множественной резистентностью к большинству используемых коммерческих пестицидов. Благодаря тому, что, как правило, органические химические пестициды способны воздействовать лишь на узкий спектр клеточных мишеней патогена, микроорганизмы с высокой фенотипической и генотипической изменчивостью имеют возможность вырабатывать механизмы ферментативной или иной дезактивации воздействующих на них молекул и в результате естественного отбора вытеснять штаммы, чувствительные к действию пестицидов.

Очень часто появление штаммов с множественной устойчивостью к пестицидам обусловлено недостаточным внесением последних, либо несоблюдением кратности обработок в целях экономии. Такой подход рано или поздно неизбежно приводит к увеличению пестицидной нагрузки на сельскохозяйственные культуры до предельно разрешенных максимальных значений (а иногда и больше), что в будущем не может не иметь негативных последствий для конечных потребителей продукции. Увеличение пестицидной нагрузки связано еще и с тем, что, как правило, патогенные возбудители бактериозов не восприимчивы к действию фунгицидов, и внесение бактерицидов становится неизбежным дополнением к внесенным фунгицидам. Отдельно следует отметить, что особую настороженность вызывает информация о все чаще встречающихся случаях выявления на территории РФ генно-модифицированных высоковирулентных микроорганизмов с множественной устойчивостью неизвестного происхождения.

В свете сказанного, основные усилия исследователей в области разработки новых средств защиты растений должны быть направлены на создание экологически безопасных препаратов, способных одновременно поражать множество клеточных мишеней бактериальных и грибных фитопатогенов, лишая, тем самым микроорганизмы с высокой фенотипической изменчивостью возможности вырабатывать механизмы ферментативной дезактивации действующих веществ, входящих в состав средств защиты растений.

Последнее десятилетие ознаменовано бурными исследованиями в области получения наночастиц серебра (высокодисперсного серебра), химического модифицирования их поверхности, изучением биологических свойств, механизмов воздействия на клетки бактерий и грибов, растений и животных. Исторически сложилось так, что серебро традиционно использовалось только в медицине по причине его высокой стоимости, а для борьбы с бактериальными и грибковыми

вредителями в сельском хозяйстве использовались препараты меди. Соли меди действительно эффективны, однако дозы их внесения достаточно велики для их естественного выведения из плодородного слоя грунта, что приводит к неизбежному накоплению металла в почве и растениях. По этой причине во многих европейских странах отказываются от препаратов меди. С другой стороны прогресс в области синтеза и модифицирования наночастиц серебра позволил создать препараты наносеребра, обладающие превосходными физико-химическими характеристиками, совместимостью с большинством традиционных пестицидов в баковых смесях и, что самое важное, высокой биологической эффективностью в борьбе с основными фитопатогенами в концентрациях, значительно меньших таковых для большинства используемых фунгицидов и бактерицидов.

Специалистами Химического и Биологического факультетов МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке Группы Компаний «АгроХимПром» создаются и изучаются препараты на основе коллоидного серебра, поверхностно модифицированного различными биологически активными ПАВ и полимерами, пригодные для использования в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста растений, эффективных контактных фунгицидов и бактерицидов для листовых обработок, протравителей зерна и клубней как перед посадкой, так и перед закладкой на хранение.

Одним из знаковых препаратов, разработанных коллективом МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке ГК «АгроХимПром» является контактный бактерицид и фунгицид «Зерокс®» (ВКР), действующим началом которого выступают частицы наноразмерного серебра, специальным образом модифицированные биоразлагаемым и абсолютно безопасным поверхностно-активным веществом. В соответствии с программой регистрационных испытаний пестицида «Зерокс®» (ВКР), утвержденной МСХ РФ, в 2014 г. проводятся регистрационные полевые испытания препарата на различных культурах.

Хорошо известно, что из-за трудно контролируемого развития грибных и бактериальных болезней растений подчас теряется значительная часть урожая. Химические пестициды, применяемые для обработки семян, а также вегетирующих растений или клубней картофеля перед закладкой на хранение, весьма токсичны для людей и животных и, как правило, не оказывают воздействия на возбудителей бактериальных гнилей, что позволяет им легко перезаражать клубни и зерно при хранении. Поэтому назрела необходимость в разработке безопасного для людей и животных препарата, обладающего как бактерицидными, так и фунгицидными свойствами. Многочисленные попытки использования для этих целей биопрепаратов и экстрактов растений не показали эффективности и коммерческой рентабельности в применении. «Зерокс®» проявил высокую антибактериальную активность в сочетании с фунгицидным эффектом. «Зерокс®» активен в отношении основных грибов-патогенов растений – *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum* sp., *Helminthosporium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, а также в отношении всех бактериальных патогенов, в частности *Ralstonia* spp., *Erwinia* spp., *Corynebacterium sepedonicum, Pectobacterium carotovorum, Dickeya dianthicola, Agrobacterium tumefaciens, Xanthomonas vesicatoria, Clavibacter michiganensis, Xanthomonas campestris* и многие другие. Препарат очень стабилен, самостоятельно редиспергируется в растворе после циклов замораживание – размораживание и высыхание – разведение. Препарат безвреден для людей и животных, практически безвреден для насекомых, что делает возможным его применение, например, для защиты продовольственного и технического картофеля. При обработке семенных клубней он может быть использован в смеси с высокоэффективными химическими фунгицидами для усиления фунгицидного эффекта. Кроме того, «Зерокс®» может использоваться в качестве эффективного протравителя семян злаковых растений перед посадкой.

Полученные экспериментальные результаты показывают подавление радиального прироста колоний всех исследованных видов грибов при добавлении «Зерокса®» в концентрации (по серебру) более 10 мг/л (табл. 1). Высокая эффективность отмечена против возбудителей болезней картофеля: ризоктониоза (*R. solani*), фитофтороза (*P. infestans*), антракноза (*C. coccodes*), серебристой парши (*H. solani*), альтернариоза (*A. solani*), а также *S. sclerotiorum*. Фунгицидный эффект в отношении *A. alternata* и *F. solani* был слабее (табл. 1).

Согласно результатам проведенного опыта по влиянию препарата «Зерокс®» на непрямое прорастание зооспорангиев *P. Infestans* было показано, что препарат достоверно снижал прорастание зооспорангиев. Так, в контроле среднее число проросших (пустых) зооспорангиев в поле зрения микроскопа при увеличении х150 составило от 54 до 80 шт., в вариантах с применением «Зерокса®» 25 мг/л (по серебру) – от 0.2 до 12; при 100 мг/л – от 0.3 до 2.3. Максимальное среднее число проросших зооспорангиев в опыте с препаратом Ширлан составило 0.3. Таким образом, «Зерокс®» снижал прорастаемость зооспорангиев

Таблица 1.
Воздействие Зерокса на рост колоний фитопатогенных грибов на питательной среде

Исследуемый организм	*Концентрация серебра в среде, мг/л*					*EC_{50}*, мг/л*
	0.0 (контроль)	*0.1*	*1.0*	*10.0*	*100.0*	
P. infestans	100	90**	55	33	0	3.1
R. solani	100	95	78	2	0	4.3
F. solani	100	91	91	41	33	8.3
C. coccodes	100	100	94	23	0	6.6
H. solani	100	97	83	50	10	10
A. alternata	100	93	107	52	41	28
A. solani	100	92	92	35	22	7.7
S. sclerotiorum	100	93	73	0	0	3.9

Прим.:

*концентрация фунгицида (в данном случае серебра), снижающая радиальный прирост колонии гриба на питательной среде с добавлением фунгицида в 2 раза относительно бесфунгицидного контроля,

**приведено отношение диаметра колонии на среде с добавлением фунгицида к диаметру на среде без фунгицида (в %). Замер диаметров исследуемых колоний проводился в момент, когда диаметр колонии гриба на бесфунгицидном контроле составлял около 0.75 диаметра чашки Петри.

P. infestans на уровне фунгицида «Ширлан», хотя концентрации «Зерокса®» были ниже, чем «Ширлана». Представленные данные показывают перспективность применения «Зерокса®» в качестве контактного фунгицида против P. infestans. Таким образом, проведенные эксперименты подтвердили высокую фунгицидную активность препарата «Зерокс®». Результаты оценки фунгицидного эффекта «Зерокса®» по порядку величин совпадали с данными, полученными при оценке фунгицидной эффективности наночастиц серебра в других лабораториях мира. Так, в наших исследованиях эффективная концентрация EC50 «Зерокса®» для большинства исследованных видов грибов варьировала от 3.1 до 10 мг/л; максимального значения она достигала для A. alternata – 28 мг/л.

Анализ литературных данных показывает, что фунгицидная активность «Зерокса®» в отношении *P. infestans* превышает активность манкоцеба и находится на уровне таких широко используемых в практике фунгицидов, как флуазинам и хлороталонил. Фунгицидный эффект препарата «Зерокс®» в отношении возбудителей альтернариоза выше, чем у самого популярного в России фунгицида манкоцеб, и намного выше, чем у хлороталонила. Полученные результаты показывают хорошие перспективы использования «Зерокса®» в качестве контактного фунгицида широкого спектра действия.

БАКТЕРИОЗЫ КАРТОФЕЛЯ КАК ФИТОСАНИТАРНАЯ ПРОБЛЕМА СЕМЕНОВОДСТВА

М.И. Жукова, Г.М. Середа
Институт защиты растений, Минский район, Беларусь
e-mail: belizr@tut.by

POTATO BACTERIOSISES AS A PHYTOSANITARY PROBLEM OF SEED PRODUCTION

M.I. Zhukova, G.M. Sereda
Institute of plant protection, Minsk region, Belarus

Summary

In the article the potato bacteriosises are marked as a phytosanitary problem in seed material production. The results of studying the bacterial diseases incidence on cultivated in Belarus potato varieties decreasing seed funds sowing qualities and their storage ability are presented. A high level of latent infection by phytopathogenic bacteria is shown what demands both deeper studying of this form of phytopathogens existence and search of their effective control means while producing elite on the improved basis.

Введение. В Беларуси картофелеводство является одной из важных отраслей агропромышленного комплекса. Исторически сложившиеся природно-климатические и экономические условия республики издавна благоприятствовали выращиванию картофеля [2]. Получение высоких и устойчивых урожаев картофеля, его сохранение в настоящее время приобретает все большую актуальность. Однако, несмотря на то, что генетический потенциал районированных в республике сортов картофеля достигает 50-70 т/га, о чем свидетельствуют результаты госсортоиспытаний, в реальных условиях сельскохозяйственных организаций урожайность удается получить на уровне 10-18,4 т/га или реализация потенциала сортов в целом не превышает 20-30 % [8]. Одной из основных причин снижения эффективности картофелеводства является сильное развитие болезней на растениях и клубнях, вызванное отсутствием сортов с комплексной устойчивостью к патогенным микроорганизмам [5]. Важнейшей для картофеля в Беларуси остается проблема бактериальных болезней как наиболее вредоносных, определяющих семенные качества клубней и сортовые качества посадок [10]. Целью настоящих исследований было изучение распространенности бактериозов на семенном материале возделываемых сортов картофеля.

Материал и методы исследований. Основу исследования составили результаты фитопатологической оценки элитных семян в грунтконтроле, проводимого в РУП «Институт защиты растений» Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию. В работе использованы методы фитосанитарного мониторинга, сравнительного анализа [9,10] и стандартные статистические процедуры при помощи пакета прикладных программ Microsoft Excel для Windows.

Результаты исследований. Из числа нормируемых действующим национальным стандартом и выявляемых на семенном материале особо опасных болезней бактериозы на клубнях обнаруживали в виде мокрой гнили, а на растениях их проявление сопровождалось гнилью стеблей и (или) полной их гибелью. Как показывают результаты проведенных нами исследований, среди испытываемого в грунтконтроле семенного материала сортообразцы с наличием мокрой гнили присутствовали ежегодно, в том числе и сверх допусков (1 %) действующего национального стандарта (рисунок 1).

Рисунок 1. Пораженность элитных семян картофеля мокрой гнилью (по данным грунтконтроля, РУП «Институт защиты растений»)

Нельзя не отметить, что пораженные клубни или растения, присутствующие в том или ином количестве в пределах фитосанитарных допусков действующего национального стандарта в семенном материале, особенно на заключительных этапах семеноводства (элитное, репродукционное), оказываются по своей сути источниками инфекции (хотя и минимизированными по количеству) для последующих репродукций. Усугублению фитосанитарной ситуации по бактериозам на картофеле способствует отсутствие ограничений на скрытую бактериальную инфекцию в растениях и клубнях при получении репродукционных семян, допустимость 2 % уровня пораженности растений бактериальными болезнями в этой же категории посева, допуск по наличию 1 % мокрой гнили в клубневом материале элитных и репродукционных семян [10]. Возбудителями мокрой гнили, как известно, являются фитопатогенные бактерии, хотя идентифицировать фитопатогена бактериальной природы во время проведения клубневых анализов крайне затруднительно, при смешанном типе поражения – в особенности. О фитосанитарной напряженности, которую формирует нормативный допуск по мокрой гнили в 1 %, красноречиво демонстрирует следующий пример. Так, при ориентации на густоту посадки 60000 клубней на 1 га в качестве источника бактериальной инфекции

из-за вышеуказанного фитосанитарного допуска может оказаться в гектарной норме до 600, а на 100 га посева – до 60000 пораженных мокрой гнилью клубней. Поскольку фитопатогенные бактерии являются раневыми паразитами, для массового распространения бактериозов создают условия всякого рода механические повреждения клубней при погрузке-разгрузке, транспортировке и посадке, что ведет как к изреженности посадок, так и к передаче инфекции последующему клубневому поколению. Подтверждение этому – ежегодное, как указано выше, выявление мокрой гнили в элитных семенах (рисунок 1) с распространенностью черной ножки в период вегетации от 1,3 до 3,8 % (рисунок 2).

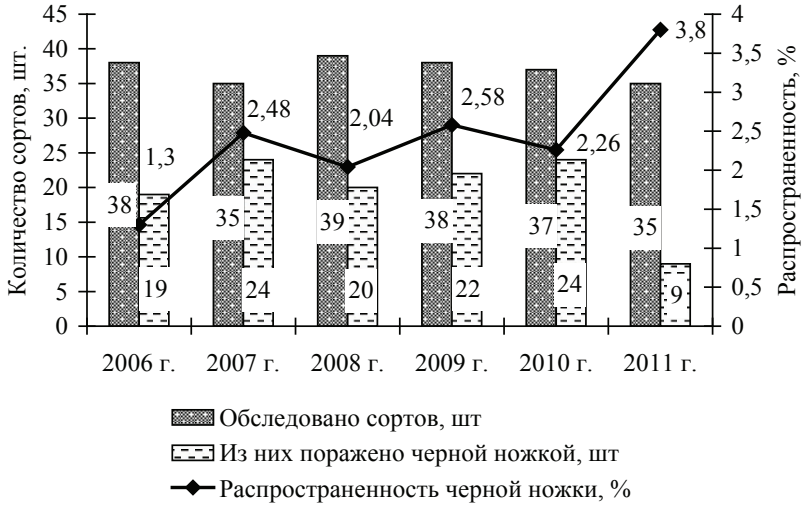


Рисунок 2. Распространенность черной ножки на сортах картофеля в период вегетации (по данным грунтконтроля, РУП «Институт защиты растений»)

О возможной амплитуде колебаний пораженности сортов черной ножкой по регионам производства элитных семян свидетельствуют данные таблицы.

Таблица.
Пораженность сортов картофеля черной ножкой
(по данным грунтконтроля, РУП «Институт защиты растений», 2009 г.)

Происхождение элитных семян (область)	*Показатель*			
	сорт	*пораженность растений, %*	*сорт*	*пораженность растений, %*
Брестская	Архидея	1,7	Здабытак	0,7-2,1
	Живица	2,0-3,0	Атлант	0,6-3,3
	Журавинка	0,7-5,1	Лилея	1,0
	Криница	0,7-4,0	Колорит	3,0
	Скарб	0,7-7,4	Луговской	1,6
Витебская	Атлант	1,3	Скарб	1,4
	Журавинка	3,3	Криница	3,3
Гомельская	Атлант	0,7-3,1	Журавинка	3,3-3,7
	Луговской	0,6	Одиссей	0,7-3,4
	Скарб	0,8	Ветразь	0,7-3,8
	Явар	0,7-26,5	Ласунак	4,8
	Криница	1,6	Альпинист	8,1
Гродненская	Блакит	0,6	Скарб	0,7-2,3
	Ветразь	2,1	Атлант	0,8
	Журавинка	0,7-5,7	Уладар	0,6
	Здабытак	1,6-4,3	Явар	1,4
	Луговской	0,8	Одиссей	2,6

Могилевская	Архидея	1,6	Криница	0,7
	Журавинка	1,3-4,1	Живица	4,7
	Луговской	0,7	Здабытак	5,4
	Скарб	4,5-8,0	Колорит	4,7
Минская	Атлант	0,6-3,5	Явар	0,7-1,5
	Журавинка	0,7-12,4	Талисман	12,9
	Каретта	0,7	Молли	0,7
	Криница	0,7-6,0	Живица	0,7-1,6
	Одиссей	0,7-4,2	Здабытак	3,6
	Скарб	0,6-5,3	Веснянка	0,7
	Ветразь	1,5	Уладар	0,6

Исходя из представленных в таблице результатов, распространенность черной ножки на районированных сортах картофеля при получении элитных семян может достигать значительного уровня, тогда как ее наличие в данной категории посадок стандартом не допускается вовсе.

Фитосанитарную напряженность по бактериозам семенного картофеля создает также то, что при закладке питомника супер-суперэлиты исходным материалом, приобретенным элитопроизводящими хозяйствами у субъектов оригинального семеноводства, распространенность черной ножки оказывается значительной (в ряде случаев, по полученным нами данным, от 1 до 7 %, что не укладывается в рамки фитосанитарных требований действующего в Беларуси стандарта).

Следует отметить, что возбудителей черной ножки относят к роду Pectobacterium. Наиболее часто болезнь вызывают виды Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (Jones, 1901) и Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum (van Hall, 1903) [11].

Как указано выше, условия для массового распространения бактериозов создают и механические повреждения клубней. При посадке частями клубней количество кустов, пораженных бактериальными болезнями, неизбежно увеличивается. В среднем одноразовый разрез больного с бактериальной инфекцией клубня заражает 50 здоровых клубней [1]. Что касается кольцевой гнили, то посадочный материал, пораженный на 1 %, дает более 50 % больных растений, а при заражении 10 % маточных клубней – 75 % инфицированных клубней нового урожая [7].

Как свидетельствуют проводимые нами исследования, в производстве семенного картофеля чрезвычайно актуальна проблема латентных инфекций. Экспериментальное моделирование получения элиты на оздоровленной основе по сокращенной схеме (первое клубневое поколение - суперсуперэлита - суперэлита – элита) показало, что бактериальная инфекция (черной ножки и кольцевой гнили) может накапливаться в латентной (скрытой) форме в значительных количествах (до 40 % и выше). Инфицированность бактериями растений первого клубневого поколения при проведении эксперимента в полевой культуре достигала в наших экспериментах 5-8 % (рисунок 3).

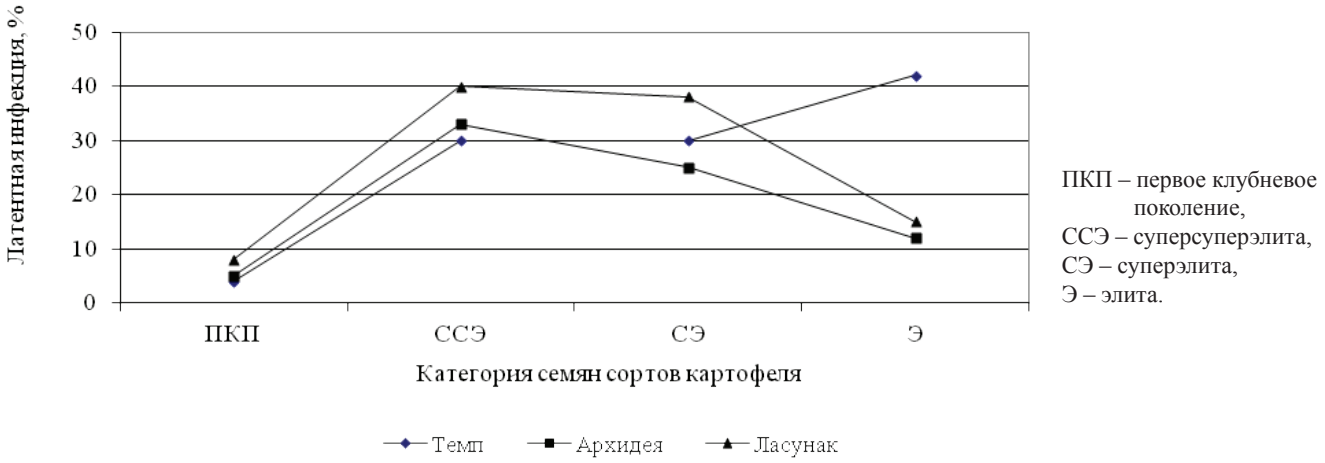


Рисунок 3. Сохранность латентной бактериальной инфекции при размножении оздоровленных сортов картофеля (по результатам ИФА-диагностики)

Продолжительность существования бактериальной инфекции в латентной форме определяется условиями, приводящими к активному накоплению фитопатогенных бактерий, включая количество бактериальных клеток, необходимых для заражения, степень устойчивости сорта к заболеванию, наличия повышенной влажности и низких температур в конце вегетации и в период хранения клубней.

При исследовании партий клубневого материала латентная инфекция возбудителя кольцевой гнили – бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kott.) Davis et al. - карантинного для Беларуси объекта, обнаруживается уже на уровне 15 % [4]. Как известно, развитие скрытой формы кольцевой гнили зависит в значительной степени от погодных условий в год выращивания картофеля. После засушливого периода вегетации и высоких летних температур симптомы болезни на растениях бывают незначительными, однако можно прогнозировать увеличение числа клубней со скрытой формой инфекции [3]. Присутствие латентной бактериальной инфекции возможно в семенных клубнях коммерческих партий картофеля [12].

В настоящее время повышаются риски распространения новых бактериальных инфекций, которые не регламентируются действующим в Беларуси национальным стандартом. Например, вызывает опасения новая картофельная раса бактерии *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (бактериальный рак картофеля и томатов). По сравнению с типичным возбудителем кольцевой гнили картофеля этот патоген, как известно, обладает более высокой вредоносностью и агрессивностью при поражении растений в поле и латентной фазой в период хранения. Разнообразие возбудителей черной ножки картофеля дополняют такие виды, как *Dickea dianthicola* и *D. solani* [6]. Несмотря на предпринимаемые фитосанитарные меры, не исключено проникновение возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

Между тем, фитосанитарная безопасность семян является основой любой системы защиты растений, гарантирующей сохранение урожая и получение экологически безопасной и биологически полноценной продукции.

Выводы. Система производства семенного картофеля испытывает воздействие бактериозов. Вероятность распространения бактериальных болезней – мокрой гнили клубней и черной ножки в элитных семенах картофеля достаточно высока. По регионам производства элитных семян в Беларуси варьирование пораженности возделываемых сортов черной ножкой возможно в широком диапазоне (0,6-26,5 %).

Установлен высокий уровень латентной бактериальной инфекции (до 40 % и выше в зависимости от клубневых поколений и сортовых особенностей), что требует как более углубленного изучения этой формы существования фитопатогенов, так и поиска путей эффективного их контроля при производстве элиты на оздоровленной основе.

Литература

1. Адамов И.И. Семеноводство картофеля. – Минск: Урожай, 1967. – 151 с.
2. Белоусов А.Г. Структурное формирование и государственное регулирование отрасли картофелеводств Республики Беларусь // Материалы Белорусско-Нидерландского семинара по картофелеводству (Минск – Самохваловичи, 12-13 марта, 1998 г.). – Минск, 1998. – С. 21 – 24
3. Влияние монойодацетата и теплового шока на выживаемость возбудителя кольцевой гнили картофеля / Е.В. Рымарева [и др.] // Картофелеводство: сб. науч. тр. /РУП «Науч.-практ. центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол. В.Г. Иванюк (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2008. – Т.14. – С. 430-439.
4. Ерчик К.П. Определение латентной инфекции кольцевой гнили // Актуальные вопросы защиты растений в интенсивных технологиях. - Горки, 2003. - С.45-67.
5. Иванюк В.Г., Соболь Я.В., Журомский Г.К Особенности взаимоотношений между возбудителями грибных, бактериальных и вирусных болезней картофеля: Сб. науч. тр. / Защита растений – Минск, 2003. – Вып. 27. – С.97–114
6. Игнатов А.Н. Необходимо усилить борьбу с бактериозами картофеля // Картофель и овощи. – 2011. - № 5. – С. 28-29.
7. Клубневые гнили картофеля / Н.А. Дорожкин [и др.]. – Минск: Наука и техника, 1989. – 135 с.
8. Рубель М.И. Состояние картофелеводства в Республике Беларусь / Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП «Науч.-практ. центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол.: В.Г. Иванюк (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2008. – Т. 15. – С. 371-380.
9. Семеноводство картофеля: контроль качества и сертификация: методическое пособие / под ред. А.В. Коршунова, Б.А. Анисимова. - М., 2003. – 351 с.
10. СТБ 1224-2000. Картофель семенной. Технические условия. Государственный стандарт Республики Беларусь. – Минск: Госстандарт, 2000. - 13 с.
11. Шутинская И.А. Динамика устойчивости клубней картофеля к черной ножке при хранении // Земляробства і ахова раслін. – 2010. - №6(73). – С. 39-41.
12. Recent outbreak of Erwinia chrysanthemi in Israel: Monitoring in seed tubers / L. Tsror [et al.]. - Phytoparasitica. - 2007. - № 35(2). - P. 215.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ *DICKEYA DIANTHICOLA* И *DICKEYA SOLANI* В РОССИИ С 2001 ПО 2013 ГГ.

А.Н. Игнатов[1,2,3], А.Н. Карлов[4], Ф.С. Джалилов[5], В.Е. Карандашов[6], М.С. Князькина[6], К.П. Корнев[7], Э.Ш. Пехтерева[2]

[1]Центр «Биоинженерия» РАН, Москва 117312.;
[2]ВНИИ фитопатологии Россельхозакадемии, Большие Вяземы, Московской обл. 143050;
[3]Российский Университет Дружбы народов, Москва;
[4]БАСФ-Россия, Москва;
[5]РГАУ - МСХА им. К.А. Тимирязева;
[6]Диагностический центр «Фитоинженерия», ООО, Дмитровский р-н., Московской обл.;
[7]Всероссийский центр карантина растений - ВНИИКР, Быково, Московской обл.

SPREADING OF POTATO BLACK LEG CAUSED BY *DICKEYA DIANTHICOLA* AND *DICKEYA SOLANI* IN RUSSIA AT 2001 - 2013

A. Ignatov[1,2,3], A. Karlov[4], F. Dzhalilov[5], V. Karandashev[6], M. Knyazkina[6], K. Kornev[7], E. Pekhtereva[2]

[1] Center «Bioengineering» RAS, Moscow;
[2] Russian Research Institute of Phytopathology, Bolshie Vyazemy, Moscow region;
[3] Russian Peoples' Friendship University, Moscow;
[4] BASF, Moscow, Russia;
[5] Russian Agrarian University -MSKHA after K.A. Timirjazeva;
[6] Diagnostic Center «Fitoinzheneriya» Ltd., Dmitrov district., Moscow region;
[7] Russian Plant Quarantine Centre – VNIIKR, Bykovo, Moscow region.

Summary

Surveys of several regions of Russian Federation at 2009 showed presence of new potato pathogens – bacteria of genus Dickeya. At 2013 we found 8-folds higher frequency of Dickeya dianthicola and Dickeya solani found in field and at harvested tubers in many regions as the mail causing agent of potato black leg. We can speculate that large part of seed collected at 2012 were already infected by Dickeya. Planting such seeds at 2014 season can cause huge yield losses.

Черная ножка – одна из наиболее вредоносных бактериальных болезней картофеля, встречается повсеместно и проявляется в виде некроза прикорневой части стеблей растений и мягкой гнили посадочных или хранящихся клубней. Это заболевание вызывают три близкородственных вида пектолитических бактерий из семейства Enterobacteriaceae: *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (син. Erwinia carotovora subsp. carotovora); P. atrosepticum (син. E. carotovora subsp. atroseptica); Dickeya spp. (син. E. chrysanthemi или P. chrysanthemi*). Первые два вида широко встречаются как патогены картофеля на пространстве бывшего СССР.

Бактерии рода *Dickeya* значительно отличаются от других возбудителей мягких гнилей. Впервые они описаны в начале 1950-х гг. под названием *Erwinia chrysanthemi* как возбудители болезни хризантемы, а в 80-х гг. прошлого века было найдено, что они также вызывают заболевания других культур, включая картофель. В дальнейшем вид *E. chrysanthemi* был переведен в новый род *Dickeya* и разделен на 7 видов. Бактерии рода *Dickeya* вызывают поражения широкого круга растений-хозяев в различных климатических условиях. В таблице 1 приведены виды бактерий *Dickeya* и поражаемые ими растения-хозяева.

Начиная с 2004 г. штаммы *Dickeya* sp. стали причинять значительные экономические потери при выращивании картофеля в странах Западной Европы. К наиболее вредоносным патогенам картофеля относят *D. dadanthii* и *D. zeae*, которые поражают культуру в жарком климате, и более адаптированные к умеренному климату виды *D. dianthicola и D. solani*, широко распространенные в Европе. Европейская организация по карантину и защите растений включила фитопатогенные бактерии рода *Dickeya* в список А2 опасных карантинных организмов.

Появление нового патогена картофеля еще под названием *E. chrysanthemi* (*D. dianthicola*) было описано в Швейцарии и Нидерландах в 1970-е годы. В последнее время интерес к этой бактерии значительно возрос, так как наблюдается ее быстрое распространение, усиление вредоносности и увеличение потерь картофеля.

Известно, что *Dickeya* sp. зимует в сорных растениях, например, в *Solanum dulcamara* и *Cyperus rotundus,* и в многочисленных сельскохозяйственных и декоративных растениях-хозяевах. Также известно, что фитопатогены этого рода тесно связаны с некоторыми насекомыми – тлями, плодовой мушкой, жесткокрылыми и др. Для проявления симптомов бактериоза на картофеле, необходим более низкий уровень инфекции *Dickeya* spp., чем для *P. atrosepticum* - всего 10 бактериальных клеток., поэтому, меры химической и биологической борьбы должны быть намного эффективнее, чем при поражении растений другими возбудителями черной ножки.

Таблица 1.
Растения-хозяева возбудителей бактерий рода *Dickeya*

Виды рода Dickeya	***Биоварианты Erwinia chrysanthemi***	***Экономически важные растения-хозяева***
D. dianhicola	1,7,9	Картофель, томат, гвоздика китайская, ирис
D. dieffenbachiae	2	Томат
D. dadantii	3	Картофель, батат, ананас, банан, кукуруза, пеларгония, гвоздика
D. solani	3	Картофель, томат
D. paradisiaca	4	Банан
D. chrysanthemi	5	Томат, подсолнечник, картофель, морковь, хризантема
D. zeae	8	Кукуруза, пшеница, картофель, ананас, банан, табак, рис, капуста, хризантема, гвоздики

Принципиальным отличием бактерий рода *Dickeya* от обычных возбудителей черной ножки картофеля является максимальная агрессивность при повышенной температуре, способность переноситься с растения на растение сосущими и листогрызущими насекомыми, быстро распространятся по сосудистой системе растения и сохраняться в латентном состоянии в период хранения семян при низкой температуре. Симтомы, вызываемые *D. solani* очень похожи на кольцевую (возб. *Clavibacter michiganensis* sbsp. *sepedonicus*) или бурую гниль картофеля (возб. *Ralstonia solanacearum*) (Toth et al. 2011) .

Распространение бактерий рода *Dickeya* в России

В 2001-2004 гг. сотрудниками ВНИИ фитопатологии при поддержке проекта Международного Научно-Технического Центра (МНТЦ) 1771п был проведен анализ бактерий, вызывавших черную ножку и мягкую гниль картофеля и других растений в 12 областях Европейской части РФ, Урала и Сибири (Таблица 2). Было проанализировано почти 500 образцов, и выделены более ста изолятов пектолитических фитопатогенных бактерий. Был проведен молекулярно-генетический анализ этих бактерий с помощью DIR-PCR и определения последовательностей генов *16S рРНК* и *recA*. Полученные результаты свидетельствовали, что *Pectobacterium carotovorum* и *P.atrosepticum* были главной причиной заболеваний картофеля, но также выделялся и ряд бактерий рода *Serratia* (Tsygankova et al., 2005; Matveeva et al., 2005). Единственныым источником бактерий рода *Dickeya* в этом исследовании были растения кукурузы и хризантемы из Краснодарского края.

В 2008-2009 гг. мы повторили обследование в 10 областях Европейской части РФ, собрав около 430 образцов пораженных клубней и растений картофеля. В 2009 г. при анализе растений из Липецкой обл., нами впервые были обнаружены бактерии рода *Dickeya*, поражающие картофель на территории России. С помощью ряда микробиологических и молекулярно-генетических тестов была установлена принадлежность выделенных штаммов к виду *D. dianthicola.* К 2011 г. в Российской Федерации заболевание, вызываемое *D. dianthicola* и *D. solani* было обнаружено в Липецкой, Воронежской, Московской и Нижегородской областях – всего в 4 из 10 обследованных (Карлов и др., 2010, 2011, 2012; Карлов, 2011; Kornev et al., 2012).

В 2012 году активно обсуждалось включение видов рода *Dickeya* в список особо опасных патогенов растений, ограниченно-распространенных в РФ, и запрет на продажу семян картофеля, зараженных *D. dianthicola* и *D. solani.* Ряд специалистов, включая авторов этой статьи, предлагали провести предварительный мониторинг зараженности полей в семеноводческих хозяйствах и отработать методы диагностики этих новых патогенов.

К сожалению, обследование полей и партий семян картофеля в 2013 г. в Московской, Тульской,

Калужской, Брянской, Самарской и ряде других областей (всего изучено 386 образцов), показало повсеместное распространение бактерий рода *Dickeya* в поле и на собранных клубнях, в качестве доминирующего возбудителя черной ножки картофеля (частота встречаемости зараженных образцов от 4 до 36% по сравнению с 2-15% для *P.carotovorum*). Можно предположить, что значительная часть семенного картофеля урожая 2012 г. уже была заражена бактериями рода *Dickeya.*

Таблица 2.

Частота встречаемости *D. dianthicola и D. solani* в изученных образцах картофеля в 2001-2013 гг. по ранее опубликованным и новым данным авторов

Год	*Обследованные области*	*Число образцов*	*Методы диагностики*	*Средняя частота встречаемости Dickeya sp., % образцов*
2001-2004	Московская, Тульская, Калужская, Брянская, Самарская, Воронежская, Липецкая, Псковская, Новгородская, Калининградская, Свердловская, Магаданский край	487	Биохимические, послеовательности генов *16S рРНК, recA*	0*
2009-2011	Московская, Тульская, Калужская, Брянская, Ленинграская, Воронежская, Липецкая, Псковская, Калининградская, Нижегородская	430	ПЦР с праймерами ADE1/2 (ген *pelD),* последовательности генов *acnA, dnaX, gapA, icdA, mdh, mtID, pgi и pelD*	3,6
2013	Московская, Тульская, Калужская, Брянская, Самарская, Тверская, Тамбовская, Воронежская, Курская, Орловская	386	ПЦР в реальном времени с праймерами ADE1/2 (ген *pelD)*	28,6

* Изоляты рода *Dickeya* были выделены из растений кукурузы и хризантемы из Краснодарского края.

Таким образом, необходимо срочно принять меры по недопущению использования картофеля зараженного бактериями рода *Dickeya* для посадки. Существует большой риск того, что использование зараженных клубней в качестве семян в предстоящий сезон 2014 г. приведет к ранней гибели растений картофеля и огромным экономическим потерям.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов МНТЦ № 1771п, 3431 и ООО «БАСФ».

Литература

1. Tsygankova, S.V., E. V. Matveeva, E. Sh. Pekhtereva, A. N. Ignatov, and N.W. Schaad. 2005. Genetic diversity among strains of pectolytic Erwinia in potato in Russia. 2005 Meeting of American Phytopathological Society, Potomac Division, Ocean City, MD March 16th-18th, 2005. pp.25-26.
2. Matveeva E.V., Ignatov A.N, Tsygankova S.V., Pekhtereva E.Sh., Fokina V.G. and Schaad N.W. 2005. Phenotypic and genetic diversity of Russian population of blackleg and soft-rot Erwinia. Programme & Abstracts 57 th International symposium on crop protection, May 10, 2005, Gent Belgium, 160
3. Карлов А. Н., Зотов В.С., Пехтерева Е.Ш., Матвеева Е.В., Джалилов Ф.С., Фесенко И.А., Карлов Г. И., Игнатов А.Н. Dickeya dianthicola - новый для России бактериальный патоген картофеля // Известия ТСХА. 2010. Вып. 3. - С.134-141.
4. Карлов А.Н.; Игнатов А.Н.; Карлов Г.И.; Пехтерева Э.Ш.; Матвеева Е.В.; Шаад Н.В.; Варицев Ю.А.; Джалилов Ф.С. Диагностика бактериального патогена картофеля Dickeya dianthicola // Изв. Тимирязев.с.-х.акад., 2011; N 3. - С. 38-48
5. Kornev K., Ignatov A., Karlov A., Karlov G., Dzhalilov F, Pekhtereva E., Luster D...Dickeya spp. – emerging pathogen of potato in Russia. .American Phytopathology Soc. Meeting 2012 .4-8/08/2012. Providence, RI, USA
6. Toth, I. K.; Van Der Wolf, J. M.; Saddler, G.; Lojkowska, E.; Hélias, V.; Pirhonen, M.; Tsror Lahkim, L.; Elphinstone, J. G. (2011). “Dickeya species: An emerging problem for potato production in Europe”. Plant Pathology 60 (3): 385.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ БАКТЕРИОЗОВ РАСТЕНИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А.Н. Игнатов

Центр «Биоинженерия» РАН, Москва 117312.;
ВНИИ фитопатологии Россельхозакадемии, Большие Вяземы, Московской обл. 143050;
Российский Университет Дружбы народов, Москва;
Диагностический центр «Фитоинженерия», ООО, Дмитровский р-н., Московской обл.
e-mail: an.ignatov@gmail.com

OCCURANCE OF EMERGING BACTERIAL PLANT PATHOGENIS IN RUSSIA

A.N. Ignatov

Centre “Bioengineering” of RAS, Moscow 117312 .;
Institute of Phytopathology RAAS, Big Vyazemy, Moscow region. 143050;
Russian Peoples’ Friendship University, Moscow;
Diagnostic Center “Fitoinzheneriya” Ltd., Dmitrov district., Moscow region.

Summary

The Russian Federation has met increased severity of known and new bacterial diseases of plants. Increased losses are caused also by weather conditions that are optimal for breeding phytopathogenic bacterial microflora and unfavorable for plant growth. This forecast shows the increasing spread of dangerous new pathogens of potatoes, grain and vegetable crops in the European part of the Russian Federation.

В Российской Федерации отмечают усиление вредоносности известных и появление новых бактериозов растений. Увеличению потерь способствуют погодные условия, оптимальные для размножения фитопатогенной бактериальной микрофлоры и неблагоприятные для развития растений.

Данный в 2009 г. прогноз распространения новых опасных возбудителей бактериозов на европейской части РФ для патогенов картофеля, зерновых и овощных культур (Игнатов и др. 2009) в значительной мере сбылся.

Вредоносность бактериальных заболеваний растений возрастает из-за нарушения агротехники, отсутствия своевременной и достоверной диагностики фитопатогенных бактерий в посевном материале и в поле, а также неправильно разработанной системы земледелия и защитных мер. Так, от 60 до 90% заражения здоровых клубней картофеля бактериями происходит во время уборки урожая, сортировки и подготовки к посадке.

На первом месте по экономическому ущербу стоят бактериозы овощных культур и картофеля.

Бактериозы картофеля

Черная ножка – одна из наиболее вредоносных бактериальных болезней картофеля, встречается повсеместно и проявляется в виде некроза прикорневой части стеблей растений и мягкой гнили посадочных или хранящихся клубней. Это заболевание вызывают три близкородственных группы пектолитических бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*: *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum; P. atrosepticum; Dickeya spp. (син. P. chrysanthemi*). Первые два вида широко встречаются как патогены картофеля на пространстве бывшего СССР.

Бактерии рода *Dickeya* значительно отличаются от других возбудителей мягких гнилей. Впервые они описаны в начале 1950-х гг. под названием *Erwinia chrysanthemi. Dickeya* вызывают поражения широкого круга растений-хозяев в различных климатических условиях. Начиная с 2004 г. они стали причинять значительные экономические потери при выращивании картофеля в странах Западной Европы.

Адаптированные к умеренному климату, виды *D. dianthicola и D. solani*, широко распространенны в Европе. В странах ЕС эти бактерии вызывают черную ножку картофеля в 70% случаев, вытеснив обычных возбудителей, и были включены в список карантинных организмов (Toth, et al., 2011).

Известно, что *Dickeya* sp. зимует в сорных растениях, например, и в многочисленных сельскохозяйственных и декоративных растениях-хозяевах. Также известно, что фитопатогены этого рода тесно связаны с некоторыми насекомыми – тлями, плодовой мушкой, жесткокрылыми и др. Для проявления симптомов бактериоза на картофеле, необходим более низкий уровень инфекции *Dickeya* spp., чем для *P. atrosepticum* - всего 10 бактериальных клеток, поэтому, меры химической и биологической борьбы должны быть намного

эффективнее, чем при поражении растений другими возбудителями черной ножки.

Принципиальным отличием бактерий рода *Dickeya* от обычных возбудителей черной ножки картофеля является большая агрессивность при повышенной температуре, способность более эффективно переноситься с растения на растение сосущими и листогрызущими насекомыми, быстро распространятся по сосудистой системе растения и сохраняться в латентном состоянии в период хранения семян при низкой температуре. Симтомы, вызываемые *D. solani* очень похожи на кольцевую (возб. *Clavibacter michiganensis* sbsp. *sepedonicus*) или бурую гниль картофеля (возб. *Ralstonia solanacearum*) (Toth et al. 2011). *Dickeya dianthicola* вызывает симптомы типичных черной ножки и мягкой гнили, как и *Pectobacterium carotovorum* и *P. atrosepticum*, что сильно затрудняет ее диагностику в полевых и лабораторных условиях (Карлов и др., 2010). Впервые обнаруженные в РФ в 2009 г., бактерии *D. dianthicola* и *D. solani,* сначала были довольно редким патогеном (встречаемость не более 4% от обследованных партий картофеля), но в 2013 они обнаруживаются повсеместно в клубнях картофеля, выращенного в Европейской части РФ, с частотой почти 30% от числа обследованных образцов (Игнатов и др. в печати). По совокупным результатам обследований, в 2010-2013 гг. наблюдалось ежегодное (!) двухкратное увеличение числа зараженных партий картофеля. По прогнозу, данному весной этого года, в 2014 зараженность *D. dianthicola* и *D. solani* могла бы составить до 40-50%, но из-за засухи, видимо, окажется меньше.

В Северной Европе, потери товарного картофеля от Dickeya spp составили в последние 5 лет до 40% урожая. В 2007 семеноводство Нидерландов потеряло 25 миллионов Евро за счет снижения качества семенного картофеля, зараженного фитопатогенными бактериями, и более 20% партий семян были признаны зараженными Dickeya spp., и не прошли сертификацию. Именно семена западно-европейского происхождения могли стать основной причиной роста зараженности картофеля в РФ.

Таблица.

Поражение картофеля черной ножкой *(Dickeya spp., Pectobacterium atrosepticum)* в ряде областей РФ летом 2013 г. по результатам мониторинга компании «Сингента» и ВНИИ фитопатологии

Области	*Поражение черной ножкой в поле**	*Ожидаемые потери урожая*	*Обследованные сорта*
Вологодская	до 30%	до 40%	Ред Скарлетт, Рамос, Лабадия, Импала, Гала
Новгородская	до 30%	до 35%	Ред Скарлетт, Рамос, Лабадия
Чувашская р-а.	до 25%	20%	Импала, Гала, Ред Скарлетт, Невский, Удача, Каратоп, Латона.
Свердловская	15%	20%	Импала, Гала, Ред Скарлетт, Невский, Удача, Каратоп, Латона
Челябинская	25%	30%	Импала, Гала, Ред Скарлетт, Невский, Удача, Каратоп, Латона
Пермский край	до 70%	до 30%	Ред Скарлетт, Артемис, Импала, Гала, Родриго, Невский, Романо
Брянская	до 30%	до 20%	Невский, Пикассо, Инноватор, Роко.
Липецкая	25%	до 25%	Невский, Пикассо, Роко
Воронежская	27%	до 20%	Невский, Пикассо
Тульская	до 25%	20%	Сатурна, Ред Скарлетт, Гала, Леди Клэр, Леди Розетта.
Нижегородская	до 25%	до 30%	Винетта, Ред Скарлетт, Невский, Удача, Журавинка

*семена массовой репродукции

С 2004 г. в РФ распространяется картофельная раса бактерии *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (возб. бактериального рака), впервые обнаруженная в Калининградской области. По сравнению с возбудителем кольцевой гнили она обладает более высокой агрессивностью при поражении растений в поле и, наоборот, латентной фазой в период хранения (Корнев и др., 2008).

Бурая гниль картофеля (*Ralstonia solanacearum*) была найдена в 2011 г. в Московской области, а в 2011-2013 гг. неоднократно выявлялась в продовольственном картофеле, импортированном из Египта. Этот карантинный патоген, характерный для субтропиков, с 2006-2008 гг. присутствует в агроценозах в Турции и Польше, а по непроверенным данным присутствует в поливной

воде в Ростовской и других областях юга России. Можно ожидать появление бурой гнили картофеля в южных регионах РФ в условиях жаркого лета, наподобие 2010 г. Необходимо отметить, что Европейский Союз сталкивался с такой же проблемой завоза возбудителя бурой гнили из Египта в 1993-1996 гг., но принятые строгие меры контроля картофеля в местах производства помогли предотвратить последующий завоз зараженного картофеля в ЕС.

Одной из основных проблем стала зараженность семенного картофеля кольцевой гнилью (*Clavibacter michiganensis* sbsp. *sepedonicus*), частота встречаемости которого в сертифицированных семенах, произведенных в РФ, составляет не менее 23% от общего числа партий семян, достигая в некоторых районах 50% (письмо ВНИИКР в адрес Картофельного союза, Джалилов и др., в печати).

Европейском Союзе проводиться строгий контроль *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus.* Он считается карантинным объектом (список А2), и против него ведут профилактические мероприятия, уже давшие положительный результат в Чехии, Дании и ряде других стран. В СССР этот патоген так же был карантинным до 1987 г.

Также в последнее время в нескольких областях РФ выявлены возбудители «зебры чипсов» (*Liberibacter solanacearum*) и фитоплазмы.

Овощные культуры

Пасленовые. Черная бактериальная пятнистость томата и перца в РФ распространена повсеместно в открытом и защищенном грунте, и вызывается пятью видами бактерий рода *Xanthomonas — euvesicatoria, gardneri, vesicatoria, arboricola, campestris pv. raphani*. Частота встречаемости болезни на рассаде в открытом грунте доходит до 50%, могут быть сильно поражены также растения в теплицах.

Бактериальный рак томатов, вызываемый *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, наиболее опасен в условиях защищенного грунта, так же как возбудитель серцевинного некроза *Pseudomonas corrugata* (завезен в СССР в конце 1980-х годов). Эти возбудители передаются через семена при частоте заражения, доходящей до 1%. В закрытом грунте патогены сохраняются в течение многих лет, вызывая вспышки заболеваний почти в каждом обороте, часто при совместном заражении одних и тех же растений. При раннем заражении растений, они, как правило, гибнут до созревания плодов.

Массовое поражение растений томата бактериями, фитоплазмами (группа бактерий без клеточной стенки) и вирусами, в южных областях РФ (Кубань, Дон, Поволжье) приводит потере рентабельности выращивания томата в открытом грунте.

Капуста и масличные крестоцветные. Наиболее вредоносным бактериальным заболеванием капустных овощных культур в РФ считается сосудистый бактериоз, вызываемый *Xanthomonas campestris* и *X. arboricola*. Патогены распространяются семенами, и в течение последних лет вызывают эпифитотии во всех основных зонах выращивания капусты, приводя к потере от 10% до 100% товарной продукции.

Те же виды поражают масличный рапс, вызывая гибель растений озимых сортов во время перезимовки, и симптомы листовой пятнистости и ожога во время вегетации. Перезимовка бактерий на озимом рапсе приводит к раннему поражению соседних посадок яровых капустных культур. По этой причине, во многих регионах начало заболевания в поле сдвинулось с августа на июнь-июль, соответственно приводя к усилению распространения болезни и большим потерям урожая.

Установлено, что на рубеже 2012 г. в России произошла внезапная смена расового состава популяции патогена, приведшая к поражению большинства известных устойчивых сортов капустных культур (Совместная работа РГАУ-МСХА, Центра «Биоинженерия» и ВНИИ фитопатологии).

Тыквенные культуры. В 2013 г. в ряде тепличных хозяйств России было отмечено поражение культуры огурца, выращиваемой на минеральной вате. В 2014 году вредоносность заболевания возросла. Патоген был обнаружен в 6 регионах РФ – от Новгородской области до Краснодара и Челябинска.

Возбудитель заболевания – особая форма бактерии *Argobacterium биовар 1*, несущая плазмиду *Ri (pRi)*, был впервые отмечен в 1993 г. в Великобритании и до последнего времени не встречался в других странах (Weller *et al*., 2000). Он также поражает томат и другие тепличные культуры.

Симптомы заболевания проявляются после переноса в растительную клетку фрагмента Т-ДНК (*pRi* DNA). Гены Т-ДНК из плазмиды *Ri* отвечают за синтез ауксина и цитокининов в растительной ткани, из-за чего происходит разрастание корней, а также синтез опина (производное аминокислоты аргинин), который усваивается только бактериальными клетками *Agrobacterium*, находящимися внутри и вне растения. Фактически, пораженные растения являются естественными генетически-модифицированными организмами, и несут гены фитопатогенной бактерии (Ходыкина и др. 2014). Минимальные потери от заболевания составляют от 15 до 20% потенциального урожая.

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans* вызывает угловатую пятнистость огурца, кабачка и тыкв. На листьях болезнь проявляется в виде угловатых маслянистых коричневых пятен. Затем больная ткань выкрашивается. Патоген паразитирует только на растениях семейства тыквенных. Потери урожая зависят от культивируемого сорта и условий выращивания. Во всех регионах РФ частота встречаемости составляет от 25 до 100% в зависимости от сорта и погоды.

Бактериозы бобовых

Возбудители бактериального ожога, угловатой пятнистости гороха, сои и фасоли — *Pseudomonas syringae* pv. *pisi, Pseudomonas syringae* pv. *glycinea, Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. В 2014 г. отмечена вспышка заболевания бобовых культур в Ставропольском и Краснодарском краях.

Кроме, того бобовые культуры поражаются возбудителем обыкновенной пятнистости фасоли — *Xanthomonas phaseoli*. Все патогены встречаются повсеместно в РФ, передаются семенами и при поражении 10–50% растений могут уменьшить урожайность на 5–40%.

Бактериозы плодовых

Возбудитель корневого рака плодовых *Agrobacterium tumefaciens/rhizogenes* резко снижает зимостойкость молодых деревьев. В южных областях (Ростов, Воронеж, Кубань, Ставрополье, Крым) бактерии используются для стимулирования образования корневой системы у черенков плодовых культур, но, как правило, такие растения погибают в течение первых 3—4 лет.

Бактериальный рак косточковых плодовых культур (*P. syringae* pv. *morsprunorum*) приводит к массовой гибели восприимчивых культур вишни и сливы в северной части РФ. Распространение опаснейшего бактериального ожога плодовых (*Erwinia amylovora*) – еще недавно карантинного объекта, представляется гораздо шире официально признанного (Квашнина, 2012; Дренова и др., 2013), и отмечено по меньшей мере в 11 регионах РФ. Массовое заражение садов в Казахстане (до 60%) вызывает опасения полной гибели культуры и дикорастущих лесов яблони.

В 2001-2012 гг. нами впервые был выделена и изучена новая для Российской Федерации группа штаммов бактериального патогена *Xanthomonas arboricola* (Smith) Vauterin *et al.*, вызывающая поражение зерновых злаков, подсолнечника, томата и крестоцветных культур. Симптомы заболеваний, вызываемых *X. arboricola* не отличались от болезней причиняемых другими ксантомонадами, специализирующихся на тех же растениях – хозяевах. Появление неспециализированного патогена, переходящего с культуры на культуру, затрудняет борьбу с ним агротехническими методами и снижает эффективность контроля чистоты семян и посевного материала.

Выводы

Проблема бактериозов в РФ вызвана, в первую очередь, почти полным отсутствием контроля за зараженностью бактериальными патогенами семян и посадочного материала. К сожалению, визуальные и даже традиционные лабораторные методы не могут дать объективную информацию о видах бактерий, выделяемых из посевного материала. Необходимы молекулярные или иммунологические методы анализа в специализированной лаборатории.

Литература

Игнатов А.Н., Пунина Н.В., Матвеева Е.В. Корнев К.П., Пехтерева Э.Ш., Политыко В.А. (2009) Новые возбудители бактериозов и прогноз их распространения в России Защита и карантин растений № 4, С. 38-41

Карлов А.Н., Зотов В.С., Пехтерева Э.Ш. и др. *Dickeya dianthicola* - новый для России бактериальный патоген картофеля. // Известия ТСХА. 2010. №3. С. 134-141.

Корнев К.П., Игнатов А.Н., и др. Бактерия *Clavibacter michiganense*subsp. *michiganensis* – патоген картофеля. // Сб. тр. ВНИИФ (юбилейный), «50 лет на страже продовольственной безопасности страны», Большие Вяземы. 2008. С. 219-233.

Toth, I.K., van der Wolf, J. M., Saddler, et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. // Plant Pathol. 2011. V.60. N.3. P. 385-399.

Матвеева Е.В., Цыганкова С.В., Пехтерева Э.Ш., Политыко В.А., Корнев К.П., Зотов В.С., Пунина Н.В., Игнатов А.Н. Фенотипическое и генетическое разнообразие российской популяции *Erwinia carotovora*. 50 лет на страже продовольственной безопасности страны. Юбилейный сборник трудов ВНИИ фитопатологии. Ред. С.С. Санин и др. 2008. С. 197-210.

Игнатов А.Н., Карлов А.Н., Джалилов Ф.С., Карандашов В.Е., Князькина М.С., Корнев К.П., Пехтерева Э.Ш. Распространение черной ножки картофеля, вызываемой возбудителями *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani* в России с 2001 по 2013 гг. Защита и карантин растений. 2014. В печати.

Лазарев А.М. Новый возбудитель бактериальной гнили картофеля может стать причиной серьезных потерь урожая в 2013 году. Защита растений. http://www.agroxxi.ru/gazeta-zaschita-rastenii/zrast/bakteriozy-ugrozhayut-vtoromu-hlebu-rossii.html

Ерохова М.Д. , Дренова Н.В. , Черная ножка – опасное заболевание картофеля. Защита и карантин растений. 2014, 7. 28-30.

Карлов А.Н. 2011. Диагностика черной ножки картофеля, вызываемой бактериями рода Dickeya и генетический полиморфизм штаммов возбудителей. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2011. РГАУ-МСХА, М. 25с.

Дренова Н.В., М.М. Исин, А.А. Джаймурзина, Г.А. и др. // Бактериальный ожог плодовых культур в республике Казахстан. Карантин растений. Наука и практика. 2013. №3. С. 39-48.

Квашнина Н.А. Бактериальный ожог плодовых деревьев. // Карантин растений (наука и практика). 2012. №9. С. 37.

Корнев К.П., Матвеева Е.В. и др. Черная бактериальная пятнистость томата в России. // Защита и карантин растений. 2010. №5. С. 48-49

Матвеева Е.В, Игнатов А.Н., Политыко В.А., и др. Бактериальные болезни рапса.// Защита растений. 2008. №12. С. 23-24.

Toth, I. K., van der Wolf, J. M., Saddler, et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. // Plant Pathol. 2011. V.60. N.3. P. 385-399.

Матвеева Е.В, Политыко В.А., Пехтерева Э.Ш. и др. Новые бактериальные болезни зерновых в Российской Федерации. // Сб. тр. ВНИИФ (юбилейный) «50 лет на страже продовольственной безопасности страны», Большие Вяземы. 2008. С. 172-179.

Письмо ФГБУ «ВНИИКР» Союзу участников рынка картофеля и овощей http://welikepotato.ru/news/vniikr

Ходыкина М.В., Пехтерева Э.Ш., Кырова Е.И., Виноградова С.В., Ахатов А.К., , Юваров В.Н., Борисова И.П., Игнатов А.Н. Новая бактериальная болезнь тепличного огурца в россии. Гавриш. №3. С. 24-29

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФИТОПЛАЗМ, ВЫЗЫВАЮЩИХ БОЛЕЗНИ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ В РОССИИ

Т.Б. Кастальева, Н.В. Гирсова, К.А. Можаева

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,
e-mail: kastalyeva@vniif.ru

GENETIC DIVERSITY OF PHYTOPLASMAS INFECTING CULTURAL AND WILD PLANTS IN RUSSIA

T.B. Kastalyeva, N.V. Girsova, K.A. Mozhaeva

Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow region

Summary

Samples of cultivated and wild plants of 86 species from 33 families collected in various regions of the Russian Federation were infected with phytoplasmas belonging to six groups: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrVI, 16SrV and 16SrXII. Affiliation to the subgroup was identified for several phytoplasmas: CPh(16SrI-C), PnWB(16SrII-A) CX(16SrIII-A), CYE(16SrIII-B), CP(16SrVI-A), and STOL(16SrXII-a). About a half of the phytoplasma infected plants were represented by 33 species of the two families, i.e. Fabaceae and Asteraceae. The other half of all plant samples included 53 species from 31 families.

Фитоплазмы – это флоэмные фитопатогенные бактерии, лишенные клеточной стенки. Они относятся к классу *Mollicutes* и являются возбудителями опасных заболеваний растений.

В течение шести лет (2007-2012 гг.) с использованием диагностики на основе гена 16S рибосомальной РНК, позволяющей амплифицировать 16S ДНК фитоплазм в полимеразной цепной реакции (ПЦР), а более точно – её варианте, вложенной, или нестид ПЦР (nested PCR), фитоплазмы были обнаружены в тридцати девяти образцах растений семейства Бобовых (Fabaceae), представленных девятнадцатью видами. В основном это были травянистые дикорастущие растения, но встречались древесные и кустарниковые растения (табл. 1). Фитоплазмы, принадлежащие к четырем группам и шести подгруппам, были идентифицированы путем рестрикции полученных ПЦР-продуктов эндонуклеазами рестрикции (*Alu*I, *Mse*I, *Hha*I, *Hpa*II и *Taq*I) с последующим разделением электрофорезом в полиакриламидном геле полученных фрагментов и анализом их длины (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов – ПДРФ) в соответствии с имеющимися картами рестрикции (Lee et al., 1998; Wei et al., 2007).

Наиболее часто встречались бобовые, инфицированные фитоплазмами из группы Х(икс)-болезни (46,2%), причем примерно половина из них приходилась на долю фитоплазмы подгруппы 16SrIII-A, или CX, а другая половина – на долю фитоплазмы подгруппы 16SrIII-B, или CYE – Clover yellow edge (краевое пожелтение клевера) (табл. 1 и 2). Более четверти образцов были инфицированы фитоплазмами из группы 16SrI (Aster yellows group – группа желтух астр), 90,9% которых были представлены подгруппой 16SrI-C (Cph – Clover phyllody – филлодий

клевера). Две другие группы – 16SrVI (Clover proliferation group – группа пролиферации клевера) и 16SrXII (Stolbur group – группа столбура) – встречались значительно реже, и в каждой из них была выявлена лишь одна подгруппа (табл. 2).

Образцы инфицированных фитоплазмой растений, относящиеся к роду *Trifolium (Клевер),* были представлены пятью видами, рода *Vicia (Горошек)* – тремя. У растений других родов было по 1-2 вида инфицированных образцов (табл. 1). Фитоплазмы, относящиеся к четырем подгруппам, инфицировали клевер розовый (*Trifolium hybridum),* три разные подгруппы фитоплазм встречались на клевере красном, люцерне, доннике белом.

Таблица 1.
Таксономическая принадлежность фитоплазм, выделенных из образцов растений семейства *Fabaceae*

№ пп.	*Название вида*	*Группа (подгруппа) фитоплазмы*
1	*Coronilla* L.- Вязель	STOL (16SrXII-A)
2	*Guizotia abyssinica* Coss.- Нут	CP (16SrVI-A)
3	*Laburnum anagyroides* – Золотой дождь	STOL (16SrXII-A)
4	*Lathyrus L.* - Чина	CPh (16SrI-C), CX (16SrIII)
5	*Lotus corniculatus L.* - Лядвенец рогатый	CPh (16SrI-C), CX (16SrIII-A)
6	*Lupinus polyphyllus* Lindl. – Люпин многолистный	CPh (16SrI-C), CX (16SrIII)
7	*Medicago sativa* L. – Люцерна посевная	CP (16SrVI-A), CX (16SrIII-A), STOL (16SrXII)
8	*Melilotus album Medik.* – Донник белый	CP (16SrVI-A), CPh (16SrI-C), CX (16SrIII)
9	*Melilotus officinalis* L. – Донник желтый	CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII)
10	*Phaseolus vulgaris* L.- Фасоль	CP (16SrVI-A),
11	*Robinia pseudoacacia* L. – Акация белая	CPh (16SrI-C)
12	*Trifolium hybridum* L. – Клевер розовый	CPh (16SrI-C), CP (16SrVI-A), CX(16SrIII), CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-C), MixCYE+CPh
13	*Trifolium medium* L. – Клевер средний	CYE (16SrIII), STOL (16SrXII)
14	*Trifolium pannonicum* Jacq.- Клевер паннонский	CX (16SrIII-A), CP (16SrVI-A)
15	*Trifolium pratense* L. – Клевер красный	AY(16SrI), CPh (16SrI-C), CX (16SrIII), CYE (16SrIII)
16	*Trifolium repens* L. - Клевер белый	CPh (16SrI-C), CYE (16SrIII)
17	*Vicia cracca* L. - Мышиный горошек	CPh (16SrI-C)
18	*Vicia faba* L. – Бобы конские	CX (16SrIII-A), CP (16SrVI-A)
19	*Vicia villosa* Roth. – Горошек волосистый	CYE (16SrIII)

Таблица 2.
Частота встречаемости фитоплазм, инфицировавших растения семейства *Fabaceae*

Фитоплазма		*Частота встречаемости фитоплазмы*		
Группа	*Подгруппа*	*Подгруппы*	*Группы*	
		Количество	*Количество*	*%*
Aster yellow group (16SrI)	AY(16SrI-A или B)	1	11	27,5
	CPh (16SrI-C)	10		
X-disease group (16SrIII)	Не определена	5	18	45
	CX (16SrIII-A)	6		
	CYE (16SrIII-B)	7		
Clover proliferation group (16SrVI)	CP (16SrVI-A)	7	7	17,5
Stolbur group (16SrXII)	STOL (16SrXII-A)	4	4	10,0
Всего идентифицировано:		40	40	

Другие растения, среди которых значительное количество собранных образцов было инфицировано фитоплазмами, относились к семейству Asteraceae. Общее количество инфицированных образцов было 21, что примерно в 2 раза меньше чем из семейства Fabaceae, а количество видов (14) меньше на четверть. Частота встречаемости фитоплазм разной групповой принадлежности была примерно такой же, как в семействе Fabaceae, за исключением того, что среди Астровых были обнаружены образцы, инфицированные фитоплазмой из группы 16SrII, подгруппы 16SrII-A (Peanut WB group – ведьмина метла арахиса). Это чернобыльник (*Artemisia vulgaris* L.) и василёк шероховатый (*Centaurea scabiosza* L.), у последнего фитоплазма из группы 16SrII присутствовала в составе смешанной инфекции с фитоплазмами из группы 16SrI (табл. 3 и 4).

Таблица 3.
Таксономическая принадлежность фитоплазм, выделенных из образцов растений семейства *Asteraceae*

№ пп.	*Название вида*	*Группа (подгруппа) фитоплазмы*
1	*Ambrosia trifida* L.– Амброзия трехраздельная	STOL (16SrXII-A)
2	*Artemisia absinthum* L. – Полынь горькая	CP (16SrVI-A)
3	*Artemisia dracunculus* L. – Эстрагон	CPh (16SrI-C), CP (16SrVI-A)
4	*Artemisia vulgaris* L. – Полынь обыкновенная (чернобыльник)	PnWB (16SrII-A)
5	*Callistephus chinensis* L. – Астра	CX (16SrIII-A)
6	*Centaurea scabiosza* L. – Василёк шероховатый	Mix AY+CPh+PnWB
7	*Cichorium intybus* –Цикорий обыкновенный	CX (16SrIII)
8	*Cirsium arvense* L. – Бодяк полевой	CPh (16SrI-C), CX (16SrIII)
9	*Cosmos bipinnatus* – Космея дваждыперистая	STOL (16SrXII-A)
10	*Rudbekia* L. – Рудбекия	CX (16SrIII)
11	*Sonchus arvensis* L. – Осот полевой	CP (16SrVI-A), CX (16SrIII)
12	Tagetes L. – Бархатцы	CX (16SrIII)
13	*Tanacetum vulgare* L. – Пижма обыкновенная	CX (16SrIII-A)
14	*Taraxacum officinale* Wigg. – Одуванчик лекарственный	CP (16SrVI-A)

Таблица 4.
Частота встречаемости фитоплазм, инфицировавших растения семейства *Asteraceae*

Фитоплазма		*Частота встречаемости фитоплазмы*		
Группа	*Подгруппа*	*Подгруппы*	*Группы*	
		Количество	*Количество*	*%*
Aster yellow group (16SrI)	AY(16SrI-A или B)	1	4	19
	CPh (16SrI-C)	3		
Peanut WB group (16SrII-A)	PnWB (16SrII-A)	2	2	9,5
X-disease group (16SrIII)	Не определена	5	9	42,9
	CX (16SrIII-A)	4		
Clover proliferation group (16SrVI)	CP (16SrVI-A)	4	4	19
Stolbur group (16SrXII)	STOL (16SrXII-A)	2	2	9,5
Всего инфицировано растений:		21	21	

Остальные 63 образца, инфицированные фитоплазмой, принадлежали к различным семействам. Всего среди них насчитывалось 53 вида растений из тридцати одного (31) семейства, причем наиболее многочисленными были растения из семейства Rosaceae (6 видов) и Solanaceae (6 видов). Более 40% в этой сборной группе приходилось на долю фитоплазмы

из группы столбура, подгруппы STOL (16SrXII-A). Другие три группы фитоплазм, 16SrI, 16SrIII и 16SrVI, характерные для европейской части РФ, встречались примерно с одинаковой частотой, их доля среди этой группы составляла 19%, 22% и 17,4%, соответственно (табл. 5). Одна фитоплазма, не встречавшаяся ранее и принадлежащая к группе 16SrV (Elm yellows group – желтухи вяза), была обнаружена на вязе гладком, или обыкновенном.

Таблица 5. Частота встречаемости фитоплазм, инфицировавших растения из 31 семейства

Семейства	*Фитоплазма*		*Частота встречаемости фитоплазмы*		
	Группа	*Подгруппы*	*Подгруппы*	*Группы*	
			Количество	*Количество*	*%*
Adoxaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Betulaceae, Brassicaceae, Campanulaceae, Caprifoliaceae, Caryophyllaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Cupressaceae, Cuscutaceae, Geraniaceae, Hippocastanaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Oleraceae, Onagraceae, Orobanchaceae, Papaveraceae, Plantaginaceae, Poaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Tamaricaceae, Ulmaceae, Vitaceae	Aster yellow group (16SrI)	AY(16SrI-A или B)	7	12	19,0
		CPh (16SrI-C)	5		
	X-disease group (16SrIII)	Не определена	6	14	22,0
		CX (16SrIII-A)	5		
		CYE (16SrIII-B)	3		
	Elm yellows group (16SrV)	Не определена	1	1	1,6
	Clover proliferation group (16SrVI)	CP (16SrVI-A)	11	11	17,4
	Stolbur group (16SrXII)	STOL (16SrXII-A)	25	25	39,6
Всего: 31			Всего: 63		

Заключение

Образцы культурных и дикорастущих растений восьмидесяти шести (86) видов, из тридцати трех (33) семейств, собранные в различных регионах РФ, были инфицированы фитоплазмами, принадлежащими к шести группам: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI и 16SrXII. Для некоторых фитоплазм была определена принадлежность к подгруппе: CPh (16SrI-C), PnWB (16SrII-A), CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), CP (16SrVI-A) и STOL (16SrXII-A). Примерно половина инфицированных фитоплазмами растений была представлена тридцатью тремя (33) видами, принадлежавшими к двум семействам – Fabaceae и Asteraceae; среди них наиболее часто встречались фитоплазмы из группы 16SrIII, или Х-болезни (X-disease group). Другая половина всех растений включала 53 вида из 31 семейства. Растения этой группы были инфицированы преимущественно фитоплазмой из группы столбура, подгруппы 16SrXII-A. Для европейской части РФ характерными являются фитоплазмы, принадлежащие к четырем группам и семи подгруппам: 16SrI-A, 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrIII-A, 16SrIII-B, 16SrVI-A и 16SrXII-A. Кроме того, были зарегистрированы две редкие группы 16SrII, 16SrV.

Литература

1. Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bartoszyk I. M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences // Int. J. Syst. Bacteriology. 1998. №48. P. 1153–1169. [электронный ресурс]. URL: http://ijs.sgmjournals.org/content/48/4/1153.full.pdf+html (обращение: 10.07.2014) С. 1153 -1169.
2. Wei W., Davis R. E., Lee I.-M., Yan Zhao. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. V. 57. P. 1855 – 1867. [электронный ресурс]. URL: http://ijs.sgmjournals.org/content/57/8/1855.full (обращение 10.07.2014). С. 1855 - 1867.

КОРНЕВОЙ РАК *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS (SMITH ET TOWSEND) CONN.* И КОСМАТЫЙ КОРЕНЬ *A. RHIZOGENES (RIKER ET AL.) CONN.* ПЛОДОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ В ЦЕНТРАЛЬНОМ ЧЕРНОЗЕМЬЕ РОССИИ

Д.А. Колесова

ООО «Агролидер-Трейд» (Воронеж)

CROWN GALL CAUSED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS (SMITH ET TOWSEND)* CONN. AND HAIRY ROOTS CAUSED BY *A. RHIZOGENES (RIKER ET AL.) CONN.* ON FRUIT TREES IN THE CENTRAL CHERNOZEMIE REGION OF RUSSIA

D.A. Kolesova

Ltd. “Agrolider-Trade” (Voronezh)

Summary

Description of the malicious disease found in a nursery of the Voronezh region. Apple btrees were damaged by bacterial pathogens: Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend) Conn., A.rhizogenes (Riker et al.) Conn.

Первые подробные сведения о бактериальном корневом раке (зобоватость корней) на яблоне и других плодовых деревьях в русской литературе приведены Сербиновым в ряде своих работ [1,2,3,4 и др.]. Подробно описана внешняя картина поражаемых растений, очень характерная у плодовых и других растений. Особенно типична она на яблоне. Бактериальный рак поражает корни, шейку и стебли яблонь и других как плодовых, так и древесных и кустарниковых растений, довольно часто встречается рак на корнях некоторых огородных и других травянистых растений. В поражённых местах развиваются опухоли различных размеров, чаще всего они бывают размером до 15-20 см. Но гораздо характернее и рельефнее заболевание бывает на шейке деревьев и в местах прививки. В этих местах стволики бывают значительно утолщены, покрыты первичными и вторичными опухолями, а от утолщений отходит масса тонких, тесно расположенных друг около друга корешков. Трудами американских учёных Смидта и Тоунсенда в 1906 году из поражённых тканей выделена и описана бактерия под названием *Bacterium tumefaciens S. et T.*, в настоящее время называется *Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend) Conn.* Типичный симптом поражения – наросты, их описывают как зобоватость, опухоли, галлы. Бактерии могут находиться в растительных тканях и без проявления внешних симптомов в виде опухолей, что при вегетативном размножении может быть причиной распространения патогена с привитыми саженцами. Поэтому наиболее часто заболевание корневым раком встречается в питомниках, где постоянно наносятся раны, через которые проникает инфекция в молодые ткани деревьев при выращивании саженцев. Такие растения в годы с неблагоприятными погодными условиями погибают в первую очередь. Чаще всего неблагоприятна засуха. Поэтому болезнь широко распространена в садах и плодовых питомниках, но наибольший вред фруктовым деревьям она наносит в степных районах, где летом сильнее сказывается влияние сухой и жаркой погоды. Поскольку ткани опухолей содержат небольшое количество сосудов или могут не иметь их вовсе, то количество воды и питательных веществ, достигающих верхней части кроны резко снижается. Естественно, что при сильном поражении корневая система больных растений оказывается неспособной удовлетворить потребность дерева в воде и питательных веществах. Такие явления отмечали многие исследователи в засушливые годы, при дефиците влаги [5,6 и др.].

В 1930 году исследователям удалось показать, что заболевание в виде тонких корешков, чаще на яблоне, обязано другому микроорганизму, а не *A. tumefaciens*. Назвали его как *Bacterium rhizogenes*, в настоящее время имеет название как *Agrobacterium rhizogenes (Riker et al.) Conn.* – косматый, или волосяной, корень плодовых деревьев. На саженцах яблони наряду с симптомами корневого рака в виде опухолей, вызываемого A.tumefaciens, наблюдается образование многочисленных тонких корневых волосков на стволах, корнях или на одревесневших наростах. Долгое время такое поражение приписывали только A. *tumefaciens. Agrobacterium rhizogenes* – раневой паразит, который является родственным *A. tumefaciens*; они встречаются чаще совместно. Симптомы вызываемого им косматого корня можно отличить от корневого рака только через 3 месяца после заражения и особенно чётко, если оно произошло до 1 июля [7]. Особенно сильно поражаются 1 –3-летние яблони. В отличие от корневого рака *A. rhizogenes* вызывает задержку роста поражённых деревьев. Возбудитель

развивается в экссудате ран и заселяет межклетники. При комплексном поражении двумя возбудителями появляются как смешанные симптомы, так и характерные для каждого из них.

Бактерия A. rhizogenes в почве сохраняется более года. Все виды повреждённых корней высаженных деревьев (механические, вызываемые насекомыми и нематодами) открывают путь для инфекции. Возбудитель попадает и на надземные части деревьев с заражённым инструментом при обрезке, прививке и окулировке, увеличивая возможность заражения их в этих местах. Идентифицировать патогены можно легко при заражении ломтиков моркови кусочками тканей больных деревьев. Под действием патогена A. rhizogenes в камбиальной зоне ломтика моркови образуются корни, в то время как A. tumefaciens приводит к формированию недифференцированных галлов. Часто при заражении смесью этих бактерий образуется опухоль, представляющая собой нечто среднее между корневым раком и косматым корнем [7].

Более подробно оба патогена исследованы Ячевским [8], Израильским и его сотрудниками и результаты их работы опубликованы [9,10,11], Горленко М.Б. [12,13]. Многие исследователи сообщали о нахождении заболевания в питомниках [14,15,16 и др.]. Анализ довольно обширной литературы по корневому раку показывает, что заболевание в разные годы встречалось в питомниках России довольно часто, но вредоносность его проявлялась очажно, на небольших участках. Наиболее часто оно встречалось в начале прошлого века, когда не была ещё разработана технология выращивания саженцев в больших хозяйствах с технологией защиты их от корневого рака. В Центрально-Чернозёмном регионе заболевание встречалось, но очень редко [17]. Опрос специалистов, работающих в этом регионе по садоводству более 45 лет, также показал о практически полном отсутствии заболевания в данном регионе. И только недавно, когда материал для закладки питомников стали брать часто из-за рубежа, в одном из садоводческих хозяйств обнаружилось сильное поражение маточника подвоев яблони на площади 2 га. Для закладки маточника брали отводки, непроверенные на наличие в них патогенов бактериальных болезней из разных мест. Растения при посадке не имели внешних признаков поражения. Хорошо прижились, один год росли очень буйно. Но когда стали брать с маточников вегетативные подвои, то оказалось, что они на 100 % имели поражённую корневую систему и стебли. После окулировки их с использованием черенков различных сортов саженцы практически не росли и проявлялись на них различные поражения. Позже началось усиленное увядание растений, как на маточнике, так и на первом и втором полях питомника. Почва, на которой был заложен маточник, была супесчаной. Но сразу при его закладке было сделано капельное орошение. Можно сказать, что дефицита влаги для растений не было. Но наблюдалось сильное увядание растений. Маточник и поля питомника выкорчевали. При выкопке нам удалось сделать фотографии повреждённых растений, на которых хорошо видно заболевания в виде опухолей и волосистых корней. После полной выкорчёвки заложенного питомника выращивали рожь, а затем стали закладывать плантацию земляники. На её растениях наблюдались частые заболевания листьев неизвестной природы. Но признаков, близких к корневому раку не обнаруживались.

Таким образом, участок с супесчаной почвой оказался непригодным для выращивания яблони. Точные причины этого явления не установлены. Можно заметить, что корневой бактериальный рак является серьёзным заболеванием, но исследования по его изучению в России, к сожалению, не проводятся. Меры, предупреждающие поражение растений, разработанные ещё в первой половине прошлого века, недостаточно надёжны, а сейчас и часто не используемые.

Литература

1. Сербинов И.Л. Бактериальный рак плодовых деревьев и весенняя обмазка их известью. /И.Л. Сербинов // С-х вестник. – 1912 а. – № 4. – С.22-29.
2. Сербинов И.Л. Бактериальный рак плодовых деревьев, ягодных кустарников и других садовых, а также сельскохозяйственных растений. /И.Л. Сербинов // Плодоводство. –1912 б. – № 9. – С.787-795.
3. Сербинов И.Л. Рак растений и борьба с ним. /И.Л. Сербинов //Прогрессивное садоводство и огородничество. –1915 а. – № 28. – С. 772-776.
4. Сербинов И.Л. Бактериальный рак плодовых и других растений в современном освещении. /И.Л. Сербинов. – Петроград: типография С.Л.Кинда, 1915 б. – 32 с.
5. Шестопал З.А. Корневой рак у яблони. / З.А. Шестопал //Садоводство. – 1977. – № 12. – С.25.
6. Калиниченко Р.Н. Вредоносность бактериального рака в садах и на виноградниках Крыма. / Р.И. Калиниченко, В.Г. Панфилова // Вестник с.-х. науки. –1983. – № 11 . – С. 60-66.
7. Шпаар Д. Бактериозы культурных растений. /Д. Шпаар, Г. Клейнхемпель, Г. Мюллер, К. Науманн. – Пер. нем. и предисл. К.В. Попковой. – М.: Колос, 1980. – 143 с.
8. Ячевский А.А. Бактериозы растений: Посмертное издание, с дополнениями и под редакцией проф. Н.А. Наумова / А.А. Ячевский. – М., Л.: Огиз, гос. изд. колхозной и совхозной литературы, 1935. – 712с.
9. Бактериальные болезни растений. /Под ред. В.П. Израильского / М.: Гос. изд. с.-х. литературы. – 1952. - 344 с.

10. Бактериальные болезни растений. /Под ред. В.П. Израильского, изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Гос. изд. с.-х. литературы. – 1960. – 468 с.
11. Бактериальные болезни растений. /Под ред. И.П. Израильского, изд. 3-е, перераб. и доп. – М.: Колос. – 1979. – 288 с.
12. Горленко М.В. К биологии Pseudomonas tumefaciens возбудителя корневого рака растений. / М.В. Горленко, И.В. Воронкевич, Г.Д. Успенская // Микробиология. – 1954.– 23. – 2. – С.322-330.
13. Горленко М.В. О вредоносности корневого рака плодовых деревьев./ М.В. Горленко // Защита растений от вредителей и болезней. – 1961. – 7. – С. 18-19.
14. Яковлев Н.А. Корневой рак плодовых деревьев. /Н.А. Яковлев // Защита растений. – 1929. – Т. 6.– № 3-4. – С. 1-5.
15. Родигин М.Н. Корневой рак в Нижнем Поволжье / М.В. Родигин, Н.А. Папаева // Защита растений. – 1930. – № 1-3. – С. 113-119.
16. Исаева Е.В. Корневой рак – опасное заболевание в питомниках / Е.В. Исаева // Защита растений от вредителей и болезней. – 1961. – 11. – С.12.
17. Фоменко Т.М. О вредоносности бактериального корневого рака груши / Т.М. Фоменко // Сб. работ по селекции и агротехнике плодовых и ягодных культур. – 1975. – т.4. – С. 123-128.

СИМБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ ПАУТИННЫХ КЛЕЩЕЙ РОДА *TETRANYCHUS*

Н.Д. Коноплёв[1], *А.Н. Игнатов*[2], *С.Я. Попов*[1]

[1]*РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;*
[2]*Центр «Биоинженерия» РАН*

SYMBIOTIC BACTERIA OF *TETRANYCHUS* SPIDER MITES

N.D. Konoplev[1], *A.N. Ignatov*[2], *S.Ya. Popov*[1]

[1] *Russian Timiryazev State Agrarian University;*
[2] *Center "Bioengineering", Russian Academy of Sciences*

Summary

Overview of the most significant bacterial symbionts of Tetranychus spider mites was given in the present paper. Furthermore, we provide data about symbiotic bacteria found during species diversity study of Russian Tetranychus populations.

В последние 20 лет большой интерес вызывают внутриклеточные бактерии членистоногих и других беспозвоночных животных. Некоторые из них могут вызывать у хозяев репродуктивные нарушения, в том числе партеногенез, феминизацию, смертность самцов и цитоплазматическую несовместимость (CI, от англ. *cytoplasmic incompatibility*). Симптомы CI проявляются в виде остановки развития эмбриона животного как результат оплодотворения самок самцами с иным инфекционным статусом.

К числу наиболее опасных болезнетворных симбионтов беспозвоночных принадлежат *Wolbachia* – облигатные внутриклеточные *rickettsia*-подобные бактерии. Заражение *Wolbachia* часто встречается у насекомых [8], клещей [5], пауков [4], ракообразных [2] и нематод [1]. Другой симбионт, наследуемый по материнской линии – *Cardinium* из группы *Bacteroidete*s, - был найден у 6-7 % исследованных видов членистоногих [18], в том числе принадлежащих к четырём отрядам насекомых.

В некоторых публикациях было отмечено, что цитоплазматическая несовместимость – наиболее распространённое репродуктивное нарушение – позволяет *Wolbachia* заселять популяции хозяев [14, 15]. Эффект CI был оценен и смоделирован у нескольких видов членистоногих, включая *Drosophila simulans* [15] и *Aedes albopictus* [3]. Как только необходимое число особей оказывалось зараженным, проявлялись типичные симптомы CI-индуцированной смертности. Иными словами, чем шире в популяциях животных была распространена инфекция, тем больше оказывалась вероятность встречи незаражённой самки с заражённым самцом, что приводило к репродуктивным потерям. В то время, как CI, предположительно, является основным механизмом, позволяющим некоторым штаммам *Wolbachia* заселять и сохраняться в популяциях хозяина, механизмы, обеспечивающие заселение и сохранение штаммов, не вызывающих CI, пока не ясны. По имеющимся данным, некоторые штаммы *Wolbachia* смогли заселить природные популяции хозяев, практически не вызвав CI [9]. Парадоксально, но в последние годы было выявлено, что защита их хозяев от вирусов и других патогенов является основной движущей силой в распространении *Wolbachia* [7, 16].

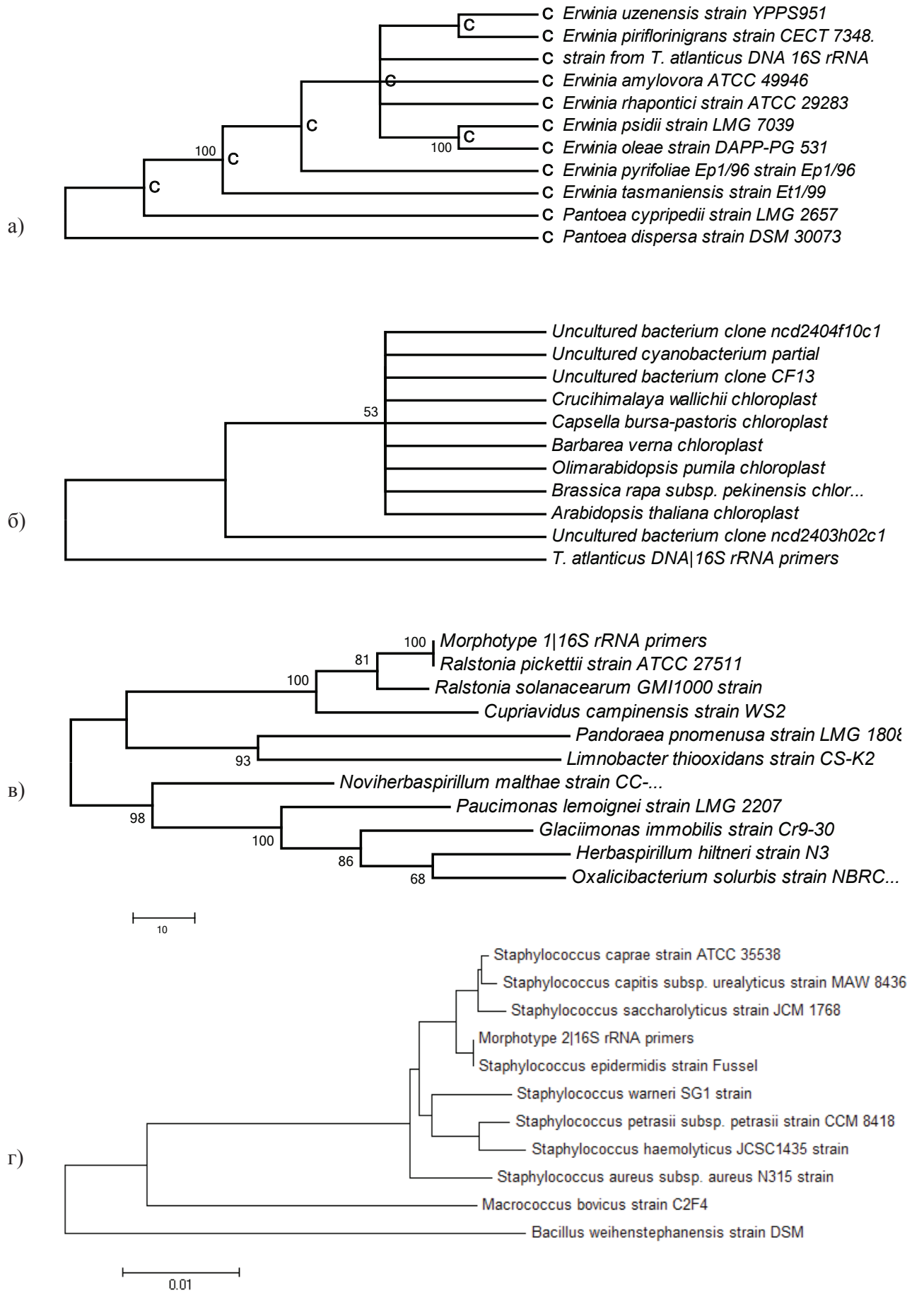


Рисунок 1. Филогенетическое дерево а) целевого фрагмента из ДНК T. atlanticus с гомологичным геном 16S rRNA Erwinia amylovora; б) целевого фрагмента из ДНК T. atlanticus с гомологичным геном 16S rRNA некультивируемой бактерии CF13; в) для последовательности целевого фрагмента в ДНК бактерий морфотипа 1; г) для последовательности целевого фрагмента в ДНК бактерий морфотипа 2. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых сопряжённые таксоны объединены при бутстреп-тесте.

Одновременное заражение *Wolbachia* и *Cardinium* одного и того же хозяина известно у ряда видов подкласса *Acari* и отряда *Hymenoptera* [6, 11, 13].

Кроме *Wolbachia* и *Cardinium*, клещи могут служить хозяевами для большого числа других микробов, разнообразие которых для Российского региона Евразии еще предстоит исследовать.

Обнаруженные бактерии-симбионты паутинных клещей рода *Tetranychus*

В ходе амплификации ДНК паутинного клеща *Tetranychus atlanticus* с праймером REP1A (5'-CGT GCC AAC GAC AAG GAC C-3') был получен полиморфный фрагмент 809 п.о., гомологичный (72% сходства для 93% длины фрагмента) гену EAMY_1809 Erwinia amylovora CFBP1430 (NCBI Reference Sequence: YP_003531167.1), гену группы гликозилтрансфераз (glucosyltransferase-I).

Проведенная амплификация исходной ДНК паутинного клеща с универсальными праймерами на ген 16S rRNA дала продукты, последовательность ДНК которых была гомологична как Erwinia amylovora (Рис. 1, а), так и неидентифицированным бактериям, сходным с цианобактериями и хлоропластами растений (Рис. 1, б).

При выделении из поверхностно-стерилизованных самок паутинного клеща видов *Tetranychus atlanticus* и *Tetranychus urticae* были получены бактерии нескольких морфотипов. Наиболее распространенный морфотип был представлен на среде Кинга Б желтыми плоскими неслизистыми колониями и встречался в 90% изученных особей клещей обоих видов. Второй по частоте морфотип был представлен белыми неслизистыми колониями, и был обнаружен в 15% особей клещей.

Проведенная амплификация ДНК бактерий с универсальными праймерами на ген 16S rRNA дала продукты, последовательность ДНК которых была гомологична *Ralstonia pickettii* (Рис. 1, в) для морфотипа 1 и *Staphylococcus epidermidis* для морфотипа 2 (Рис. 1, г)

Имеются публикации, сообщающие об обнаружении *Staphylococcus epidermidis* в особях обыкновенного паутинного клеща *Tetranychus urticae* [17], а также других видов рода *Staphylococcus* в синантропных клещах *(Acari: Astigmata)* [10]. Во втором случае предполагается, что эти бактерии могли попасть в пищеварительный тракт клеща вместе с пищей. Представители рода *Erwinia* встречаются у насекомых в качестве переносимых ими фитопатогенов [12]. В частности, зафиксирован перенос тлями, что по аналогии указывает на возможность участия паутинных клещей в роли переносчиков этих фитопатогенов.

Заключение. В данном сообщении представлена краткая обзорная информация о наиболее значимых симбионтах паутинных клещей рода *Tetranychus*. Кроме того, приведена информация о найденных бактериальных симбионтах, полученная во время изучения видового разнообразия паутинных клещей рода *Tetranychus*. Их роль в развитии организма хозяина и влияние на репродукцию и выживаемость не ясны и могут стать одними из направлений дальнейших исследований.

Литература

1. Bandi C. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. / C. Bandi, T. J. Anderson, C. Genchi, M. L. Blaxter // Proc. Biol. Sci. – 1998. – T. 265 – № 1413 – 2407–13c.
2. Bouchon D. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. / D. Bouchon, T. Rigaud, P. Juchault // Proc. Biol. Sci. – 1998. – T. 265 – № 1401 – 1081–90c.
3. Dobson S.L. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected Aedes albopictus. / S. L. Dobson, W. Rattanadechakul, E. J. Marsland // Heredity (Edinb). – 2004. – T. 93 – № 2 – 135–42c.
4. Goodacre S.L. *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. / S. L. Goodacre, O. Y. Martin, C. F. G. Thomas, G. M. Hewitt // Mol. Ecol. – 2006. – T. 15 – № 2 – 517–27c.
5. Gotoh T. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. / T. Gotoh, H. Noda, X.-Y. Hong // Heredity (Edinb). – 2003. – T. 91 – № 3 – 208–16c.
6. Gotoh T. Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. / T. Gotoh, H. Noda, S. Ito // Heredity (Edinb). – 2007. – T. 98 – № 1 – 13–20c.
7. Hedges L.M. *Wolbachia* and virus protection in insects. / L. M. Hedges, J. C. Brownlie, S. L. O'Neill, K. N. Johnson // Science – 2008. – T. 322 – № 5902 – 702c.
8. Hilgenboecker K. How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. / K. Hilgenboecker, P. Hammerstein, P. Schlattmann, A. Telschow, J. H. Werren // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – T. 281 – № 2 – 215–20c.
9. Hoffmann A.A. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in Drosophila simulans that does not cause cytoplasmic incompatibility. / A. A. Hoffmann, D. Clancy, J. Duncan // Heredity (Edinb). – 1996. – T. 76 (Pt 1) – 1–8c.
10. Hubert J. Detection and identification of species-specific bacteria associated with synanthropic mites. / J. Hubert, J. Kopecký, M. A. Perotti, M. Nesvorná, H. R. Braig, M. Ságová-Marečková, L. Macovei, L. Zurek // Microb. Ecol. – 2012. – T. 63 – № 4 – 919–28c.
11. Liu Y. Distribution of the endosymbiotic bacterium Cardinium in Chinese populations of the carmine spider mite Tetranychus cinnabarinus (Acari: Tetranychidae) / Y. Liu, H. Miao, X.-Y. Hong // J. Appl. Entomol. – 2006. – T. 130 – № 9-10 – 523–529c.
12. Nadarasah G. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. / G. Nadarasah, J. Stavrinides // FEMS Microbiol. Rev. – 2011. – T. 35 – № 3 – 555–75c.

13. Ros V.I.D. The effects of, and interactions between, *Cardinium* and *Wolbachia* in the doubly infected spider mite Bryobia sarothamni. / V. I. D. Ros, J. a J. Breeuwer // Heredity (Edinb). – 2009. – Т. 102 – № 4 – 413–22с.
14. Sinkins S.P. Use of *Wolbachia* to drive nuclear transgenes through insect populations. / S. P. Sinkins, H. C. J. Godfray // Proc. Biol. Sci. – 2004. – Т. 271 – № 1546 – 1421–6с.
15. Turelli M. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California Drosophila. / M. Turelli, A. A. Hoffmann // Nature – 1991. – Т. 353 – № 6343 – 440 – 2с.
16. Wong Z.S. *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in Drosophila. / Z. S. Wong, L. M. Hedges, J. C. Brownlie, K. N. Johnson // PLoS One – 2011. – Т. 6 – № 9 – e25430c.
17. Yoon C. Bacterial Diversity and Distribution from the Whole Mite Extracts in Acaricide Resistant and Susceptible Populations of Twospotted Spider Mite-Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) / C. Yoon // J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. – 2010. – Т. 53 – № 4 – 446–457с.
18. Zchori-Fein E. Distribution of the bacterial symbiont Cardinium in arthropods. / E. Zchori-Fein, S. J. Perlman // Mol. Ecol. – 2004. – Т. 13 – № 7 – 2009–16с.

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *XANTHOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ ТОМАТА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

К.П. Корнев[1], В.А. Политыко[1], Е.И. Кырова[2], С.В. Виноградова[3], Н.В. Шаад[4], Д. Ластер[4], А.Н. Игнатов[1,2,3]

e-mail:an.ignatov@gmail.com

[1] ВНИИ фитопатологии, [2] РУДН, [3] Центр «Биоинженерия» РАН

[4] ARS-USDA, USA

BACTERIA OF THE GENUS XANTHOMONAS FOUND ON TOMATO PLANTS IN RUSSIA

K.P. Kornev[1], V.A. Polityko[1], E.I. Kyrova[2], S.V. Vinogradova[3], N.W. Schaad[4], D. Luster[4], A.N. Ignatov [1,2,3]

[1] *Russian Research Institute of Phytopathology,* [2]*Russian People's Friendship University,*

[3] *Center "Bioengineering" RAS,*

[4] *ARS-USDA, USA*

Summary

Current data on the prevalence of xanthomonads causing bacterial black spot disease of tomato: Xanthomonas euvesicatoria, X. vesicatoria, X. perforans, X. gardneri in Russia. We have studied the properties of these phytopathogens, and X. arboricola and X. campestris pv. raphani strains isolated from tomato in Russia.

В настоящее время данные о распространении возбудителей черной бактериальной пятнистости томата – видов *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* на территории России ограничены. Мы изучили свойства данных фитопатогенов, а также *X. arboricola* и *X. campestris* pv. *raphani* для штаммов, выделенных на территории России. Большая часть изученных биохимических признаков рода *Xanthomonas* соответствовала описаниям из литературы (Bergy, 1980, 1987; Schaad, 1980, 2000). В тоже время основные различия заключались в наличии пектолитической и амилолитической активности (Stall et al., 1994; Bouzar et al., 1995; Vaunterin et al., 1995). Так, штаммы *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* и *X. arboricola* не имели пектолитической и амилолитической активности в отличие от штаммов *X. vesicatoria*, *X. perforans* и *X. campestris* pv. *raphani*. Подавляющее большинство штаммов возбудителя, собранных на территории России, были оксидазоотрицательными, не имели аргининдигидролазы, уреазы, не образовывали индол, не редуцировали нитраты в нитриты, гидролизовали казеин, эскулин, крахмал, твин 80 (Рис. 1) и желатин. На питательной среде с твином 80 колонии имели характерный для ксантомонад вид. Большинство штаммов использовали цитрат, лактат, малонат и сукцинат и быстро редуцировали лакмусовое молоко. Рост штаммов *X. gardneri* прекращался при содержании 2% NaCl и 0,1% трифенилтетразолия хлорида, в то время как штаммы *X. vesicatoria* росли на питательной среде с 4% NaCl и 0,1% трифенилтетразолия хлорида. Образование кислоты наблюдали на арабинозе, лактозе, маннозе, сахарозе, трегалозе, целлобиозе, фруктозе, глюкозе и галактозе с небольшими различиями между штаммами видов. Все штаммы были восприимчивы к стрептомицину и устойчивы к Cu^{2+} (Таблица 1).

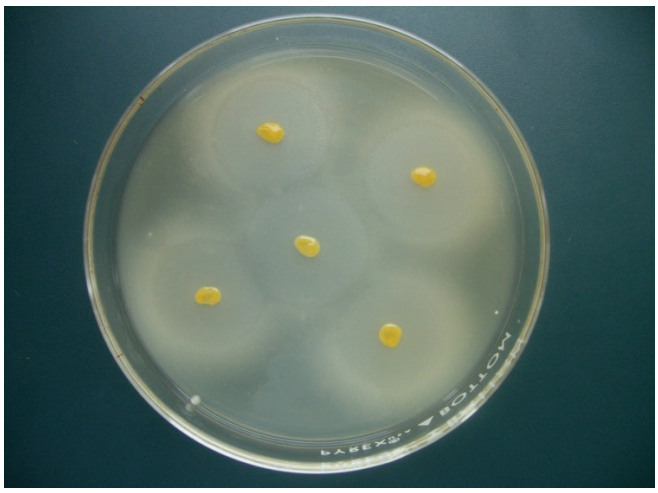


Рис. 1 Возбудитель черной пятнистости томатов на агаризованной питательной среде с Твин 80 в качестве единственного источника углерода

Изучали реакцию *Xanthomonas euvesicatoria, X. vesicatoria X. perforans* и *X. gardneri* по отношению к 10 антибиотикам методом дисков (табл. 2). Для всех видов наибольшая восприимчивость была показана к левомицетину, стрептомицину, эритромицину, гентамицину и канамицину, поэтому эти антибиотики могут быть использованы для обеззараживания семян пасленовых культур от данных фитопатогенов. По сравнению с другими видами *X. gardneri* проявлял наибольшую чувствительность по отношению к ампициллину. Изученные штаммы были в основном устойчивы к нистану и цефалексину. Полученные результаты могут быть использованы при разработке питательных сред для дифференциации видов *Xanthomonas*, поражающих томаты.

Случайный ПЦР-анализ

Исследование генетической дифференциации штаммов рода *Xanthomonas* было проведено методом rep-ПЦР с праймерами ERIC1/ERIC2, BoxA, BoxS1, BoxS2, BoxS3, C-152, IaaH/IaaH2. Из них наилучшим праймером по показателям качества получаемых спектров и воспроизводимости результатов является BoxS3, укороченный с 5'-конца вариант праймера BoxA, широко используемого для rep-PCR (Louws et al., 1994), а также IaaH/IaaH2. Совокупные данные по ПЦР генотипированию были использованы для построения дендрограммы, показывающей группировку штаммов *X. euvesicatoria* и *X. gardneri* в один кластер, тогда как виды *X. campestris* pv. *raphani* и *X. vesicatoria* были соответственно распределены между 2 и 3 кластерами. Референтный штамм *X. perforans* 938 во всех случаях группировался со штаммами вида *X. euvesicatoria*. Три штамма *X. arboricola* 417 и 1577, 1579 были также сгруппированы с *X. euvesicatoria,* хотя имели четкие отличия по отдельным фрагментам. Полученные результаты были проверены секвенированием фрагментов ДНК 5 генов (MLST) у представительных штаммов отдельных групп и ПЦР анализом с ранее опубликованными специфичными праймерами для каждого из видов.

ПЦР со SCAR-маркерами

Изучение коллекции ДНК бактерий со специфичными наборами маркеров для четырех групп бактериальной пятнистости – BS-Xe F/R; BS-Xv F/R; BS-Xp F/R; BS-Xg F/R (Koenraadt et al., 2009) – показало наличие положительной реакции только в случае с парой маркеров BS-Xg F/R, тогда как штаммы видов *X. euvesicatoria, X. vesicatoria* и *X. perforans* не давали ожидаемых фрагментов. Фрагмент размером 154 н.п. наблюдался у штаммов № 322, 324, 346, 411, 412, 435, 444, 511, 512, ранее сгруппированных вместе на основании данных биохимических тестов и результатов случайного ПЦР как вид *X. gardneri.*

MLSA

Дифференциация штаммов рода *Xanthomonas*, выделенных из растений томата, была проведена методом MLSA с учетом данных, полученных при помощи rep-PCR и биохимических методов.

Нуклеотидные последовательности были определены для фрагментов 5 генов *dnaK*, *rpoD*, *fyuA*, *prpC*, *fabY* (Ignatov et al., 2007; Young et al., 2008), из которых информативными оказались только два – *prpC* и *dnaK*. Кластеризация штаммов по участкам данных генов (рис. 3, 4), в целом, совпадала с таковой, полученной для совокупных данных по ПЦР генотипированию (рис. 2). В то же время два штамма (1577, 417), выделенные из растений томата, относятся к виду *X. arboricola*, 6 штаммов (432, 1572-1574, 111R) – к *X. campestris* pv. *raphani*. MLSA показал высокую степень сходства последовательностей штаммов р. *Xanthomonas* из российской коллекции с секвенированными последовательностями штаммов соответствующих видов.

Литература

Schaad NW, 1988. Initial identification of common genera. In: Schaad NW, ed. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul, USA: APS Press, 1-15.

Dreier J, Bermpohl A, Eichenlaub R, 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Phytopathology, 85(4):462-468

EPPO, 2011. EPPO Reporting Service. EPPO Reporting Service. Paris, France: EPPO. http://archives.eppo.org/EPPOReporting/Reporting_Archives.htm

EPPO, 2013. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm

Таблица 1.
Биохимические свойства штаммов возбудителей черного бактериоза томатов

Биохимические тесты	*Штаммы рода Xanthomonas*					
	euvesicatoria	*vesicatoria*	*perforans*	*gardneri*	*campestris. pv. raphani*	*arboricola*
Активность						
Амилолитическая	-	+	+	-	+	-
Пектолитическая	-	+	+	-	+	-
Протеолитическая	-	30/31	-	11/12	±	-
Образование H_2S	+	+	+	11/12	+	+
Максимальная температура для роста, ^{0}C	38^0	38^0	38^0	36^0	38^0	38^0
Максимальная устойчивость к NaCl, %	1-3	3-4	1,0	1,0	3,0	3,0
Лакмусовое молоко		щ		щ		
Рост на среде с 0,1 % ТТХ 0,02% ТТХ	 8/9 8/9	 + +	 + +	 - -	 - -	 + +
Образование кислоты из: Арабинозы Маннозы Галактозы Трегалозы Целлобиозы Фруктозы Глюкозы	 + + + + + + +	 + + + 30/31 + + +	 + + + + + + +	 + 11/12 11/12 + + + +	 + + 13/14 + + + +	 + + + + + + +

Обозначения: «+» – положительная реакция (наличие признака), «-» – отрицательная реакция (отсутствие признака), дробные показатели – число штаммов с положительной реакцией/общее число штаммов.

Таблица2.
Чувствительность штаммов бактерий рода *Xanthomonas* к 10 антибиотикам

Антибиотические вещества, концентрация на диске	*Зона ингибирования роста в см*				*Среднее значение для рода Xanthomonas*
	X. euvesicatoria	*X. vesicatoria*	*X. perforans*	*X. gardneri*	
Ампицилин 10 мкг/диск	0,17	0,08	0,10	0,77	$0,28^{cd}$
Гентамицин 10 мкг/диск	0,62	0,79	0,75	1,00	$0,79^{b}$
Левомицетин 30 мкг/диск	1,17	1,09	1,83	1,42	$1,38^{a}$
Канамицин 30 мкг/диск	0,51	0,68	0,67	1,08	$0,74^{b}$
Налидиксовая кислота 30 мкг/диск	0,59	0,50	0,78	0,51	$0,60^{bc}$
Нистатин 80 мкг/диск	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Полимиксин Б 300 ЕД/диск	0,53	0,52	0,45	0,63	$0,53^{bc}$
Стрептомицин 30 мкг/диск	0,56	0,78	0,74	1,48	$0,89^{b}$
Цефалексин 30 мкг/диск	0,01	0,04	0,00	0,00	0,0
Эритромицин 15 мкг/диск	0,80	1,00	0,98	1,38	$1,04^{ab}$
Чувствительность вида	0,50	0,55	0,63	0,83	

Примечание: обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа (F=14,1; p=0,1*10^{-6}) с последующим попарным сравнением по критерию Дункана. Разными буквами обозначены значимые различия (p<0,05)

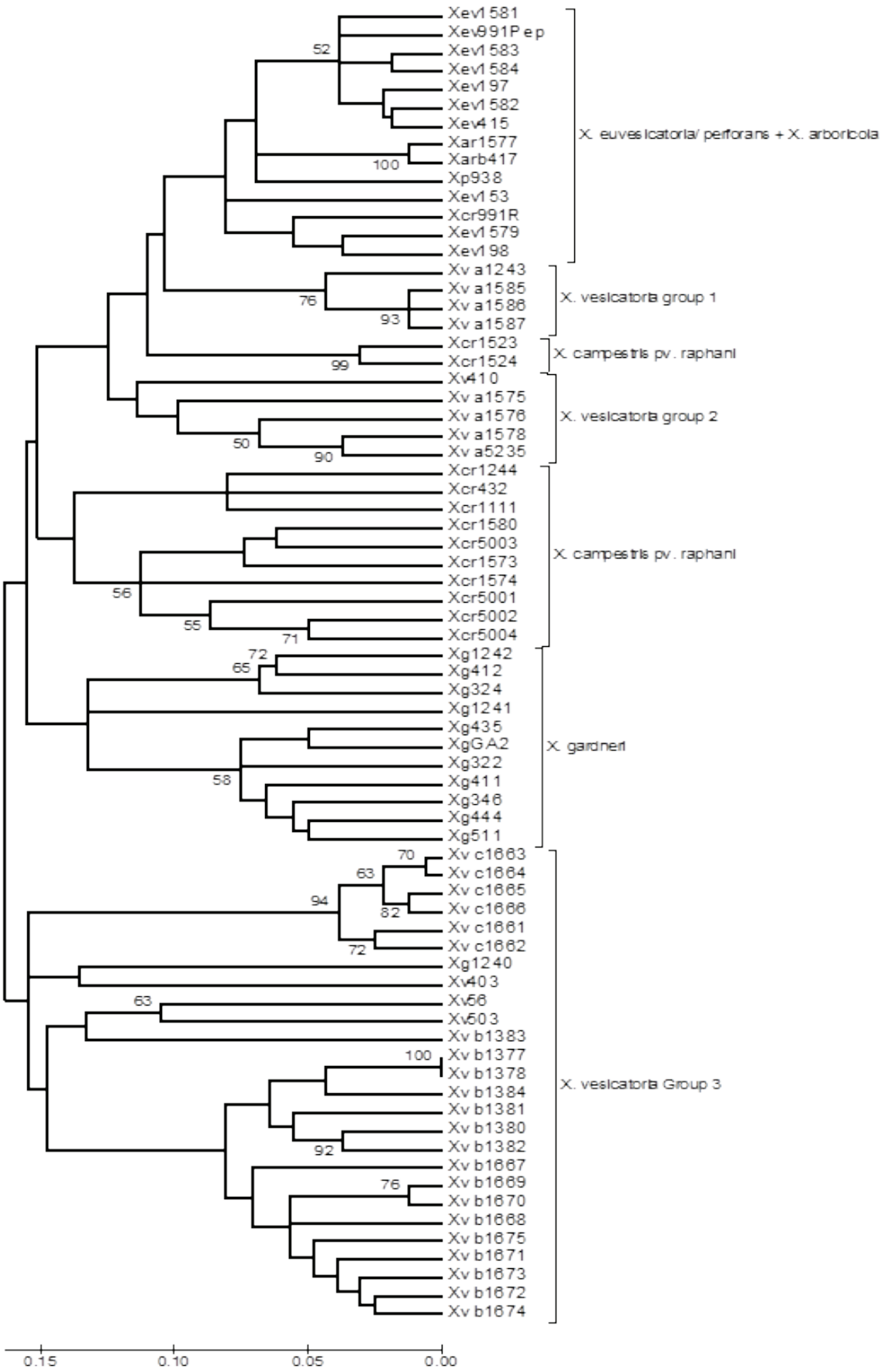


Рис. 2. Дендрограмма сходства 71 штамма рода *Xanthomonas* по результатам ПЦР анализа с праймерами BOXS3, IaaH/IaaH2, BS-Xg, построенная методом максимальной парсимонии. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями

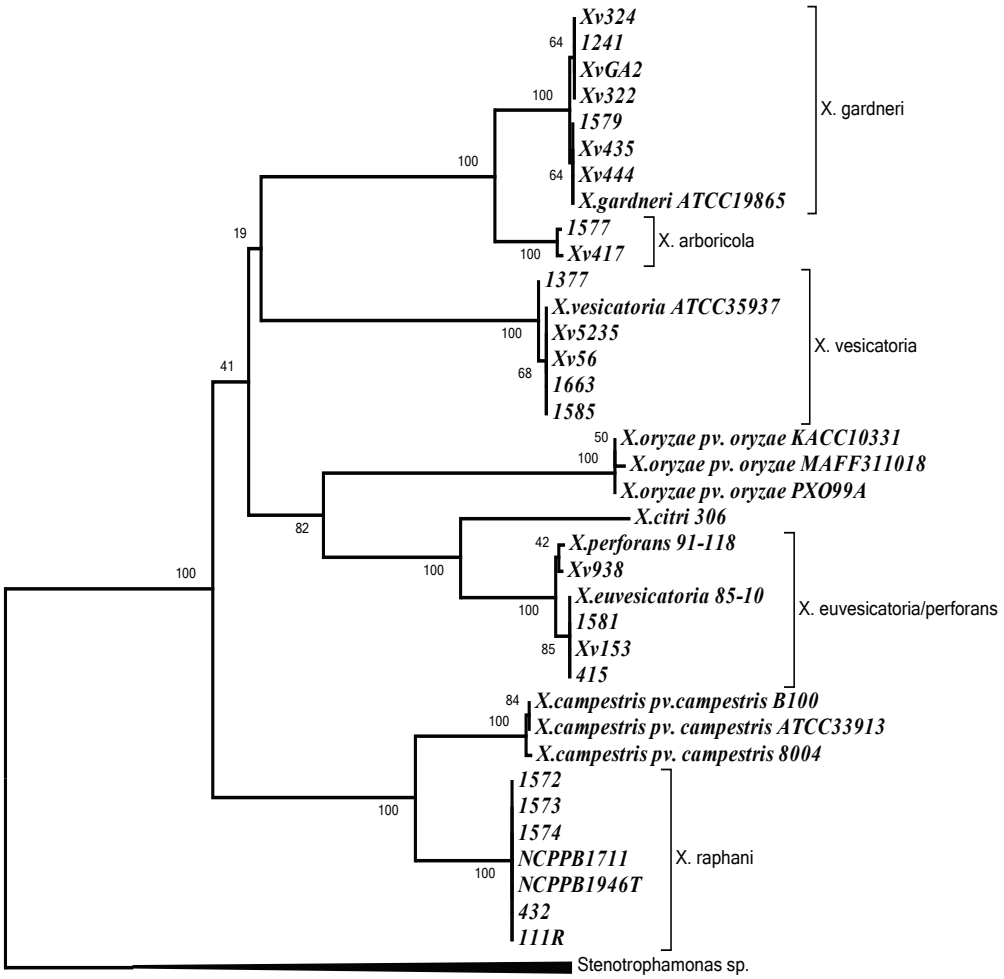


Рис. 3. Дендрограмма сходства штаммов рода *Xanthomonas* для последовательностей 40 фрагментов гена *prpC*, построенная методом ближайшего связывания. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями

Рис. 4. Дендрограмма сходства штаммов рода *Xanthomonas* для последовательностей 48 фрагментов гена *dnaK*, построенная методом ближайшего связывания. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями.

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBPS. *MICHIGANENSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ ТОМАТА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

К.П. Корнев[1],В.А. Политыко[1], Е.И. Кырова[2], С.В. Виноградова[3], Н.В. Шаад[4], Д. Ластер[4], А.Н. Игнатов[1,2,3]

e-mail:an.ignatov@gmail.com

[1] ВНИИ фитопатологии, [2] РУДН, [3] Центр «Биоинженерия» РАН

[4] ARS-USDA, USA

CHARACTERISTICS OF BACTERIA CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBPS. MICHIGANENSIS EXTRACTED FROM PLANTS TOMATO IN RUSSIA

K.P. Kornev[1], V.A. Polityko[1], E.I. Kyrova[2], S.V. Vinogradova[3], N.W. Schaad[4], D. Luster[4], A.N. Ignatov[1,2,3]

[1] *Russian Research Institute of Phytopathology,* [2]*Russian People's Friendship University,*

[3] *Center "Bioengineering" RAS*

[4] *ARS-USDA, USA*

Summary

The available data on the distribution of the pathogen of tomato Clavibacter michiganensis subps. michiganensis in Russia are fragmentary partly because of the low level applied diagnostic methods in previous Russian research. This work is devoted to the properties of the phytopathogen on molecular level and diagnostic of the strains isolated in Russia from tomatoes and potatoes.

Известные данные о распространении возбудителя рака томата *Clavibacter michiganensis* subps. *michiganensis* на территории России отрывочны и немногочисленны, что отчасти связано с недостаточной освещенностью методов диагностики в русскоязычной литературе. Данный раздел посвящен свойствам данного фитопатогена с проведением молекулярно-генетического исследования и описание диагностических признаков для штаммов, выделенных на территории России из томатов, а также картофеля. Все тестируемые 62 штамма из коллекции ВНИИ фитопатологии были грамположительными коринобактериями, с окислительным типом дыхания. Наблюдался рост колоний на селективной среде CNS, тогда как на среде TTX рост был слабый. Все утилизировали соль уксусной кислоты. Различия между штаммами наблюдались в их способности окислять углеводы. Так, штаммы 1231, 1326 и 1520, выделенные из картофеля, слабо окисляли сорбит, а штамм 1246 утилизировал инулин (табл. 1).

Следует отметить, что в нашем исследовании штаммы подвида *sepedonicus* (Московская обл.; Белоруссия) вопреки литературным данным окисляли рибозу и слабо окисляли инулин, тогда как по остальным свойствам различий обнаружено не было (Shaad et al., 2001). Сравнение чувствительности к 10 видам антибиотиков двух подвидов рода *Clavibacter*, включая выделенные из картофеля штаммы *Cmm*, показало, что наибольшее ингибирование роста колоний у всех изученных штаммов вызывали ампициллин, гентамицин, левомицетин, стрептомицин и эритромицин (табл. 2). Напротив, налидиксовая кислота, нистатин и полимиксин выраженного воздействия не оказывали. В целом, чувствительность подвидов бактерий по отношению к группам антибиотиков слабо различалась.

Оценка вирулентности штаммов и круга-растений хозяев

Сравнение методов заражения растений-хозяев *Cmm* показало, что появление симптомов и развитие болезни зависит от метода инокуляции (Матвеева и др., 1999). Инъекция в стебель изолятов, вызывающая в естественных условиях вилт растений, приводила к гибели рассады в течение 2 дней. Прищипывание листовой пластинки или клиппинг вызывало развитие в местах повреждения хлорозов, переходящих в некрозы, в результате чего лист быстро засыхал и отмирал. Применение метода обрезания ножницами 1/3 листовой пластинки не приводило к быстрому развитию некроза или гибели растения, позволяя наблюдать последовательное проявление симптомов болезни. Тестированные изоляты сначала вызывали хлороз в месте среза, затем развитие инфекции шло по центральной жилке, хлоротичная зона увеличивалась и переходила в обширный некроз. Искусственное заражение бактериальными штаммами *Cmm* вызывало поражение растений томата, тогда как остальные растения семейства Пасленовых, растения семейств Капустных, Злаковых и Бобовых были устойчивы к данному патогену.

Таблица 1.

Биохимические свойства штаммов *Clavibacter michiganensis* subps. *michiganensis*, выделенных из растений томатов, клубней и растений картофеля, в сравнении с подвидом *Clavibacter michiganensis* subps. *sepedonicus*

Признак		***Штаммы***							
		Cmm					***Cms***		
		выделенные из томата		***выделенные из картофеля***					
Группа	Тест	NCPPB 2979[T*]	1205, 1215, 1230, 1234, 1237, 1238, 1436, 1437, 1439, 1441, 1447, 1449, 1452, 1453, 1462, 1463, 1464, 1469, 1551, 1552, 1588, 1590, 1612, 1615, 1616, 1639, 1644, 1680, 1681, 1682, 1684, 1686, 1691, 1692, 1693, 1696, 1697, 1699	1239, 1245, 1247, 1248, 1325, 1519, 1617, 1618, 1619, 1620, 1621, 1622, 1623, 1624, 1626, 1627, 1628, 1629	1246	1231, 1326, 1520	ATCC 33113*	72	204
Рост на среде	CNS	+	+	+	+	+	+	+	+
	TTC	+	w	W	w	w	–	+	+
Редуцирующие вещества	Рибоза	+	+	+	+	+	+	+	+
	Сорбит	–	–	–	–	+\-	+	–	+
Утилизация	Инулин	–	–	–	+	–	–	+	+\-
	Ацетат	+	+	+	+	+	+	+	+
	Формиат	+	+	+	+	+	–	–	–
Гидролиз	Казеин	–	–	–	–	–	–	–	–
	Эскулин	+	+	+	+	+		+	+

Примечание: * – по литературным данным; «+» – наличие признака, «–» – отсутствие признака, «+\–» – вариабельное проявление признака, «w» –слабый рост.

Таблица 2.

Чувствительность штаммов бактерий рода *Clavibacter* к 10 антибиотикам

Антибиотики, концентрация на диске	***Зона ингибирования роста в см***							***Средняя чувствительность трех подвидов по всем антибиотикам***		
	Cmm, выделенные из картофеля			***Cmm 1233***	***Cms***					
	n=10			***n=1***	***n=2***					
Ампицилин 10 мкг/диск	1,69	±	0,11	1,20	1,68	±	0,58	1,65[b]	±	0,11
Гентамицин 10 мкг/диск	0,98	±	0,07	1,50	1,13	±	0,68	1,04[d]	±	0,10
Левомицетин 30 мкг/диск	1,23	±	0,08	1,25	1,10	±	0,10	1,21[cd]	±	0,07
Канамицин 30 мкг/диск	0,66	±	0,04	0,70	0,78	±	0,43	0,68[e]	±	0,06
Налидиксовая кислота 30 мкг/диск	0,01	±	0,01	0,00	0,00	±	0,00	0,01[f]	±	0,01
Нистатин 80 мкг/диск	0,02	±	0,02	0,00	0,00	±	0,00	0,02[f]	±	0,02
Полимиксин Б 300 ЕД/диск	0,00	±	0,00	0,00	0,00	±	0,00	0,00[f]	±	0,00
Стрептомицин 30 мкг/диск	1,36	±	0,07	1,60	1,35	±	0,65	1,38[c]	±	0,09
Цефалексин 30 мкг/диск	0,43	±	0,02	0,60	0,88	±	0,38	0,51[e]	±	0,07
Эритромицин 15 мкг/диск	1,99	±	0,12	2,6	1,3	±	0,45	1,93[a]	±	0,14
Средняя чувствительность подвида	0,83	±	0,07	0,94	0,82	±	0,17			

Примечание: «n» – количество штаммов. Обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа для каждого подвида в зависимости от вида антибиотика (F=1,49; p=0,1), по чувствительности каждого подвида в отдельности ко всем изученным антибиотикам (F=0,77; p=0,47) и влияния вида антибиотиков на бактерии рода *Clavibacter* (F=36,0; p=0,1*10^{-6}). Попарное сравнение выполнено с помощью тестом Дункана. Разными буквами обозначены значимые различия (p<0,05).

Обнаруженные на картофеле штаммы *Cmm* вызывали симптомы некроза и увядания после искусственного заражения томатов и картофеля, на некоторых растениях перца, после двух недель инкубации, появились слабые хлорозы, остальные растения сем. Пасленовых, а также выбранные представители Капустных, Злаковых и Бобовых, были устойчивы. Таким образом, среди *Cmm* встречаются штаммы способные поражать картофель, который в естественных условиях могут выступать в роли резерватора патогена.

Молекулярно-генетическая характеристика бактерий вида *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Изучение генетических свойств бактерий *Cmm* проводилось на представительных штаммах, выделенных из различных зон Российской Федерации. Были идентифицированы также бактерии подобные *Cmm,* выделенные из картофеля.

Специфический ПЦР-анализ

ПЦР-анализ штаммов, выделенных из растений томатов и картофеля с парой праймеров CMM5/CMM6, рекомендованных для диагностики возбудителя рака томата (EPPO bulletin, 2005), показал однородную положительную реакцию с ожидаемым продуктом амплификации 614 н.п. Данный фрагмент локализован на последовательности ДНК гена *pat-1*, кодирующего эндонуклеазу, являющемся одним из факторов, вызывающим увядание растений (Dreier et al., 1995; Burger et al., 2005). Однако, с данной парой праймеров не прореагировали штаммы из Московской области (1514, 1515, 1517).

Таким образом, было подтверждено, что подавляющее большинство исследованных штаммов, включая поражающие картофель, относились к *Cmm* по реакции со специфическим праймером и обладали одним и тем же фрагментом ДНК гена патогенности. Поскольку у исследованных штаммов *Cmm* была выявлена высокая гетерогенность, все они были также исследованы на возможность принадлежности к подвиду *sepedonicus* со специфичной праймерной парой PSA 1/R. Положительная реакция наблюдалась лишь у штамма *Cms* 204.

ПЦР в реальном времени

Для подтверждения полученных ранее результатов идентификации штаммов *Cmm*, выделенных из картофеля, был использован метод ПЦР в реальном времени с набором праймеров и проба «Nova Primers» CMM специфичных для подвида *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (California seed & Plant Lab, Inc, США). ПЦР-анализ в реальном времени подтвердил полученные ранее результаты: все штаммы *Cmm*, выделенные из картофеля, реагировали положительно только с набором специфичным для подвида *michiganensis* с превышением трешхолда в промежутке с 21 по 27 цикла. Положительный результат показал также контрольный штамм, выделенный из томата (№1201). Как и ожидалось, штаммы Cms и *Xanthomonas gardneri* (штамм GA2) показали отрицательный результат.

STS-ПЦР

Положительная реакция при проведении ПЦР-амплификации ДНК изучаемых штаммов с 14 парами праймеров, специфичных для подвида *Cmm* (Rijlaarsdam et al., 2004), была получена для общих фрагментов для *Cmm* и *Cms*, которые локализованы на гене *Cms* 2758 (D2 F/R), *Cms* 2605 (F5 F/R) и в межгенном регионе *Cms* 1694-*Cms* 1695 (E5 F/R). Однородные профили для всех исследуемых изолятов *Cmm* были получены с праймерами D11 и E1, которые давали продукты амплификации 110 н.п. и 100 н.п., соответственно.

MLST/MLSA

Первоначально для проведения MLST были использованы праймеры для целевых генов *gyrB, recA, rpoB* и *ITS 16S-23S*, разработанные для уточнения таксономии видов семейства *Microbacteriaceae* (Stackebrandt et al., 2007), в которое входит род *Clavibacter*. Из предложенного набора маркерных генов только *recA* и *rpoB* позволяют дифференцировать штаммы *Cmm* от остальных подвидов. Поэтому следующим этапом было создание и усовершенствование системы MLST для исследуемого фитопатогена. Основой для разработки праймеров являлось сравнение двух геномов подвидов *Cmm* и *Cms*. Важно было найти гены и участки генов, обладающие умеренным полиморфизмом, но достаточным для дифференциации подвидов патогенов.

Всего было разработано 13 пар праймеров. Была проведена оптимизация условий ПЦР. В результате была подобрана универсальная температура (58°C), подходящая для всех пар праймеров. С данной температурой прореагировали все 13 пар, но при дальнейшем тестировании были отбракованы четыре (Cmm_2584F/R, Cmm_1169F/R, Cmm_0709/0710F/R, Cmm_0388F/R), показавшие положительную реакцию с ДНК всего лишь для нескольких штаммов. На следующем этапе исследовали оставшиеся 9 пар праймеров. Все штаммы *Cmm* были успешно секвенированы для 9 изучаемых генов. Однако у остальных штаммов в отдельных случаях не были получены продукты амплификации исследуемых генов, кроме *atp* (АТФ-синтетазы).

Исследование сходства штаммов на основе последовательностей АТФ-синтетазы методом наибольшей парсимонии позволило выделить

Таблица 3.
Список оригинальных пар праймеров для MLST рода *Clavibacter*

Название гена	***Сокращение***	***Название праймера***
50S Рибосомальный протеин L17	-	Cmm_2584F/R
Белок, отвечающий за удвоение ДНК	-	Cmm_1169F/R
Стресс протеин, белок устойчивости	-	Cmm_0709/0710F/R
Шок-протеин	-	Cmm_0388F/R
Рекомбиназа А	*recA*	Cmm_2025F/R
АТФ-синтетаза	*atp*	Cmm_1012F/R
Мембранный белок транспорта полисахарида	*spt*	Cmm_0832F/R
Арсенат пермеаза	*arsB*	Cmm_1076/7F/R
Глутамин-синтетаза	*glnA*	Cmm_0003F/R
Глюкозо-1-фосфат тимидилтрансфераза	*gpt*	Cmm_1636F/R
СОС-репрессор	*sos*	Cmm_2018/2019F/R
РНК полимераза (DNA-directed RNA polymerase beta chain)	*rpoB*	Cmm_2631/2632F/R
ITS – фрагмент между генами tmRNA (SsrA)-binding protein и putative iron ABC transporter, permease component	*ssrA*	Cmm_1312F/R

основные кластеры: первый включал подвиды *Clavibacter* – *Cmi*, *Cmt*, *Cms* и *Curtobacterium flaccumfaciens*, во второй объединились виды *Rathayibacter*, третий образовывали штаммы *Cmm*, выделенные из томатов и картофеля, и *Rodococcus fascians*, в четвертую группу, близкую к третьему кластеру, вошли *Cms*, *Cmn*, *Cmt* (рис. 1). Проведенная кластеризация позволила выделить группу штаммов *Cmm*, включая данные о штамме из GenBank, от остальных подвидов на основе последовательностей участка гена АТФ-синтетазы.

Сорок штаммов, включая три из GenBank, были проанализированы на основе последовательностей фрагмента гена *gpt* (глюкозо-1-фосфат тимидилтрансфераза). Все штаммы *Cmm* были выделены в отдельный кластер, тогда как другой кластер образовывали штаммы других четырех исследуемых подвидов *Clavibacter*, а также *Rathayibacter* (рис. 2).

Сравнение 41 последовательности фрагмента гена РНК полимеразы (*rpoB*), включая NCPPB382, показало, что штаммы *Cmm*, выделенные из картофеля (кроме 70440), и два (1238 и 9-24), полученных из томата, обособлялись в отдельную группу. Однако этот ген не позволял дифференцировать штаммы *Cmm*, *Cms, Cmi, Cmn*, которые вместе с *Rathayibacter* объединялись в другой крупный кластер.

Праймеры гена *recA* (рекомбиназа А) позволили получить последовательности лишь для 25 штаммов (3 последовательности были взяты из генбанка), а для подвида *Cms* продукты амплификации получены не были. В результате штаммы *Cmm* дифференцировались от других подвидов *Clavibacter michiganensis*.

Дендрограмма сходства на основе последовательностей участка гена арсенатпермеазы (*arsB*) дифференцировала штаммы *Cmm* от остальных изученных подвидов, включавших *Cm* ssp. *nebraskensis, insidiosum* и *tesselarius*.

Тридцать шесть последовательностей фрагментов гена *glnA* (глутаминсинтетазы I) методом ближнего соседа дифференцировались на три группы, одну из которых формировали исключительно штаммы *Cmm*. Внутри данного кластера обособлены штаммы *Cmm*, выделенные из картофеля. В другие два кластера были сгруппированы штаммы подвиды *Clavibacter*.

Анализ последовательностей фрагментов гена транспорта полисахарида (*spt*) методом наибольшей парсимонии для 39 штаммов не позволили четко дифференцировать подвиды *Clavibacter*.

Последовательности фрагмента гена СОС-репрессора (*sos*), являющийся достаточно коротким (156 н.п.), удалось получить лишь для 24 штаммов *Cmm*, но четкой дифференциации их от вида *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* получено не было.

Анализ сходства участков региона между генами tmRNA (SsrA) и ABC-транспортером железа проводился на базе 39 последовательностей (2 из генбанка). Штаммы *Cmm* группировались в один кластер, но включал штаммы *Cmi* и *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Во второй кластер группировались штаммы *Cmn*

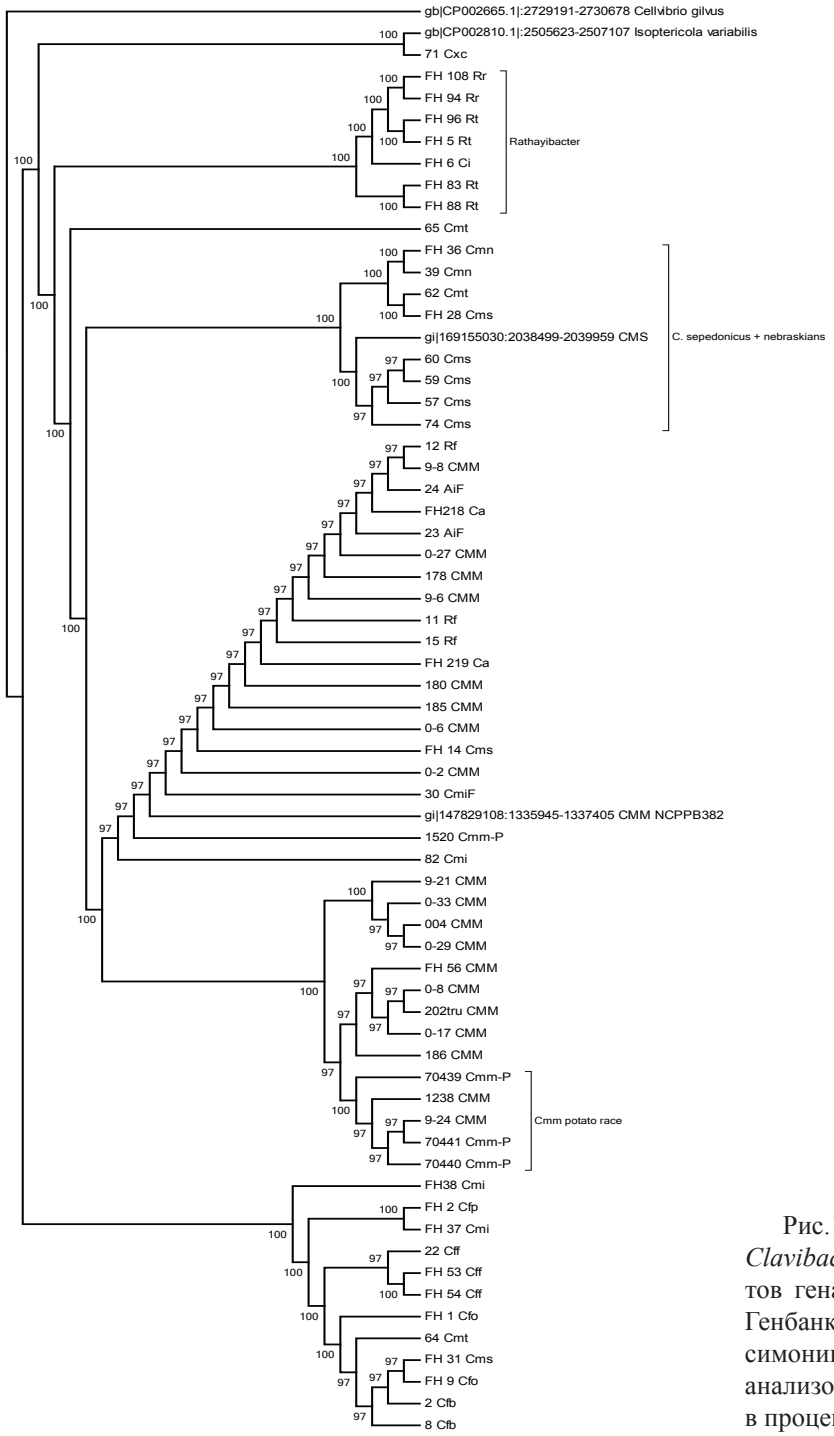


Рис.1. Дендрограмма сходства штаммов рода *Clavibacter* для последовательностей 66 фрагментов гена *atp* (62 штамма + 4 последовательности Генбанка), построенное методом наибольшей парсимонии. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями.

вместе с *Rathayibacter*. Штаммы *Cms* были обособлены в отдельный кластер. Также два штамма подвидов *sepedonicus* и *tessellarius* группировались совместно.

Число замен на сайт в среднем для каждого гена внутри и между каждого вида – подвида показаны в таблице 3. Все результаты основаны на попарном сравнении. Стандартная ошибка была вычислена методом бутсрепа при 500 повторениях и представлена в нижней колонке каждого показателя. Анализ был выполнен при использовании метода максимального правдоподобия в программе MEGA4 (Tamura et al., 2013).

Таким образом, на основании проведенного MLST анализа было показано, что штаммы подвида *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* дифференцируются от остальных подвидов по участкам генов *gpt, arsB, glnA, sos*. Генетическое разнообразие внутри и между подвидами *Cmm* и *Cms* показало, что ген транспорта полисахарида был наилучшим для оценки внутригрупповой изменчивости *Cmm*, а ген АТФ синтетазы был оптимальным выбором для изучения штаммов рода *Clavibacter* и подвида *Cms*. Ген *sos* наилучшим образом разделял *Cmm* и *Cms*. Штаммы *Cmm*, выделенные из картофеля, имели тенденцию дифференцироваться от остальных,

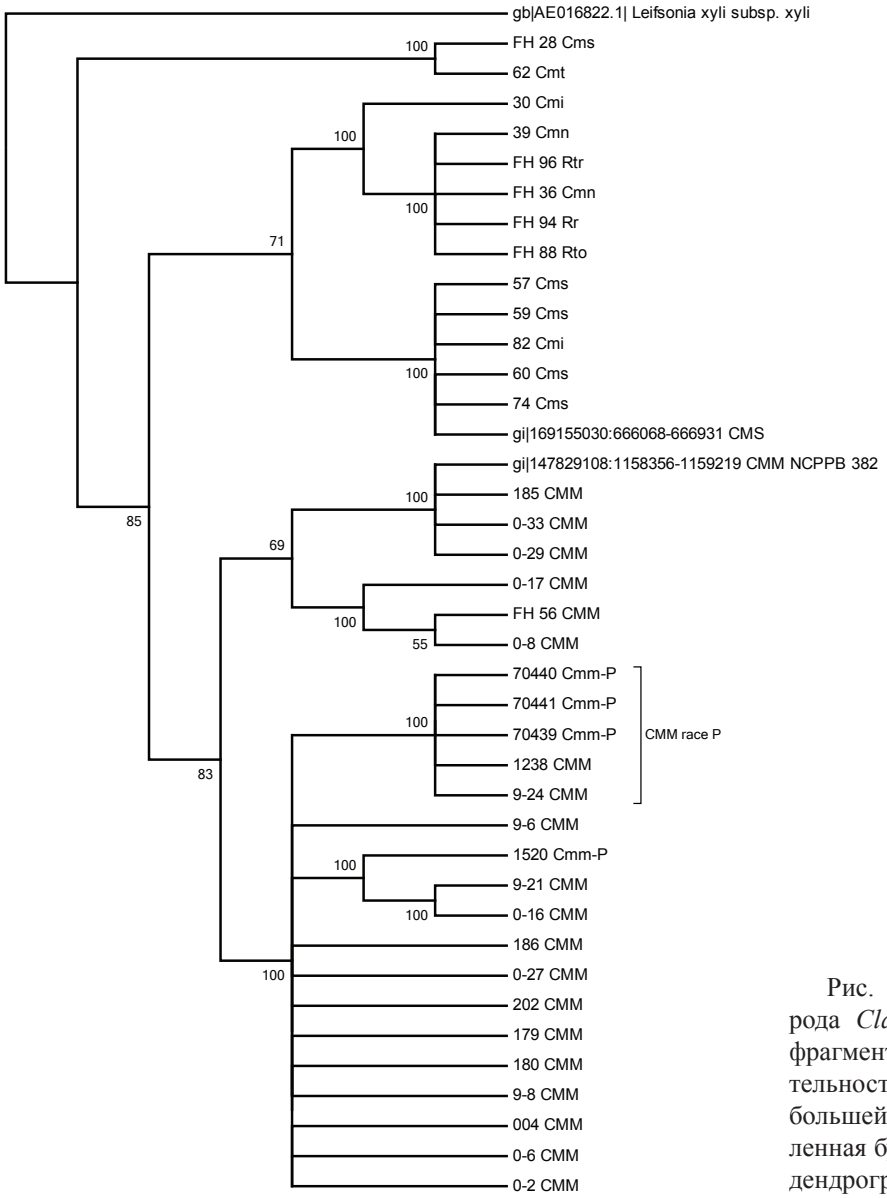


Рис. 2. Дендрограмма сходства штаммов рода *Clavibacter* для последовательностей 40 фрагментов гена *gpt* (37 штаммов + 3 последовательности Генбанка), построенное методом наибольшей парсимонии. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями.

Таблица 3.
Оценка генетического разнообразиия рода *Clavibacter*

Виды	***Генетическое разнобразие/стандартная ошибка для генов***							
	atp	***gpt***	***glnA***	***spt***	***rpoB***	***sos***	***recA***	***arsB***
Род *Clavibacter*	0.057* 0.011	0.029 0.004	0.010 0.003	0.037 0.006	0.006 0.002	0.036 0.007	0.027 0.013	0.021 0.006
C. michigansis subsp. Michiganensis	0.003 0.001	0.004 0.002	0.004 0.001	0.009* 0.003	0.002 0.001	-	0.002 0.002	0.004 0.002
C. michigansis subsp. Sepedonicus	0.036* 0.012	0.018 0.004	0.005 0.002	0.020 0.005	0.010 0.004	-	0.016 0.007	0.018 0.007
Между *Cms*:*Cmm*	0.033 0.008	0.030 0.007	0.007 0.003	0.022 0.006	0.009 0.004	0.039* 0.015	0.018 0.008	0.016 0.07

Обозначения: * – ген с максимальным разнообразием для сравнения.

относящихся к данному подвиду и выделенных из томатов, что свидетельствует об их генетических различиях. Полученные биохимические и генетические данные, а также результаты заражения растений-дифференциаторов, позволяют выделить у подвида *Cmm* картофельную расу.

Характеристика картофельной расы *Cmm*

Проведенное исследование позволило выделить штаммы бактерий *Cmm*, поражающих картофель, в самостоятельную расу на основании совокупности признаков. Способность картофельной расы поражать растения-хозяева двух видов в пределах одного семейства (при наличии гена патогенности) при выраженной узкой специализации остальных подвидов *Clavibacter michiganensis*, развивающихся только на одном виде растения, различия на уровне генома и по некоторым биохимическим свойствам позволяют заключить о проявлении генотипической изменчивости данного подвида патогена при расширении его экологической ниши. С учетом того, что нами были обнаружены генетические различия между двумя расами, можно предположить о реализации некоторого эволюционного сценария начальных этапов видообразования бактерий. Для дальнейшего исследования генетической дифференциации двух рас требуется применение комплекса методов, включающих ДНК:ДНК-гибридизацию.

Непосредственное практическое значение выделения картофельной расы заключается в том, что она способна поражать два вида растений Пасленовых, одно из которых (картофель) может служить потенциальным резерватором фитопатогена, и, тем самым, затруднять меры защиты и борьбы с бактериальным раком томатов.

Описание свойств. Штаммы были однородны по диагностическим (в соответствии с лабораторным руководством по идентификации бактерий, Shaad et al., 2001), морфологическим, физиологическим и биохимическим свойствам, и не отличались от свойств типового штамма *Cmm* NCPPB2979^{T}. Незначительные различия наблюдались в способности штаммов окислять сорбит.

Обнаружения. В 2004 г. на базе лаборатории бактериальнх болезней ВНИИФ из картофеля впервые были выделены желтопигментированные фитопатогенные бактерии, относившиеся к виду *Clavibacter michiganensis*. Первые изоляты были выделены из тканей клубня (возле покоящихся почек) картофеля, пораженного кольцевой гнилью и полученного из Калининградской области. В течение 2006-2014 года аналогичные бактерии выделялись неоднократно из вегетирующих растений картофеля с симптомами увядания и краевого некроза листьев и из клубней в Московской, Калининградской и Нижегородской областях.

Симптоматика расы. Проявление болезни начиналось с краевых хлорозов листовой пластинки, переходящих затем в некрозы, в результате чего листья засыхали и опадали. Симтомы болезни в поле были схожи с видом растений, находящихся на стадии созревания/уборки, отличие заключалось лишь в том, что данные симптомы наблюдаются в начале-середине июля. Все тестируемые штаммы вызывали хлороз, и затем, некроз на листьях табака при инфильтрации, с проявлением типичной реакции сверхчувствительности (HR). Симптомы некроза и увядания проявлялись после искусственного заражения томатов и картофеля, остальные растения сем. Пасленовых были устойчивы, только на некоторых растениях перца через две недели после инкубации появились слабые хлорозы на листьях. Заражение растений семейств Капустных, Злаковых и Бобовых показало их устойчивость к данному фитопатогену.

Диагностика молекулярно-генетическими методами. Специфичный ПЦР анализ с праймерами CMM5 и CMM6 показал однородную реакцию изолятов с ожидаемым для *Cmm* амплификационным продуктом длиной 614 н.п., соответсвующему гену патогенности (*pat1*). Дальнейший диагностический анализ штаммов с праймером PSA1 и PSAR, разработанным для подвида *Cms* показали отрицательную реакцию, а применение 14 дополнительных молекулярных STS-маркеров для *Cmm* и BOX-ПЦР анализа подтвердили, что изученные штаммы бактерии, выделенной из зараженных растений и клубней картофеля также принадлежат к подвиду *Cmm*. Дифференцирующей последовательностью картофельной расы является участок гена Глутамин-синтетазы – *glnA*, с праймерами Cmm_0003F/R.

Литература

Schaad NW, 1988. Initial identification of common genera. In: Schaad NW, ed. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul, USA: APS Press, 1-15.

Dreier J, Bermpohl A, Eichenlaub R, 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Phytopathology, 85(4):462-468

EPPO, 2011. EPPO Reporting Service. EPPO Reporting Service. Paris, France: EPPO. http://archives.eppo.org/EPPOReporting/Reporting_Archives.htm

EPPO, 2013. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm

European and Mediterranean Plant Protection Organization, 1992. Quarantine procedure No. 39. Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Test methods for tomato seeds. Bulletin OEPP, 22(2):219-224

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ОБЗОР ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ НАСЕКОМЫХ И КЛЕЩЕЙ

Н.Д. Коноплёв, С.Я. Попов, А.Н. Игнатов

РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева;
Центр «Биоинженерия» РАН

COMPARATIVE REVIEW OF INSECTS' AND MITES' SYMBIOTIC MICROORGANISMS' SPECIES DIVERSITY

N.D. Konoplev, S.Ya. Popov, A.N. Ignatov

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy;
Center "Bioengineering", Russian Academy of Sciences

Summary

Extensive information about the most significant bacterial symbionts and pathogens of insects and mites, as well as information about bacterial agents of plant diseases transmitted by them, was collected and systematized in the present paper. We provide data about their species diversity and classification, as well as relationships with hosts.

Насекомые, клещи и нематоды, являясь неотъемлемыми элементами биоценозов, при этом сами являются средой обитания широкого разнообразия бактерий, грибов и вирусов. Количество взаимодействий этих организмов с другими компонентами экосистем крайне велико, а их характер может варьировать в широких пределах. Изучение подобных связей позволяет составить более полное представление о закономерностях развития экосистем, понять причины происхождения тех или иных экологических ситуаций и, в отдельных случаях, найти способы воздействия на экосистемы. Цель написания данной статьи – сбор и систематизация имеющейся информации о бактериальных симбионтах и патогенах насекомых и клещей, а также возбудителях бактериальных болезней растений, переносимых ими.

Используемые определения:

Симбионт - организм, участник симбиоза, т.е. любого вида устойчивого биологического взаимодействия (мутуализма, комменсализма или паразитизма) [9].

Патоген - любой инфекционный агент, способный вызывать патологическое состояние другого живого существа.

Видовое разнообразие

Отобранная и систематизированная информация представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Видовое разнообразие бактериальных симбионтов и патогенов клещей и насекомых, а также переносимых ими бактериальных фитопатогенов

Организм	***Хозяин / переносчик***
Симбионты клещей	
Wolbachia spp. [2]	Паутинные клещи; хищные клещи
Cardinium spp. [5]	Паутинные клещи; хищные клещи
Внутриклеточные симбионты насекомых [6]	
Buchnera aphidicola	Тли
Carsonella ruddii	Листоблошки
Portiera aleyrodidarum	Белокрылки
Tremblaya princeps	Мучнистые червецы
Baumannia cicadellinicola	Цикадки
Sulcia muelleri	Цикадки
Nardonella spp.	Долгоносики
Sitophilus symbiont (SOPE)	Долгоносики
Wigglesworthia glossinidia	Мухи цеце

Организм	***Хозяин / переносчик***
Blochmannia floridanus	Муравьи-древоточцы
Serratia symbiotica	Тли
Regiella insecticola	Тли
Hamiltonella defensa	Тли
Fritschea spp.	Белокрылки
Sodalis glossinidius	Мухи цеце
Arsenophonus arthropodicus	Кровососки
Arsenophonus triatominarum	Хищнецы
Wolbachia spp.	Различные насекомые
Rickettsia spp.	Различные насекомые
Spiroplasma spp.	Различные насекомые
Cardinium spp.	Различные насекомые
Внеклеточные симбионты насекомых [6]	
Ishikawaella capsulata	Полушаровидные щитники
Rosenkranzia clausaccus	Древесные щитники
Rhodococcus rhodnii	Хищнецы
Burkholderia spp.	Клопы семейства Alydidae
Патогены клещей [3, 4]	
Bacillus thuringiensis	Паутинные клещи (*Tetranychidae*), пылевые клещи (*Pyroglyphidae*)
B. thuringiensis	*Tetranychus urticae* (*Tetranychidae*)
B. thuringiensis var. *israelensis*	*Dermatophagoides pteronyssinus* (*Pyroglyphidae*)
B. thuringiensis var. *tenebrionis*	*Metaseiulus occidentalis* (*Phytoseiidae*)
B. sphaericus	*Dermatophagoides pteronyssinus* (*Pyroglyphidae*)
Bacteroidetes	*Metaseiulus occidentalis* (*Phytoseiidae*)
Enterobacter	*Metaseiulus occidentalis* (*Phytoseiidae)*
Pseudomonas putida	*Tetranychus urticae* (*Tetranychidae*)
Acaricomes phytoseiuli	*Phytoseiulus persimilis* (*Phytoseiidae*)
Rickettsia sp.	*Metaseiulus occidentalis* (*Phytoseiidae*), *Vatacarus ipoides* (*Trombiculidae*)
Rickettsiella phytoseiuli	*Phytoseiulus persimilis* (*Phytoseiidae*)
Spiroplasma	*Tetranychus urticae* (*Tetranychidae*), *Dermanyssus gallinae* (*Dermanyssidae*)
Serratia marcescens	*Metaseiulus occidentalis* (*Phytoseiidae*)
Патогены насекомых [19]	
Acinetobacter calcoaceticus (*Neisseriaceae*)	*Coleoptera*
Aeromonas spp. (*Vibrionaceae*)	*Lepidoptera, Diptera*
Bacillus spp. (*Bacillaceae*)	*Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Blattodea, Hymenoptera*
Borrelia sp. (*Spirochaetaceae*)	*Diptera*
Clostridium spp. (*Bacillaceae*)	*Coleoptera, Lepidoptera*
Corynebacterium spp.	*Heteroptera, Homoptera*
Diplococcus spp. (*Neisseriaceae*)	*Coleoptera*
Enterobacter spp. (*Enterobacteriaceae*)	*Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera*
Escherichia freundii (*Enterobacteriaceae*)	*Coleoptera*
Hafnia sp. (*Enterobacteriaceae*)	*Lepidoptera*
Melissococcus pluton (*Streptococcaceae*)	*Hymenoptera*
Micrococcus spp. (*Micrococcaceae*)	*Coleoptera, Lepidoptera*
Proteus spp. (*Enterobacteriaceae*)	*Lepidoptera*

Организм	***Хозяин / переносчик***
Pseudomonas spp. (*Pseudomonadaceae*)	*Orthoptera, Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera, Lepidoptera*
Rickettsiella spp. (*Rickettsiaceae*)	*Coleoptera, Diptera*
Serratia spp. (*Enterobacteriaceae*)	*Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera*
Strategus anataeus (*Enterobacteriaceae*)	*Coleoptera*
Streptococcus spp. (*Streptococcacceae*)	*Hymenoptera, Lepidoptera, Coleoptera*
Переносимые фитопатогены [11]	
Candidatus Liberibacter (*Rhizobiaceae*)	Цитрусовые /Листоблошки
Dickeya dadantii (*Enterobacteriaceae*)	Картофель, маис / Гороховая тля
Erwinia amylovora (*Enterobacteriaceae*)	Яблоки, груши / Насекомые-опылители
Erwinia aphidicola (*Enterobacteriaceae*)	Бобы, горох / Гороховая тля
Erwinia tracheiphila (*Enterobacteriaceae*)	Огурец, дыня / Жуки на тыквенных
Pantoea stewartii (*Enterobacteriaceae*)	Маис / Земляные блошки, тли
Pectobacterium carotovorum (*Enterobacteriaceae*)	Картофель / Плодовые мушки
Pseudomonas syringae (*Pseudomonadacae*)	Бобы / Гороховая тля
Serratia marcescens (*Enterobacteriaceae*)	Тыква, кабачок / Клоп-ромбовик
Xylella fastidiosa (*Xanthomonadaceae*)	Цитрусовые, виноград / Цикадки, пенницы

Взаимоотношения с хозяевами (переносчиками)

Взаимоотношения симбионтов клещей с их хозяевами:

- *Wolbachia* spp., *Cardinium* spp.:
  - репродуктивные нарушения у хозяев: партеногенез, феминизация, смертность самцов и цитоплазматическая несовместимость (CI) [2, 5];

Типы взаимоотношений симбионтов насекомых с их хозяевами можно разделить на следующие группы:

- Облигатные мутуалисты:
  - заселяют бактериоциты, обеспечивают хозяина необходимыми веществами [15, 17]:
  - обеспечивают устойчивость к высоким температурам [1];
  - определяют трофическую специализацию хозяев [16];
  - повышают устойчивость к паразитоидам отряда жёсткокрылых [13][14];
- *Wolbachia* spp., *Spiroplasma* spp., *Cardinium* spp.
  - репродуктивные нарушения у хозяев: партеногенез, феминизация, смертность самцов и цитоплазматическая несовместимость (CI) [18];
- *Ishikawaella capsulata, Rosenkranzia clausaccus:*
  - необходимые симбионты: при искусственном уничтожении насекомые-хозяева демонстрируют высокую смертность [8];
- *Rhodococcus rhodnii:*
  - обеспечивает хозяина витаминами группы Б [12];
- *Burkholderia spp.:*
  - существенно улучшают рост насекомого-хозяина [7].

Общие черты бактериальных патогенов клещей и насекомых [10]:

- размножение: бактерии независимо растут в первичной полости тела хозяина;
- заражение: большинство бактерий должны быть проглочены, после чего они повреждают стенку кишечника и проникают в гемоцель;
- выживаемость: некоторые бактерии образуют споры, обладающие умеренной стойкостью.

Особенности нециркуляционных фитопатогенов [11]:

- не проникают в полость тела вектора;
- приобретаются с заражённых растений и инокулируются в незаражённые растения в течение секунд или минут;
- не требуют латентного периода;
- не реплицируются в векторе;
- специфично связаны:
  - у членистоногих - с эпикуликулой, покрывающей стилеты, либо с передней кишкой;
  - у нематод – с эпикутикулой, покрывающей ротовой аппарат;
- теряются при каждой линьке;
- сохраняются в векторе:
  - неперсистентные - менее нескольких часов;
  - полуперсистентные - от нескольких дней до нескольких лет.

Особенности циркуляционных фитопатогенов [11]:

- после проникновения в вектор сохраняются в нём на протяжении всей жизни;
- требуют времени для приобретения вектором (от часов до дней);
- имеют большой латентный период (от дня до недель);
- успешная передача требует интернализации проглоченного патогена, который активно перемещается через клеточные мембраны;
- проникают в гемоцель вектора и не теряются при линьке;
- при окончании интернализации связываются со слюнной системой вектора;
- делятся на два подтипа:
  - пропагативные – могут реплицироваться в растении и в векторе;
  - непропагативные – могут реплицироваться только в растении.

Заключение

В представленной статье собрана и систематизирована обширная информация о наиболее значимых представителях бактериальных симбионтов и патогенов насекомых и клещей, а также бактериальных возбудителей болезней растений, переносимых ими. Представлены сведения о их видовом разнообразии, классификации, и о взаимоотношениях с их хозяевами. При этом видовое разнообразие бактерий у насекомых оказалось намного более широким по сравнению с таковым у клещей. Тем не менее, присутствуют и бактерии, встречающиеся у обеих групп хозяев. Этот факт указывает на возможность обнаружения бактерий, связанных с насекомыми, но ранее не описанных у клещей. Данная тематика, возможно, станет следующим направлением исследований.

Литература

1. Barribeau S.M. Aphid reproductive investment in response to mortality risks. / S. M. Barribeau, D. Sok, N. M. Gerardo // BMC Evol. Biol. – 2010. – T. 10 – 251c.
2. Breeuwer J.A. Wolbachia: intracellular manipulators of mite reproduction. / J. A. Breeuwer, G. Jacobs // Exp. Appl. Acarol. – 1996. – T. 20 – № 8 – 421–34c.
3. Geest L.P. van der Diseases of mites. / L. P. van der Geest, S. L. Elliot, J. a Breeuwer, E. a Beerling – , 2000.
4. Geest L.S. IPM Potentials of Microbial Pathogens and Diseases of Mites Integrated Management of Plant Pests and Diseases / / под ред. A. Ciancio, K.G. Mukerji. Springer Netherlands, 2010. – 249–309c.
5. Gotoh T. Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. / T. Gotoh, H. Noda, S. Ito // Heredity (Edinb). – 2007. – T. 98 – № 1 – 13–20c.
6. Kikuchi Y. Endosymbiotic Bacteria in Insects: Their Diversity and Culturability / Y. Kikuchi // Microbes Environ. – 2009. – T. 24 – № 3 – 195–204c.
7. Kikuchi Y. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. / Y. Kikuchi, T. Hosokawa, T. Fukatsu // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – T. 73 – № 13 – 4308–16c.
8. Kikuchi Y. Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. / Y. Kikuchi, T. Hosokawa, N. Nikoh, X.-Y. Meng, Y. Kamagata, T. Fukatsu // BMC Biol. – 2009. – T. 7 – 2c.
9. Martin B.D. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology / B. D. Martin, E. Schwab // Int. J. Biol. – 2012. – T. 5 – № 1 – 32–45c.
10. Mudita I.W. Entomopathogens as natural enemies and biological control agents // – 2006. – 36c.
11. Nadarasah G. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. / G. Nadarasah, J. Stavrinides // FEMS Microbiol. Rev. – 2011. – T. 35 – № 3 – 555–75c.
12. Nogge G. Sterility in tsetse flies (Glossina morsitans Westwood) caused by loss of symbionts. / G. Nogge // Experientia – 1976. – T. 32 – № 8 – 995–6c.
13. Oliver K.M. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. / K. M. Oliver, N. A. Moran, M. S. Hunter // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2005. – T. 102 – № 36 – 12795–800c.
14. Scarborough C.L. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. / C. L. Scarborough, J. Ferrari, H. C. J. Godfray // Science – 2005. – T. 310 – № 5755 – 1781c.
15. Spaulding A.W. Phylogenetic characterization and molecular evolution of bacterial endosymbionts in psyllids (Hemiptera: Sternorrhyncha). / A. W. Spaulding, C. D. von Dohlen // Mol. Biol. Evol. – 1998. – T. 15 – № 11 – 1506–13c.
16. Tsuchida T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. / T. Tsuchida, R. Koga, T. Fukatsu // Science – 2004. – T. 303 – № 5666 – 1989c.
17. Wilson A.C.C. A dual-genome microarray for the pea aphid, Acyrthosiphon pisum, and its obligate bacterial symbiont, Buchnera aphidicola. / A. C. C. Wilson, H. E. Dunbar, G. K. Davis, W. B. Hunter, D. L. Stern, N. A. Moran // BMC Genomics – 2006. – T. 7 – № 1 – 50c.
18. Zchori-Fein E. Distribution of the bacterial symbiont Cardinium in arthropods. / E. Zchori-Fein, S. J. Perlman // Mol. Ecol. – 2004. – T. 13 – № 7 – 2009–16c.
19. Ecological Database of the Worlds Insect Pathogens (EDWIP) / // ICTUpdate OR - CTA – 2003.

АНАЛИЗ ПОЛНОГО ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИОЗА ЗЛАКОВ, КАПУСТНЫХ И СЛОЖНОЦВЕТНЫХ КУЛЬТУР ШТАММА 3004 *XANTHOMONAS ARBORICOLA*

Е.И. Кырова[1, 2], С.В. Виноградова[1, 2], В.А. Политыко[3], А.Н. Игнатов[1, 2, 3]

[1] Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, , Москва;
[2]Российский Университет Дружбы Народов, Москва;
[3]Всероссийский НИИ фитопатологии, Б. Вяземы, Московская область

ANALYSIS COMPLETE GENOME OF THE PATHOGEN OF BACTERIOSIS CEREALS, CABBAGE AND ASTERACEAE CULTURE OF STRAIN 3004 *XANTHOMONAS ARBORICOLA*

E.I. Kyrova[1, 2], S.V. Vinogradova[2,1], V.A. Polityko[3], A.N. Ignatov[1,2,3]

[1]Centre "Bioengineering" of Russian Academy of Sciences, Moscow;
[2]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;
[3]Russian Research Institute for Phytopathology, B.Vyazyomy, Moscow Region

Summary

Xanthomonas arboricola str. 3004 is a pathogen of barley and also can infects others species. We sequenced the genome of X. arboricola str. 3004. to understand molecular mechanisms of pathogenesis and we determinate 4,7 Mb draft genome sequence.

Xanthomonas является родом фитопатогенных бактерий, включающим не менее 27 различных видов, характеризующихся разной вирулентностью и специфичностью к поражаемым растениям (Hirokazu, 2006; Parkinson et al., 2007). Иногда бактерии заражают атипичные растения-хозяева, например, штаммы *X. arboricola* были выделены из больных растений семейств Asteraceae, Brassicaceae, Poaceae, и Solanaceae (Игнатов и др. 2010). Коллекцию штаммов *X. arboricola* изучали методом MLST, в соответствии с процедурой, описанной Young и соавт. (2008) и Ignatov с соавт. (2007), включая 7 консервативных генов: *gyrB, dnaK, nrdB и GyrB, DnaK, nrdB и PurA*. Только патогенные штаммы были использованы в исследовании. В результате генетического анализа мы показали, что штаммы, идентифицированные как *X. arboricola* по ряду биохимических и генетических тестов, имеют аллели генов *gyrB, dnaK, nrdB и GyrB, DnaK, nrdB и PurA* более похожие на соответствующие аллели штаммов *X. campestris, X. euvesicatoria, X. oryzae*. Мы предположили, что горизонтальный перенос генов между видами *Xanthomonas* мог улучшить адаптацию бактерий к новому растению-хозяину. Для проверки этой гипотезы мы определили полную последовательности геном штамма *Xanthomonas arboricola* 3004.

Xanthomonas arboricola 3004 был выделен из ячменя. Геном *X. arboricola* 3004 был получен с использованием метода пиросеквенирования на платформе Roche GS FLX. Секвенирование проводили с использованием стратегии «шотган» (shotgun sequencing) целого генома, с двух концов библиотеки генома. Данные «шот-гана» и парные чтения были собраны в 132 фрагментов длиной от 98173 до 528 п.о. при помощи Newbler Assembler 2.8. Общий размер собранного генома составил 4765897 п.о., содержание G/C - 65,3%. Мы аннотировали собранный геном с помощью сервера RAST (Aziz et al., 2008; http://rast.nmpdr.org/) и обнаружили 4113 кодирующих последовательностей и 55 РНК, представляющих 450 «подсистем». Наиболее близким организмом на основе нуклеотидного сходства, присутвующим в базе данных RAST является *Xanthomonas axonopodis py. citri* str. 306. Мы провели поиск BLASTN против генов *X. arboricola*, которые обычно используются в качестве MLST маркеров, и которые присутствуют в базе данных GenBank. Гены *gyrB, dnaK, nrdB и GyrB, DnaK, nrdB и PurA* были обнаружены и имели 99% идентичность с генами других штаммов того же вида. Мы обнаружить только три из 11 обязательных (консервативных) генов системы секреции 3-го типа (T3SS): *hrpA, hrpX, hrpM*; Также мы не обнаружили гены, кодирующие белки-эффекторы T3SS, которые присутствуют во всех других известных геномах *X. arboricola*. ПЦР- амплификация на гены эффекторов T3SS не привела к положительному результату. Также мы обнаружили не полную последовательность фага наиболее близкую бактериофагу *Xantho XP10* (*X.oryzae*).

Последовательность генома *X. arboricola* 3004 была депонирована в GenBank. BioProject: 230405, submission ID SUB402092, accession number AZQY00000000.

Литература

Hirokazu O.. Phylogenetic Analysis of Genus Xanthomonas. // Plant Protection. -2006.-V. 60 (9). -P. 448-451

Ignatov A., Sechler A., Schuenzel E.L., Agarkova I., Oliver B.,Vidaver A. K., Schaad N.W. Genetic diversity in populations of Xanthomonas campestris pv. campestris in cruciferous weeds in central coastal California. Phytopathology. 2007; v.97: 803-812.

Parkinson N., Aritua V., Heeney J., Cowie C., Bew J.D., Stead D.. Phylogenetic analysis of Xanthomonas species by comparison of partial gyrase B gene sequences.// Int. J. of Syst. and Evol. Microbiology. -2007. –V. 57. –P. 2881-2887

Ramy K Aziz, Daniela Bartels, Aaron A Best, Matthew DeJongh, Terrence Disz, Robert A Edwards, Kevin Formsma, Svetlana Gerdes, Elizabeth M Glass, Michael Kubal, Folker Meyer, Gary J Olsen, Robert Olson, Andrei L Osterman, Ross A Overbeek, Leslie K McNeil, Daniel Paarmann, Tobias Paczian, Bruce Parrello, Gordon D Pusch, Claudia Reich, Rick Stevens, Olga Vassieva, Veronika Vonstein, Andreas Wilke, and Olga Zagnitko. The RAST server: Rapid annotation using subsystem technology. // BMC Genomics. 2008; 9: 75.

Young J.M., Park D.C., Shearman H.M., Fargier E. A multi-locus sequence analysis of the genus Xanthomonas. // Syst. Appl. Microbiol. -2008. –V. 31 (5). –P. 366-377

Игнатов А.Н., Пунина Н.В., Матвеева Е.В., Корнев К.П., Пехтерева Э.Ш., Политыко В.А.. Xanthomonas arboricola - бактериальный патоген поражающий различные культуры в России. Защита и карантин растений. 2010. №10, pp 41-43.

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОДГОТОВКИ И ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ МЕЖЛАБОРАТОРНЫХ СЛИЧИТЕЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Е.С. Мазурин, М.Г. Кабдулова, И.О. Камаев, М.Б. Копина, Г.Н. Мугол Хан

ФГБУ «ВНИИКР», Россия, Московская область, п. Быково

e-mail: zarauh@mail.ru

INVESTIGATION OF THE CONDITIONS OF PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES COLLATION INTERLABORATORY TESTS TO DETECT AND IDENTIFY THE CAUSATIVE AGENT OF BACTERIAL BROWN ROT OF POTATO *RALSTONIA SOLANACEARUM*

E.S. Mazurin, M.G. Kabdulova, I.O. Kamala, M.B. Kopin, G.N. Mugol Khan

FGBI “VNIIKR”, Russia, Moscow region, Bikovo

Summary

Control samples of Ralstonia solanacearum for inter-lab tests must be dried under vacuum at 600C potato extract the contents of the cells of the phytopathogen at a concentration of 103 to 106 in 100 l of extract, possession of which is carried out at a temperature equal to -20° C. It is permitted to store the samples at + 28°C for 30 days.

Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля – *Ralstonia solanacearum* (Smith,Yabuuchi et al., 1896) относится к числу карантинных вредных организмов для России. Его интродукция происходит с зараженным семенным и продовольственным картофелем, что требует применения надежных методов диагностики патогена, например ПЦВ «в реальном времени» (ПЦР-РВ). Владение данными методами в диагностических центрах системы карантина растений может быть проверено в ходе межлабораторных сличительных испытаний (МСИ) с использованием контрольных образцов. К настоящему времени не существует требований или стандартов, в которых были бы перечислены условия по подготовке и хранению контрольных образцов *R. solanacearum*, для проведения МСИ в специализированных лабораториях. Кроме этого контрольные образцы должны быть стабильными, обеспечивать сохранение свойств матрицы ДНК и исследуемого объекта в течение времени, необходимого для доставки проб и проведения исследований. Все это и определило цель настоящих исследований.

В результате проведенных исследований с помощью метода прямого посева было показано, что вакуумная сушка (при 60°С) лишает возбудителя бурой гнили картофеля жизнеспособности, сохраняя при этом ДНК патогена. Исследуемые образцы, полученные из суспензии после вакуумной сушки и без неё (контроль), показали положительный результат при проведении ПЦР-РВ с зондом, специфичным для *R. solanacearum*. Было установлено, значение порогового цикла увеличивается с уменьшением содержания КОЕ, при этом у образцов без вакуумной сушки регистрируются более ранние значения данного показателя, что,

однако, не оказывает существенного влияния на результаты диагностики патогена.

Внесение экстракта картофеля к образцам после вакуумной сушки и без неё (контроль) приводило к увеличению значений пороговых циклов при постановке ПЦР-РВ в обоих случаях, однако его влияние не значительно сказывалось на результаты диагностики исследуемого патогена данным методом.

Оценку влияния факторов содержания, температуры и времени хранения на чувствительность диагностики возбудителя бурой гнили картофеля методом ПЦР-РВ проводили с образцами после вакуумной сушки и без неё. Было выявлено, что данный метод позволял обнаружить ДНК *R. solanacearum* при концентрации от 10^6 до 10^2 клеток возбудителя в 100 мкл экстракта картофеля. Хранение образцов при температуре равной +4°С приводило к тому, что метод ПЦР «в реальном времени» с исследуемыми образцами после вакуумной сушки позволял обнаружить ДНК возбудителя в концентрации не менее 10^3 КОЕ *R. solanacearum* в 100 мкл картофельного экстракта, у образцов без вакуумной сушки – в концентрации не менее 10^2. По-видимому, вакуумная сушка влияет на количество целевой ДНК патогена в пробе, однако различия в пороговых циклах не выраженно зависели от срока хранения и концентрации клеток патогена в суспензии.

Метод ПЦР «в реальном времени» образцов при температуре хранения +28°С позволял идентифицировать ДНК возбудителя *R. solanacearum* во всех исследуемых суспензиях с концентрациями клеток от 10^3 до 10^6 в картофельном экстракте спустя 28 дней. В отдельном эксперименте было показано, что при хранении контрольных образцов *Ralstonia solanacearum* для МСИ при температуре -20°С в течение 6 месяцев наблюдалось снижение чувствительности ПЦР-РВ на 2.0 цикла Ct.

Таким образом, контрольные образцы *Ralstonia solanacearum* для МСИ, предназначенные для транспортировки, должны представлять собой высушенный под вакуумом при 60^0С картофельный экстракт с содержанием клеток данного фитопатогена в концентрации от 10^3 до 10^6 в 100 мкл экстракта, хранение которых осуществляют при температуре равной -20°С. Допускается хранение образцов при температуре $+28^0$С не более 30 дней.

Литература

1. Диагностика бактериальной бурой гнили картофеля и меры борьбы с ней / Методические указания // ВНИИ фитопатологии РАСХН. – Москва, 1994. 39 с.
2. СТО ВНИИКР 4.009−2011 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации».

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ В СОЧЕТАНИИ С ПРЕПАРАТОМ СЕРЕБРА «ЗЕРОКС®» ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЯДА БАКТЕРИОЗОВ РАСТЕНИЙ

М.В. Ходыкина[3,5], В.А. Политыко[3], Е.И. Кырова[5], Ю.А. Крутяков[2,4], П.М. Жеребин[2], А.Н. Игнатов[1,3,5]

email: an.ignatov@gmail.com

[1] Центр «Биоинженерия» РАН, Москва; [2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва; [3] ГНУ ВНИИ фитопатологии ФАНО России; [4] Группа компаний «АгроХимПром», Барнаул; [5]Российский университет дружбы народов

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ANTIBIOTICS AND SILVER COMPAUND “ZEROKS®” AGAINST SOME PLANT PATHOGENIC BACTERIA

M.V. Khodykina[3,5], V.A. Polityko[3], E.I. Kyrova[5], Y. Krutyakov[2,4], P.M. Zherebin[2], A.N. Ignatov[1,3,5]

[1] Centre “Bioengineering” Sciences, Moscow; [2] Moscow State University, Moscow; [3] State Research Institute of Phytopathology Fano Russia; [4] Group “AgroChimProm”, Barnaul; [5] Russian University of Peoples’ Friendship

Summary

The synergy effects of antibiotics and “Zeroks®” against strains that are resistant to antibiotics was found. It is noted that the strain # 9 Agrobacterium rhizogenes, causing root mat disease of cucumber, was highly resistant to all antibiotics except highly toxic polymyxin, and chloramphenicol, and may carry genes for universal antibiotic resistance. This pathogen is released from fresh fruit cucumber grown on infected plants, and can serve as a donor of antibiotic resistance to human pathogens living in the digestive tract.

Появление устойчивости бактерий к антибиотикам является одной из важнейших проблем медицины и защиты растений. Специалистами Химического и Биологического факультетов МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке Группы Компаний «АгроХимПром» создаются и изучаются препараты на основе коллоидного серебра, поверхностно модифицированного различными биологически активными ПАВ и полимерами, пригодные для использования в сельском хозяйстве в эффективных контактных фунгицидов и бактерицидов. Одним из препаратов, разработанных коллективом МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке ГК «АгроХимПром» является контактный бактерицид и фунгицид «Зерокс®» (ВКР), действующим началом которого выступают частицы наноразмерного серебра, специальным образом модифицированные биоразлагаемым поверхностно-активным веществом. В соответствии с программой регистрационных испытаний пестицида «Зерокс®» (ВКР), утвержденной МСХ РФ, в 2014 г. проводятся регистрационные полевые испытания препарата на различных культурах. Целью работы была оценка взаимодействия «Зерокс®» с бактерицидными веществами широкого круга активности.

Оценку устойчивости бактерий к антибиотикам проводили методом дисков. Использовали питательную среду NBY следующего состава среды, г/л воды: питательный бульон – 8; дрожжевой экстракт – 2; калий фосфорнокислый двухзамещенный – 2; калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,5; агар – 17-20. После автоклавирования добавляли 50 мл 10% глюкозы и 1мл 1М сернокислого магния. Бактерии выращивали в течение 24 часов в жидкой среде LB, состав (г/л): дрожжевой экстракт – 5, триптон – 10, хлористый натрий – 5. Затем производили посев бактерий при помощи шпателя Дригальского. Чувствительность проверяли методом дисков, содержащих антибиотики. Наличие зон с отсутствием роста указывает на бактерицидный эффект. Результат регистрировали на 3-5 день. Опыт был поставлен в двух повторностях.

Штаммы, использованные в работе, были получены из коллекции ВНИИФ. Они включали:

#1368 *Xanthomonas campestris* (капуста)
#At-2 *Agrobacterium tumefaciens* (роза), 2001
#Ca 5+ *Agrobacterium tumefaciens* (роза), 2013
#1944 *Pectobacterium carotovorum* (картофель)
#33 *Dickeya dianthicola* (картофель)
#9 *Agrobacterium rhizogenes* (огурец)
#S-38 *Pseudomonas syringae* (подсолнечник)
1209 *Clavibacter michiganensis* (картофель)

Протестирован набор антибиотиков, представляющих разные классы активности: 1) пенициллин, 2) цефалоспорин, 3) ванкомицин, 4) никкомицин, 5) нистатин, 6) хлорамфеникол, 7) полимиксин, 8) стрептомицин, 9) эритромицин, 10) тетрациклин, 11) Фитолавин-300, 12) Фитоплазмин.

Пенициллин действует по типу нарушения синтеза клеточной стенки посредством ингибирования синтеза пептидогликана, ванкомицин стимулирует образования димеров и их переноса к растущим цепям пептидогликана, никкомицин нарушает синтез хитина и подобных веществ, нистатин вызывает нарушение функционирования мембран - нарушение целостности мембран, стимулирует образование ионных каналов, связывание ионов в комплексы, растворимые в липидах, и прерывает их транспортировку. Тетрациклин и стрептомицин нарушают синтез белка: ингибируют активацию и перенос аминокислот, нарушают функции рибосом. Хлорамфеникол угнетает синтез бактериальных белков, а в больших дозах вызывает бактерицидный эффект. Левомицетин обладает широким спектром действия. Нистатин – из группы химических веществ, способных разрушать мембрану клеток микроскопических грибков, вызывая их гибель.

Результаты

По возрастанию активности антибиотики были ранжированы в следующем порядке: Нистанин, Ванкомицин, Налидиксовая к-та, Эритромицин, Бензилпенициллин, Полимиксин, Канамицин, Ампицилин, Стрептомицин, Левомицетин, Гентамицин, Тетрациклин.

Наибольшую восприимчивость ко всем антибиотикам показал штамм 1209 *Clavibacter michiganensis*, наименьшую – штамм #9 *A. rhizogenes.* Все штаммы показали специфичную устойчивость хотя бы к одному антибиотику. Даже наиболее восприимчивый штамм 1209 *Clavibacter michiganensis* был устойчив к налидиксовой к-те. Все штаммы, кроме #S-38 *Pseudomonas syringae,* показали восприимчивость к «Зерокс®» в применявшейся дозе.

Выявлен эффект синергизма действия антибиотиков и препарата «Зерокс®» в отношении штаммов, устойчивых к действию антибиотиков. Вместе с тем, практически не отмечено усиления действия эффективных антибиотиков при добавлении препарата серебра.

Отмечено, что штамм #9 *Agrobacterium rhizogenes*, вызывающий бородатость огурца, был высокоустойчив ко всем антибиотикам, кроме высокотоксичных и малоспецифичных полимиксина и левомицетина, и может быть носителем генов универсальной устойчивости к антибиотикам. Данный патоген выделяется из свежих плодов огурца, выросших на пораженных растениях, и может послужить донором устойчивости к антибиотикам для патогенных для человека микроорганизмов, обитающих в желудочно-кишечном тракте.

Антибиотик, концентрация, мг на диск		1368 X. campestris		At-2 A. tumefaciens		Ca 5+ A. tumefaciens		1944 P. carotovorum		#33 D. dianthicola		#9 A. rhizo-genes		S-38 P. syringae		1209 C. michigan-ensis	
	Среднее	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диски+Ag 3мл/87мл.
Налидиксовая к-та, 1	12,86	1	23,5	30	12,8	0	10	35	19	33	19	0	1	0	10	0	11,5
Полимиксин, 2	16,77	15	30	24	25	1	13,5	20	17,3	22	15	13	13	17	13	12,3	17,25
Ванкомицин, 3	12,55	23	13,3	1	13,5	1	12,5	1	20,75	21,5	12	0	8	0	13,3	25	35
Бензилпенициллин, 4	16,52	19,75	12,2	1	12,75	0	10	35	23,25	24	23,5	0	10,5	0	12,3	40	40
Левомицетин, 5	20,25	21,25	18,75	18,3	16	15,8	25	25	22,3	24,8	16,75	15	13	0	12	40	40
Эритромицин, 6	14,55	1	30	20	12,5	26	12	1	1	10,25	10	0	1	13	15	40	40
Ампицилин, 7	19,66	30	16	20	16,75	1	10	34,75	30	31	30,8	0	1	0	13,3	40	40
Канамицин, 8	19,50	0	28,5	28	15	1	12	19	22,5	25	19,7	0	10	26,3	35	40	30
Гентамицин, 9	21,98	9,75	36	20	24	23	18,5	17	20	21	20	0	12,5	25	35	40	30
Тетрациклин, 10	24,84	24,75	36	35	28,5	40	17,5	30	22,5	19,25	12	1	1	20	30	40	40
Стрептомицин, 11	19,69	1	30	18,7	16	15	19,75	17	21,75	20	23,3	0	10	33,5	35	40	14
Нистанин, 12	7,72	0	12	0	10,3	0	11	0	1	14	10,75	0	0	0	11	40	13,5
Фитолавин, 13	4,51	0	1	1	10	0	1	1	12,2	7,5	14	0	0	0	1	10	13,5
Фитоплазмин,14	2,13	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	10	20
Контроль	8,26	0	5	0	10	0	5	0	1	0	1	0	8	0	0	0	13
Среднее	15,25	10,46	20,59	15,50	15,29	8,84	12,41	16,84	16,75	19,52	16,20	2,07	5,79	9,63	16,85	29,81	27,48
НСР95	-	1,35	1,77	2,43	2,95	2,98	3,54	4,02	3,35	2,97	3,46	1,08	1,57	2,40	1,98	3,03	1,90

0 – нет зоны свободной от бактерий вокруг диска

1 – бактериостатическое действие (зона до 5 мм есть, но в ней растут отдельные колонии)

7-40 – диаметр (мм) зоны свободной от бактерий.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В КАЧЕСТВЕ ФАКТОРА ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ РИСА К ПИРИКУЛЯРИИ

П.И. Костылев[1], Е.В. Краснова[1], А.А. Редькин[1], Е.В. Дубина[2], Ж.М. Мухина[2]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт зерновых культур им. И.Г. Калиненко РАСХН, Зерноград, Россия, e-mail: p-kostylev@mail.ru

[2] ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, Россия, e-mail: agroplazma@gmail.com

GENE TRANSFER AS FACTOR OF INDUCED RESISTANCE OF RICE PLANTS TO PYRICULARIA PATHOGENS

P.I. Kostylev[1], E.V. Krasnova[1], A.A. Redkin[1], E.V. Dubina[2], Zh.M. Mukhina[2]

[1] Russian Research Institute of cereal crops by I.G. Kalinenko, Zernograd, Russia, e-mail: p-kostylev@mail.ru;

[2] Russian Research Institute of rice, Krasnodar, Russia, e-mail: agroplazma@gmail.com

Summary

Molecular markers linked to resistance genes of rice to Magnaporthe grisea can provide a way to faster plant breeding. We have done gene pyramiding in one genotype using markers of five different resistance genes.

Рис выращивается на площади более 157 млн. га в 111 странах мира и является одной из основных возделываемых культур. Болезни риса могут нанести значительный ущерб урожаю. К наиболее опасным заболеваниям риса относится пирикуляриоз (гриб *Magnaporthe grisea*), который вызывает потери урожая в обычные годы от 5 до 20%, а в годы эпифитотийного развития болезни – до 100%. Поэтому наиболее эффективным способом защиты риса без фунгицидов является выращивание устойчивых к пирикуляриозу сортов. Для получения устойчивых сортов риса необходимо объединение в одном генотипе нескольких генов со своим вкладом. Линии, обладающие комбинацией из 3-5 генов устойчивости, показывают увеличение и расширение спектра устойчивости к пирикуляриозу, по сравнению с линиями, имеющими отдельные гены. Такие формы с различными комбинациями генов устойчивости полезны для создания сортов с длительной устойчивостью к патогену.

Работа классическими методами селекции в данном направлении довольно затруднительна, так как сложно определить присутствие желаемой аллели определенного гена в растениях с несколькими генами устойчивости. Идентификация молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами, обеспечивающими устойчивость растений к патогену, облегчает селекционную работу в данном направлении. Ряд генов устойчивости к пирикуляриозу были помечены молекулярными маркерами. Поэтому актуальным является создание с помощью молекулярного маркирования урожайных сортов риса, резистентных к болезням.

Целью работы является создание линий риса с 5-ю генами устойчивости к пирикуляриозу Pi l, Pi 2, Pi 33, Pi ta, Pi b с помощью метода молекулярного маркирования.

В качестве доноров переносимых генов устойчивости (материнская форма) использовали линии зарубежной селекции C101-A-51 (донор гена *Pi-2*), C101-Lac (*Pi-1, Pi-33*), IR-36 (донор гена *Pi-ta)*, BL-1 (донор гена *Pi-b*).

В работе использованы микросателлитные маркеры на гены устойчивости к пирикуляриозу. Визуализацию результатов проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофореза. Для анализа ДНК использовали отрезки листьев [1, 2].

На первом этапе работы в 2005 году были получены 6 гибридов от скрещивания сортов Боярин и Вираж с тремя донорами устойчивости к пирикуляриозу C104-Lac, C101-A-51, C101-Lac, несущими гены Pi-l, Pi-2, Pi-1+33. Доноры были очень позднеспелыми, зацветали в сентябре и не вызревали в условиях Ростовской области. Первое поколение характеризовалось большой степенью стерильности (90-95%) и позднеспелостью, что свидетельствует о значительных генетических различиях между родителями. Во втором поколении получено от 300 до 700 растений в каждой комбинации. Среди огромного спектра расщепления гибридов по многим признакам удалось отобрать по 22-30 растений, совмещающих в себе скороспелость, низкорослость, неосыпаемость и фертильность колосков. После анализа 158 лучших линий во ВНИИ риса выделены

гомозиготные формы по доминантным аллелям устойчивости.

В результате проведенной работы было установлено отсутствие ожидаемого моногенного расщепления в соотношении 1:2:1. Это связано с тем, что гены Pi сцеплены с генами, детерминирующими нежелательные признаки, например осыпаемость колосков (sh), позднеспелость (ef), гибридная стерильность (S), остистость (An), высокорослость (Bg). Если эти гены рецессивны, то гомозиготы по ним, и соответственно по Pi, не были отобраны для анализа ДНК. Разрыв сцепления между ними произошел в результате кроссинговера, частота которого была значительно меньше, чем менделевская рекомбинация [3].

В последующие годы во всех комбинациях скрещивания расщепление по маркерам каждого гена не укладывалось в рамки менделеевского соотношения. По-видимому, такие отклонения связаны с влиянием отбора, так как для анализа отбирали лучшие в селекционном отношении растения с безостыми фертильными колосками и хорошо вызревшим зерном.

На втором этапе работы после скрещивания между собой гибридов Pi 1+33 x Боярин и Pi 2 x Боярин удалось получить формы с тремя пирамидированными генами одновременно: Pi-l, Pi-2, Pi-33 в гомозиготном состоянии. Эти линии уже находятся в контрольном питомнике для испытания на урожайность.

На третьем этапе работы, когда появились доноры генов Pi-ta (IR58 x Кубань 3) и Pi-b (Аметист x Мороберекан), стала проводиться гибридизация с ними для объединения 5 генов. Скрещивания были двух типов: [(Pi1+2+33) x Pi ta] x Pi b и Pi1+2+33 x (Pi ta x Pi b). Гибриды, показавшие гетерозиготность по всем пяти аллелям, были высеяны на F_2 в 2012 году в ФГУП «Пролетарское», где с 93-х лучших гибридных растений отобрали листья для анализа ДНК. Во ВНИИ риса (г. Краснодар) проанализировали растения с использованием одного маркера по каждому гену.

По результатам анализа удалось выделить два образца риса, которые были гомозиготными по всем пяти доминантным аллелям. Теоретическая вероятность появления одного гомозиготного растения по пяти доминантным генам составляет 1/1024, в нашей работе оно обнаружено с частотой 1/63. По-видимому, для анализа отобрали повышенное количество гомозиготных форм по критерию низкой стерильности. Эти гибриды были выращены в селекционном питомнике 2013 года на делянках площадью 1 м^2 под номерами 1225/13 и 1396/13. Повторный анализ листьев этих образцов (№ пробы 2 и 19) подтвердил результаты прошлого года, т.е. гомозиготность по доминантным аллелям всех пяти локусов.

На рисунке 1 показаны электрофореграммы двух образцов 1225/13 и 1396/13 с номерами проб №2 и №19, которые показывают наличие пяти генов Pi.

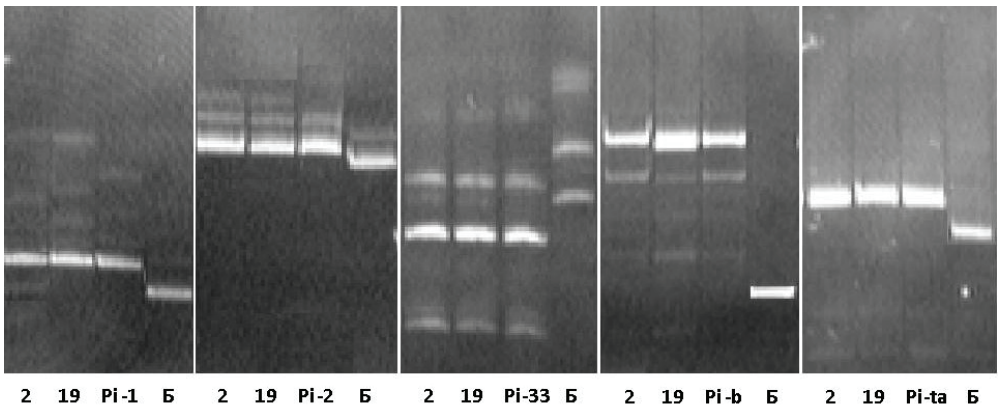


Рис. 1. Фореграммы образцов риса по маркерам пяти генов Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-b, Pi-ta. Образцы 2 и 19 несут доминантные аллели в 5 локусах в гомозиготном состоянии, сорт Боярин (Б) – рецессивные

На рисунках 2-3 показаны метелки этих линий. Линия 1225/13 низкорослая (80 см), с небольшой метелкой (17 см), скороспелая, созревает за 110 дней.

Вторая линия 1396/13 – более высокорослая (100 см), с крупной длинной метелкой (22 см), среднеспелая, период до созревания 120 дней.

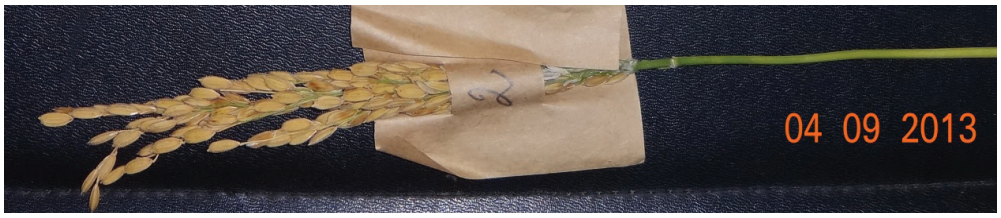


Рис. 2. Метелка скороспелой линии 1225/13

Рис. 3. Метелка среднеспелой линии 1396/13

Результаты анализа позволили направить данные линии в сеялочный посев селекционного питомника 2014 года на делянки площадью 20 м^2 для испытания на урожайность, качество и устойчивость к пирикуляриозу.

Кроме того, выделены 12 линий, имеющих все 5 генов, но некоторые из них в гетерозиготном состоянии. Из этих гибридов в последующие годы значительно легче и вероятней отобрать полные гомозиготные по доминантным аллелям устойчивости формы. Работа в этом направлении продолжается.

Литература

1. Мухина Ж.М. Эффективность методов молекулярного маркирования в селекции, семеноводстве сельскохозяйственных культур и для изучения биоразнообразия растительных ресурсов // Автореферат дисс… докт. биол. наук, Краснодар, 2012. – 47 с.
2. Супрун И.И. Использование ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях риса // Автореферат дисс… канд. биол. наук, Краснодар, 2004. – 24 с.
3. Костылев П.И., Шилов И.А., Мухина Ж.М. Перенос пяти генов устойчивости риса к пирикуляриозу с помощью ДНК-маркеров // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук, 2014. – № 2. – С. 33-34.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРАТРЕДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОТРАВЛИВАНИЯ СЕМЯН И ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

В.В. Котляров, Н.В. Сединина, Д.В. Котляров, Д.Ю. Донченко
ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет»
Kuban-agrotech@mail.ru, sedininanv@mail.ru

USE NITRATE-REDUCING ABILITY OF PSEUDOMONAS *FLUORESCENS* FOR PRODUCHION OF MICROBIOLOGICAL PREPARASHION FOR SEED FND PLANT PROTECHION

V.V. Kotlyarov, N.V. Sedinina, D.V. Kotlyarov, D.Y. Donchenko
Kuban State Agrarian University

Summary

Microbiology preparation of Pseudomonas fluorescens for protection of seeds and plants from ills was presented in this article. There are measures for increasing the number of cells microorganisms Pseudomonas fluorescens described it. Defined germination of seeds treated with this preparation.

Применение микроорганизмов в защите растений основано на их антагонистических отношениях с микроорганизмами-возбудителями болезней растений за счёт выделения антибиотических веществ, а также веществ инсектицидного действия, направленного против насекомых-вредителей. Кроме того некоторые биологически активные вещества, выделяемые микроорганизмами являются ростостимулирующими для растений. Так, например, известно, что бактерии рода *Pseudomonas*, заселяя ризосферную зону растения, продуцируют ферменты, антибиотики и вещества фунгицидного действия. Некоторые виды этих бактерий способны к редукции нитратов, что приводит к образованию промежуточного продукта нитрита. Следует заметить о значении этого вещества в процессе восстановления нитратов до аммиака. В пищевой промышленности нитриты используются в качестве консервирующих, антибактериальных добавок - Е249, Е250. [СанПиН 2.3.2.1078-01с дополнениями и изменениями]. При этом главным образом, действие нитритов направлено против *Clostridium botulinum*.

В ООО МИП «Кубанские агротехнологии» при Кубанском госагроуниверситете разработана технологическая схема получения микробиологических препаратов на базе малотоннажных предприятий, а также способы их применения для протравливания семян пшеницы и, в виде баковой смеси, в защите растений в период вегетации [1, 2]. В качестве одного из микроорганизмов, применяемых в такой баковой смеси, нами рекомендуются бактерии рода *Pseudomonas* . Основу питательной среды для культивирования этих бактерий составляют пшеничные или кукурузные отруби. Одной из солей, используемых в питательной среде, является нитрат калия в определённой дозировке. Мы считаем, что в ходе культивирования бактерий *Pseudomonas* в питательной среде за счёт работы их ферментативного комплекса происходит накопление нитрита калия. Но существуют противоречивые сведения, в одних источниках,что бактерии *P. fluorescens* редукцией нитратов не обладают [3], в других - противоположная информация [4]. При проведении экспериментальных исследований, нами было установлено, что количество бактерий в среде без добавления KNO_3 составляло $9{,}6x10^9$ КОЕ/мл, а в среде с добавлением KNO_3 – варьировалось от $1{,}5x10^{11}$ до $3{,}2x10^{11}$ КОЕ/мл (рис 1, 2)

Рисунок 1. *P. fluorescens,* выращенные на среде из отрубей без добавления KNO_3 - рост на среде Кинга (фото Седининой Н. В.)

Рисунок 2. *P. fluorescens,* выращенные на среде из отрубей с добавлением KNO_3 - рост на среде Кинга (фото Седининой Н. В.)

Определение всхожести протравленных семян пшеницы, полученной культуральной жидкостью, содержащей клетки бактерий *P. fluorescens* и нитрит калия, показало, что прорастание семян пшеницы было на первые сутки, в то время как в контрольном варианте (семена пшеницы, протравленные культуральной жидкостью без использования этой соли) взошли только на вторые сутки. При этом в первом случае всхожесть семян (на первые сутки) составляла 80%, а во втором (на вторые сутки) - 50%.

Так как процесс культивирования микроорганизмов в условиях малотоннажных предприятий (хозяйств) ведётся в недостаточно стерильных условиях, и полная стерилизация основного компонента питательной среды - отрубей, приводящая к уничтожению микрофлоры, вносимой с отрубями (одним из компонентов питательной среды), является нежелательной по причине снижения их питательной ценности. Нами предложена замена обеспложивающей стерилизации - заваривании кипятком. При этом часть микрофлоры, содержащейся в отрубях, и устойчивой к действию высоких температур сохраняет жизнеспособность. При проведении лабораторных исследований и в производственном испытании было выявлено наличие в культуральной жидкости, полученной с добавлением в питательную среду нитрата калия дрожжевая и кокковая микрофлора присутствовали в количестве $1x10^2$ и $1x10^3$ КОЕ/г(мл). В то время как в культуральной жидкости без добавления нитрата калия дрожжевая и кокковая микрофлора достигала до $1x10^5$ КОЕ/г(мл).

Следует отметить, что в процессе развития бактерий в питательной среде накапливаются кислоты. Это сопровождается снижением pH. При достижении pH ниже оптимального уровня (для бактерий она варьирует в пределах 4,8-5,0 pH) начинается снижение количества колониеобразующих единиц. В тоже время в питательной среде с добавлением калия азотнокислого pH в конце биотехнологического процесса составил 6,0+/-0,2, а без добавления – 5,3+/-0,2. Таким образом, использование этой соли в сочетании с другими компонентами среды может способствовать сохранению буферности питательной среды.

Как показывают представленные результаты, внесение в определенной дозировке в качестве компонента питательной среды нитрата калия при культивировании бактерий *P. fluorescens* способствует повышению титра основной культуры, снижению титра, а в отдельных случаях и к подавлению посторонней микрофлоры, развивающейся наряду с основной. Всё это способствует увеличению всхожести семян. Кроме того, использование нитрата калия и промежуточного продукта его редукции – нитрита калия в питательной среде препятствует снижению pH, а значит, способствует его поддержанию в пределе близком к оптимальному для развития бактерий.

Литература

1. Котляров В.В., Сединина Н. В. Инновационная концепция микробиологической защиты растений // Материалы 3-го Всероссийского съезда по защите растений (16-20 декабря 2013г., СПб)
2. Котляров В.В., Сединина Н. В., Котляров Д. В., Донченко Д.Ю. Экологизация и биологизация сельского хозяйства на примере технологии производства и применения бакового средства для защиты растений от болезней и насекомых-вредителей // Материалы 2-ой международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе» (7-8 ноября 2013г., М)
3. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Н. Н., Золотницкая Р. П., и др. – М.: Медицина, 1987, - 368 с.
4. http://www.berl.ru/article/small/bacter/rod_pcevdomod.htm

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ ГЕНТИПИРОВАНИЕ *XANTHOMONAS ARBORICOLA* РОССИЙКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Е.И. Кырова, С.В. Виноградова, А.Н. Игнатов

Центр «Биоинженерия» РАН, Москва;

Российский Университет Дружбы народов, Москва

e-mail: an.ignatov@gmail.com

MULTILOCUS GENOTYPING OF RUSSIAN POPULATION OF *XANTHOMONAS ARBORICOLA*

E.I. Kyrova, S.V. Vinogradova, A.N. Ignatov

Centre “Bioengineering” of RAS, Moscow;

Russian Peoples’ Friendship University, Moscow

Summary

Analysis of phylogeneic relation of genes gyrB, dnaK и nrdB, prpC in population of X. arboricola showed similarity of some strains to other species (X. campestris или X. euvesicatoria). It could point on possible horizontal gene transfer that stimulates adaptation of bacteria of genus Xanthomonas to new host plants.

Род *Xanthomonas* (букв. “желтые бактерии») представлен грамотрицательными, неспорообразующими, закругленными аэробными палочками. Желтый цвет бактериям придает особый пигмент представленный уникальными арил-полиеновыми соединениями (Starr, 1977) - «ксантомонадинами». Экзополисахарид «ксантан», выделяемый бактериями широко применяется в качестве загустителя/стабилизатора суспензий и эмульсий в пищевой, косметологической, текстильной, сельскохозяйственной, нефтяной и других отраслях (Becker and Vorholter, 2009). Бактерии рода *Xanthomonas* - опасные фитопатогены, поражающие важные сельскохозяйственные культуры по всему миру. Они распространяются с водой, семенами, механическими контактами растений, зараженными инструментами. Считается, что бактерии потовариантов рода *Xanthomonas* являются узкоспециализированными патогенами (Стройков Ю.М., 1998).

На основе специфичности к растениям-хозяевам сегодня выделено около 140 патовариантов бактерий рода *Xanthomonas,* объединенных в 27 видов, практически для всех из них получены последовательности полных геномов штаммов типовых представителей, а в базу данных GENBANK депонировано около 71132 генных последовательностей бактерий этого рода.

В России все большее распространение получают болезни растений, вызываемые бактерией вида *Xanthomonas arboricola*. Патоварианты

этого вида: *X. arboricola* pv. *Celebensis* (растение-хозяин - банан), *X. arboricola* pv. *Corylina* (фундук), *X. arboricola* pv. *Fragariae* (земляника), *X. arboricola* pv. *Juglandis* (грецкий орех), *X. arboricola* pv. *Poinsettiicola* (молочай), *X. arboricola* pv. *Populi* (тополь), *X. arboricola* pv. *Pruni* (груша), поражают растения широкого круга семейств, что делает этот вид одним из самых опасных бактериальных фитопатогенов.

В 2006-2009 гг. при исследовании бактерий рода *Xanthomonas*, выдделенных из растений семейств Капустные (Brassicaceae), Пасленовые (Solanaceae), Сложноцветные (Comp?sitae), Злаки (Gram?neae), были найдены штаммы, отличающиеся своими биохимическими и генетическими свойствами от типичных патовариантов, поражающих культуры этих семейств. Данные штаммы были отнесены к виду *X. arboricola* по биохимическим признакам и нуклеотидной последовательностям гена β субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*) (Пунина Н.В., 2008). Ранее были известны случаи поражения растений сем. Капустные при искусственном заражении бактериями вида X. *arboricola*. pv. Juglandis, а X. *arboricola*. pv. celebensis может поражать растения сем. Злаки (Игнатов А.Н., 2010).

Причины многохозяинности *X. arboricola* на сегодняшний день остаются неизвестными. Поэтому важным является исследование геномного и генетического разнообразия штаммов вида *X. arboricola*, для установления филогенетического положения данных штаммов с помощью более современных методов исследования с целью выявления отличий штаммов российской популяции *X. arboricola* от типовых представителей этого вида и поиска возможных гипотез, объясняющих расширение круга растений-хозяев данного фитопатогена.

Штаммы. В работе были использованы штаммы фитопатогенных бактерий вида *X. arboricola* из коллекции лаборатории бактериальных болезней ГНУ ВНИИ фитопатологии и лаборатории молекулярной фитопатологии ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН, собранные в 2001-2013 гг. в разных регионах Российской Федерации. Только патогенные для хотя бы одного вида растений штаммы использовались в работе.

Выделение ДНК. Бактериальные штаммы выращивали на среде LB (Bertani. G, 1951) при 28 °C в течение 24-48 часов. Препараты геномной ДНК были получены с использованием методики CTAB-SDS (Birnboim & Doly, 1979).

Амплификация и секвинирование. Амплификацию 7 генных фрагментов: *gyrB* (β-субъединица ДНК-гиразы), *dnaK* (70-кДа белок теплового шока (Hsp70)), *purA* (аденилсукцинат синтетаза), *rpoD* (σ-фактор РНК-полимеразы), *prpC* (цитрат синтетаза), *fabB* (ген синтеза жирных кислот), *nrdB* (β-субъединица РНКдифосфат редуктазы) проводили на приборе Mastercycler Eppendorf AG с применением набора «Encyclo» (Evrogen, Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Амплификацию проводили по следующему температурно-временному профилю: начальная денатурация 95 °C (60 сек), далее 30 циклов: денатурация 95 °C (30 сек), отжиг праймеров 65 °C (30 сек), элонгация 72 °C (30 сек). Праймерные пары были использованы согласно протоколам Young et al. (2008) и Ignatov et al. (2007). Выделение и очистку фрагментов проводили из ПЦР-смеси с использованием набора «Clean up standard» (Evrogen) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование очищенных ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Нуклеотидные последовательности определялина автоматическом секвенаторе DNA Analyzer 3730 («Applied Biosystems», США). Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР.

Анализ последовательностей. Полученные de novo нуклеотидные последовательности были выровнены с использованием алгоритма Clustal W, параметры были выставлены по умолчанию. Проверка выравнивания вручную осуществлялась в программе BioEdit v. 7.2.5. Ссумарная длина проанализированных последовательностей составила 5821 н.п.. Для каждого из фрагментов с помощью программы NRDB был определен уникальный сиквенсовый тип (аллельный вариант), выполнен тест на наличие отбора Tajima's D (Tajima, 1983), вложенный в пакет программ DnaSP v. 5. Был определен G+C(%) состав, отношение числа транзиции/трансверсии по методу двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980). Число синонимичных и несинонимичных замен определено с использованием метода Нея и Годжобори (1986) (табл 1).

Дендрограммы филогенетических отношений штаммов были построены в программе MEGA 5.1 методом максимального правдоподобия. Значения бутстрепа были получены при 1000 повторениях. В качестве внешней группы были использованы последовательности 7 генов: *gyrB, dnaK, rpoD, purA, nrdB, prpC, fabB* штамма *Stenotrophomonas maltophilia* K279a. Анализ наличия рекомбинационных событий проводили с помощью пакета программ RDP. Настройки выставлены по умолчанию, за исключением параметра линейная ДНК.

Таблица 1.

Некоторые генетические показатели последовательностей 7 генных фрагментов: *gyrB, dnaK, rpoD, purA, nrdB, prpC, fabB*

Ген	***gyrB***	***dnaK***	***nrdB***	***purA***	***prpC***	***rpoD***	***fabB***
Функция	Б субъединица ДНК-гиразы	70-kDa белок теплового шока (Hsp70)	бета субъединица РНКдифосфат редуктазы	Аденил-сукцинат синтетаза	цитрат синтетаза	рнк полимераза	синтез жирных кислот
Длина	899	1132	640	799	806	948	597
G+C%	65	65	60	66	63	63	66
Ts/Tv	1,63	0.65	1,38	1.91	2.06	1.26	1.67
Ka	0.08	0.06	0.02	0.08	0.02	0.06	0.09
Ks	0.07	0.02	0.02	0.04	0.07	0.02	0.02
Число аллелей	20	15	23	29	30	24	28
Число полиморфных сайтов	115	58	46	64	89	103	83
Нуклеотидное разнообразие	0.097788	0.073176	0.038402	0.054303	0.116705	0.063568	0,06068
Tajima's D	-1.248	-2.018	1.03	1.154	1.437	-1.316	1,01204
Число аллельных вариантов	20	15	24	23	28	30	29

Результаты и обсуждения.

Все исследуемые генные фрагменты оптимальны для проведения мультилокусного генотипирования. Отношение числа синонимичных и несинонимичных замен меньше единицы для всех исследуемых генов. Таким образом, все исследуемые генные фрагменты прошли действие стабилизирующего отбора. Значение Tajima's D лежит в пределах от -2 до 2 (для всех кроме *dnaK*), следовательно, выбранные нами гены не подвергаются действию отбора. В результате проведения мультилокусного анализа было выявлено от 15 (*dnaK*) до 30 (*rpoD*) аллельных вариантов. Для некоторых генных фрагментов (*gyrB, dnaK*) была обнаружена небольшая корреляция между поражаемым растением-хозяином и аллельным вариантом. Было отмечено нетипичное для *X. arboricola* значение GC(%) состава для трех генных фрагментов. Такое отклонение может говорить о том, что данные гены были получены в результате горизонтального переноса. Для четырех изучаемых последовательностей значение Tajima's D является положительным. Таким образом, гены *nrdB*, *purA, fabB* и *prpC* в настоящий момент вовлечены в процесс адаптации.

При анализе данных полученных на основе дендрограмм филогенетических отношений штаммов было обнаружено то, что ряд образцов *X. arboricola* имеют аллели генов *gyrB, dnaK и nrdB, prpC* более близкие к штаммам другого вида (*X. campestris* или *X. euvesicatoria,* соответственно). Данное явление, возможно, указывает на наличие латерального переноса генов, который способствует адаптации бактерий рода *Xanthomonas* к новому кругу растений-хозяев. Для проверки этой гипотезы был выполнен контигиальный элаймент фрагментов 7 генов с аналогичными фрагментами других представителей рода *Xanthomonas* и проведен анализ с помощью пакета программ RDP. Было отмечено наличие рекомбинационных событий по гену *gyrB*, не смотря на то, что он находится близко к сайту начала репликации хромосомы и относительно защищен от рекомбинаций. Полученные данные о наличии горизонтального переноса не могут в полной мере считаться достоверными, так как точки рекомбинации были обнаружены менее чем тремя методами для каждого из событий. Проанализировав сигналы адаптивной эволюции (под сигналами адаптивной эволюции будем считать преобладание несинонимичных замен над синонимичными (критерий Kn/Ks 1) (Гунбин, 2007) по каждому генному фрагменту для групп, образованных штаммами, поражающими одно растение хозяина были обнаружены следующие сигналы адаптивной эволюции приведенные в таблице 2.

Так как штаммы, выделенные из рапса (Московская обл.) и капусты, являются *X.arboricola* по всем исследуем генным фрагментам, то наличие сигналов адаптивной эволюции в перечисленных генах может свидетельствовать о начале адаптации к поражению новых растений хозяев. Этот вывод так же справедлив и для штаммов, выделенных из злаков.

Таблица 2.
Сводная таблица наличия сигналов адаптивной эволюции

	Штамм	***1343-1357***	***S1-S4***	***1363-1366***	***1392***	***1393***	***1395***	***ya1265***	***ya3004***	***ya3028***	***1577***	***417***
Ген	растение-хозяин	рапс	подсол-нечник	рапс	капуста			ячмень			томаты	
gyrB				+				+	+	+	+	+
dnaK		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
rpoD		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
nrdB		+			+	+	+	+	+	+		
prpC		+										
fabB		+		+				+	+	+	+	+
purA		+		+								

Литература

1. Birnboim HC, Doly JA rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
2. Ignatov A. et al. 2007. Phytopathology, 97:803-812.
3. Kimura M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. Journal of Molecular Evolution -1980
4. Starr M.P. and Stephens W.L. Pigmentation and taxonomy of the genusXanthomonas. // J. of Bacteriology. - 1964. –V. 87. –P. 293–302.
5. Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. 1983 Genetics 105:437-460.
6. Young J.M., et al. 2008. Systematic and Applied Microbiology 31: 366-377
7. Игнатов А.Н., Пунина Н.В., Матвеева Е.В. и др. Xanthomonas arboricola – бактериальный патоген сельскохозяйственных культур в России // Защита и карантин растений- 2010 - С. 41.
8. Пунина Н. В., Зотов В. С., Кузнецов Б. Б., Игнатов А. Н. Оценка генетического разнообразия межгенного транскрибируемого региона 16s-23s ррнк, гена gyrb и разработка пцр диагностики фитопатогенных ксантомонад // Вестник МГОП -2008.
9. Стройков Ю.М. Защита сельскохозяйственных культур от болезней. – М. 1998

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ВРЕДОНОСНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА МОРКОВИ

А.М. Лазарев[1], И.Н. Надточий[1], Ю.Б. Рогачев[2]

[1] Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

[2] Ботанический сад I Медицинского Института им. И.М. Сеченова, Москва

DISTRIBUTION AND HARM CAUSED BY BACTERIAL BLIGHT OF CARROT PLANTS

A.A. Lazarev[1], I.N. Nadtochii[1], Ju. B., Rogachev[2]

[1] Russian Research Institute of plant protection, St. Petersburg

[2] Botanical garden of 1st Medical institute by I.. Sechenov Moscow

Summary

Pathogen Xanthomonas hortorum pv. carotae (Kendrick 1934) Vauterin, Hoste, Kersters, Swings 1995 (syn.: Xanthomonas campestris pv. carotae) causes bacterial blight of carrot across all Russia, reducing potential yield by 12,8 и 44,7% with affected leaf surface from 1 to 75%.

Ценность моркови посевной (*Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.) в жизни человека неоспорима, так как она удовлетворяет большую долю потребности его пищевого рациона в витаминах. Это растение повсеместно культивируют на всех континентах земного шара и на территории б. СССР (от северных границ земледелия до крайнего юга). Его площади остаются значительными во всех почвенно-климатических зонах Российской Федерации.

Однако большие потери урожаю этой культуре причиняют болезни, среди которых

достаточно высокой вредоносностью характеризуется бактериальный ожог моркови. Это заболевание вначале проявляется на концах долек у нижних листьях в виде мокрых желтых пятен, позднее быстро темнеющих. Ткань, окружающая эти пятна, имеет светло коричневого цвета. При сильном развитии болезни листья скручиваются и засыхают. Черешки листьев также могут поражаться, приобретая бурую окраску. На семенниках заболевают листья, стебли и зонтики. На их стеблях появляются небольшие продолговатые темные водянистые пятна или полосы. В фазу бутонизации пораженные молодые зонтики темнеют и покрываются клейким экссудатом и засыхают. У некоторых соцветий заболевает иногда только часть зонтиков; остальные соцветия развиваются нормально и даже дают вызревшие семена. При поражении плодоножек у больных растений наблюдают искривление зонтиков. Сильно пораженные семенники отстают в развитии. На корнеплодах болезнь проявляется в виде мелких коричневых слабо вдавленных пятен. Интенсивное развитие бактериоза наблюдают в теплую погоду (при среднесуточной температуре воздуха 20-25˚С). Развитие бактериоза зависит от суммы положительных температур и осадков вегетационного периода. Вредоносность бактериального ожога заключается в снижении качества и урожайности моркови, а также в поражении семенного материала. Эпифитотии бактериоза моркови наблюдают спорадически: только при сочетании благоприятных для патогена условий вегетационного сезона (влажности и температуры воздуха и почвы) и степени устойчивости сорта (Израильский, 1960; Pfleger, et al., 1974). Инфекция сохраняется в семенах и пораженных растительных остатках (Билай и др., 1988).

Клетки возбудителя бактериоза *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (Kendrick 1934) Vauterin, Hoste, Kersters, Swings 1995 (син.: *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* (Kendrick 1934) Dye 1978) представляют собой подвижные (посредством 1-2 полярных жгутиков) прямые палочки, размером 0,42-0,85 х 1,38-2,75 мкм. Грамотрицательные. Аэробы, не имеют покоящейся стадии. На картофельном агаре колонии округлые, гладкие, блестящие, с ровными краями, желтые. Бактерии не редуцируют нитраты, разжижают желатин, не гидролизуют крахмал, производят H_2S из пептона, кислоту из глюкозы, ксилозы, сахарозы, лактозы, раффинозы, трегалозы и глицерина, но не образуют ее из мальтозы и рамнозы. Оптимальная температура их роста 25-30°С (Израильский,1960).

Защиту моркови от бактериоза строят из комплекса агротехнических, организационно-хозяйственных, профилактических приемов и с учетом применения химических и биологических препаратов для снижения или подавления возбудителя болезни (Израильский, 1960; Герасимов, Осницкая, 1961 Шнейдер и др., 1975; Диагностика бактериальных болезней…, 1980). Эти мероприятия должны служить для создания для роста и развития растений оптимальных условий возделывания. Наиболее надежным средством получения экологической продукции считают использование сортов, устойчивых к этому заболеванию. Важны подбор и возделывание устойчивых сортов и гибридов моркови, характеризующихся комплексной устойчивостью не только в период вегетации, но и для длительного хранения. Меры борьбы также должны включать оптимальную агротехнику – соблюдение севооборота (возвращение на прежнее место через 3-4 года и исключение из предшественников томата, огурца, капусты и картофеля), тщательное уничтожение полевых растительных остатков и очистку семенного фонда от щуплых и зараженных семян. Для выявления наличия или пороговых уровней бактериальной инфекции в листьях и семенном материале специалисты рекомендуют пользоваться высокочувствительными питательными средами и методами (Williford, et al., 1984; Kuan, et al.,1985; Umesh, et al., 1998; Meng, et al., 2004; Wu, 2010; Wu, et al., 2011; Kimbrel, et al., 2011; Temple, et al., 2013). Протравливание семенного материала перед посевом возможно через термическое обеззараживание семян (при 45-50°С в течение 30 мин.) или с помощью ТМТД (при норме 6-8 г/кг). Ввиду специфичности возделывания моркови как двухлетней культуры маточные корнеплоды на хранение закладывают механически неповрежденные, перед закладкой обрабатывают 3%-ной суспензией ТМТД, соблюдают зимой температуру 1-2°С и влажность воздуха 80-85%). Сбор семян осуществляют только со здоровых растений.

Бактериальный ожог моркови имеется в США, Канаде, Японии, Австралии и других странах (Израильский, 1960; Герасимов, Осницкая, 1961; Kendrick, 1934; Watson, 1948; Arsvol, 1969; Pfleger, et al., 1974; Nishiyama, et al., 1979; Gilbertson, 2002; du Toit, et al., 2005). Это заболевание зарегистрировано на территории бывшего СССР – в Воронежской, Томской, Кемеровской, Новосибирской областях, в Алтайском и Приморском краях, в Республике Алтай а также в Молдавии, Казахстане, Грузии, Армении и на Украине.

При составлении ареала бактериального ожога моркови на территории Российской Федерации и сопредельных государств за основу взята

карта распространения этой культуры, предложенная Дорониной и Терехиной (2005), а также использованы опубликованные в открытой печати литературные источники. Карта векторная (рис. 1) состоит из двух тематических слоев, характеризующих зоны слабой (распространение) и сильной вредоносности болезни на моркови (Афонин и др., 2008)

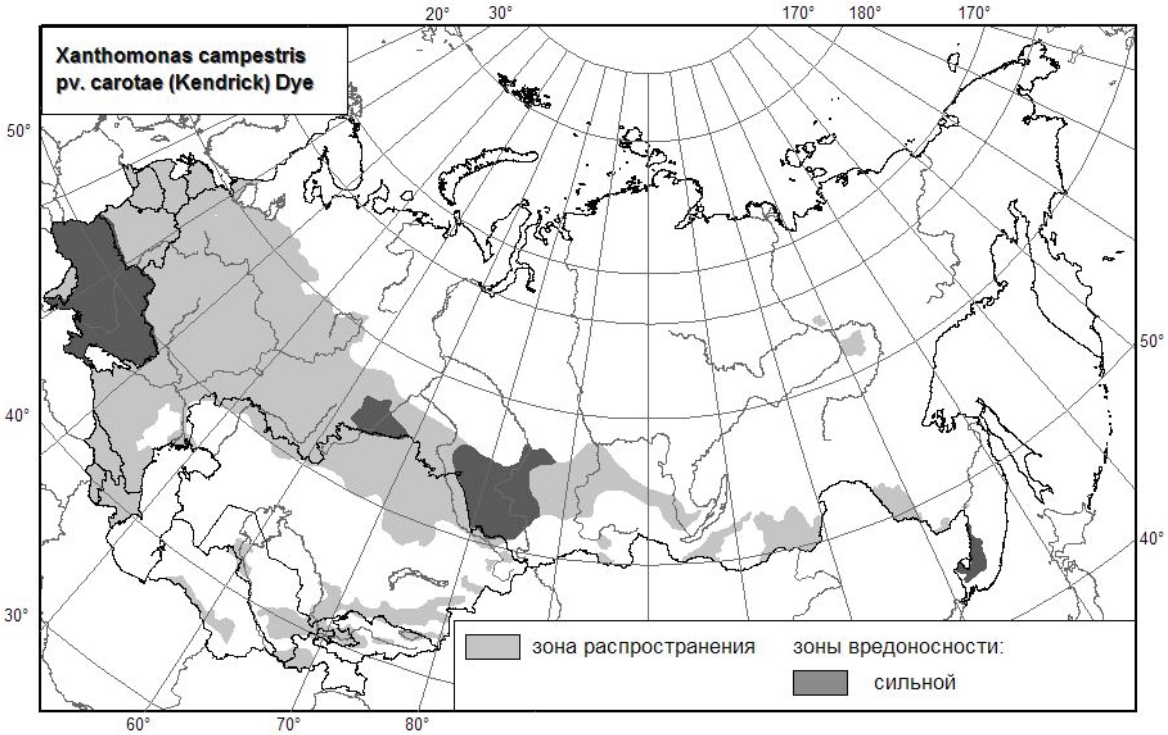


Рис. 1. Векторная карта ареала и зоны вредоносности бактериального ожога моркови *X. hortorum* pv. *carotae* (син.: *X. campestris* pv. *carotae*).

В данной сводке отмечена распространенность указанного бактериоза во всех зонах выращивания моркови на территории б. СССР - в Воронежской, Томской, Кемеровской, Новосибирской областях, в Алтайском и Приморском краях, в Республике Алтай (Взоров, 1938[а], 1938[б]; Израильский, 1960; Чумаевская, Горленко, 1960; Герасимов, Осницкая, 1961; Диагностика бактериальных болезней..., 1980; Билай и др., 1988; Рыбалко, 1988, 1990; Рыбалко, Самохвалов, 1985, 1990), а также в Молдавии (Куниченко, 1985), Казахстане (Взоров, 1938[а]; Горленко, 1966), Грузии (Цилосани, Тухарели, 1981), Армении (Тетеревникова-Бабаян, 1964), на Украине (Дао Ким Оань, 1985; Бородай, 2005). Зона высокой вредоносности определена в тех регионах, где возбудитель болезни вызывает потери урожая выше 10% экономического порога вредоносности. Она включает Украину, Западную Сибирь (Алтайский край, Томская, Кемеровская, Новосибирская области), Республику Алтай и Приморский край (Дао Ким Оань, 1985; Рыбалко, 1988, 1990; Рыбалко, Самохвалов, 1985, 1990). Так, в условиях Лесостепи (Украина) бактериоз опасен для моркови первого года: потери составляют 10-12% растений. В отдельные годы на Алтае распространенность бактериоза составляет на растениях (первый год выращивания) 22,4 - 100%, на корнеплодах (период уборки) - 14-15,8%, при хранении - 21-53%, на семенниках - 31,5-92,5%. При определении вредоносности в посевах моркови (сорт Шантенэ) было установлено, что потери от 1 до 75% листовой поверхности ведет к снижению продуктивности растений на 12,8 и 44,7% соответственно. Существенное снижение урожайности моркови наблюдают уже при поражении в степени 0,1 балла (2% листовой поверхности), при этом потери при разных уровнях урожайности 30, 60 и 75 т/га наблюдают 4,1, 8,1 и 10,1 т/га соответственно. При 1 балле (15,6% пораженной листовой поверхности) - 6,2, 12,3 и 15,4 т/га, при 2 баллах (30,2%) 8,1, 16,2 и 20,3 т/га, при 3 баллах (49,7%) - 11,1, 22,2 и 27,8 т/га, при 4 баллах (68,3) - 13,1, 26,1 и 32,6 т/га соответственно. Сроком для начала применения защитных мероприятий выбран экономический порог вредоносности бактериоза: степень поражения посевов должна быть 0,1 балла.

Векторная карта распространения бактериоза в масштабе 1:20 000 000 в проекции Равновеликая Альберса на СССР, 9, 1001, 7, 100, 0, 44, 68, 0, 0 с помощью средств ГИС-технологий.

Основная часть работы выполнена в рамках проекта МНТЦ N 2625.

Литература

Афонин А.Н., Грин С.Л., Дзюбенко Н.И., Фролов А.Н. Агроэкологический атлас России и сопредельных государств: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения. (Интернет-версия 2.0). 2008 http://www.agroatlas.ru.

Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г., Краев В.Г., Элланская И.А., Зирка Т.И., Мурас В.А. Микроорганизмы - возбудители болезней растений. - Киев: Наукова думка, 1988. - 552 с.

Бородай В.В. Поширення бактеріальних хвороб на корнеплодах моркови при зберігані // Фитопатогенные бактерии. Фитонцидология. Аллелопатия. Сб. ст. участников Междунар. науч. конф. - Киев: Держ. Агроекол. Ун., 2005. - С. 19-22.

Взоров В.И. Выявление видового состава и географии бактериозов растений в Советском Союзе // Итоги науч.-иссл. работ ВИЗР за 1936 г. Вирусные и бактериальные заболевания растений, биометод, химизация и механизация защиты растений. - Л.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1938[а]. – 3. - С. 40-45.

Взоров В.И. Состав и распространение бактериозов сельскохозяйственных растений в Советском Союзе // Изв. Рост. станции защиты растений. - Ростов на Дону: Рост. обл. книгоизд., 1938[б]. – 9. - С. 87-91.

Герасимов Б.А., Осницкая Е.А. Вредители и болезни овощных культур. - М.: Сельхозгиз, 1961. - 536 с.

Горленко М.В. Бактериоз моркови. В: Бактериальные болезни растений. - М.: Высшая школа, 1966. - С. 224-226.

Дао Ким Оань. Бактериозы моркови во время вегетации // Фитонциды. Бактериальные болезни растений (тез. докл.). - Киев: Наукова думка, 1985. – 2. - С. 73-74.

Диагностика бактериальных болезней овощных культур и меры борьбы с ними. - М.: РАСХН, 1980. - 26 с.

Израильский В.П. Бактериозы моркови и других овощных культур // Бактериальные болезни растений.- М.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1960. - С. 306-311.

Куниченко Н.А. Бактериозы овощных культур в Молдавии // Фитонциды. Бактериальные болезни растений (тез.докл.). - Киев: Наукова думка, 1985. – 2. - С. 67-68.

Рыбалко А.А. Методы иммунологической оценки моркови к бактериозу и исходный материал на комплексную устойчивость к болезням в Западной Сибири // Автореф. канд. дисс. - М., 1988. - 24 с.

Рыбалко А.А. Методы создания инфекционных фонов при изучении устойчивости моркови к бактериозу // Науч. труды Зап.-Сиб. овоще-картоф. оп. станции. - Барнаул: Союзучетиздат, 1986. – 5. - С. 130-133.

Рыбалко А.А. Распространение и вредоносность бактериоза моркови в Западной Сибири // Фитонциды. Бактериальные болезни растений(мат. конф.). - Киев-Львов: Украгрожилбытстрой, 1990.- 2. - С. 80-81.

Рыбалко А.А., Самохвалов А.Н. Селекция моркови на устойчивость к бактериозу в условиях Западной Сибири // Фитонциды. Бактериал. болезни растений (тез. докл.). - Киев: Наукова думка, 1985.- 2. - С. 130-131.

Рыбалко А.А., Самохвалов А.Н. Состав популяции возбудителя бактериоза моркови в Западной Сибири // Фитонциды. Бактериальные болезни растений (мат. конф.). - Киев-Львов: КГТ-2, 1990. – 2. - С. 80-81.

Тетеревникова-Бабаян Д.Н. Болезни моркови // Болезни овоще-бахчевых культур в Армении и меры борьбы с ними. - Ереван, 1964. - 2. - С. 87-196.

Шнейдер Ю.И., Ильюхина М.К., Коростылева М.П. Производим здоровые семена моркови // Защита растений, 1977. – 2. - С. 20.

Цилосани Г.А., Тухарели А.Р. Бактериальная болезнь моркови в Грузии и меры борьбы с нею // Бактериальные болезни. - М.: Колос, 1981. - С. 194-200.

Чумаевская М.А., Горленко М.В. Новый для СССР бактериоз моркови // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. - 1960. - 4. - С. 114-116.

Чумаевская М.А., Городилова Л.М. Бактериальные болезни сельскохозяйственных растений в Целиноградской области // Селекция и растениеводство. Науч.-техн. бюлл. – Шортанды: ВНИИЗХ, 1974. - С. 86-92.

Arsvoll, K. Pathogens of carrots in Norway. - Sei. Rep. of the Agr. Norway. - 1969. - 48 (2). - P. 1-48.

du Toit, L. J., Crowe, F. J., Derie, M. L., Simmons, R. B., Pelter, G. Q. 2005. Bacterial blight in carrot seed crops in the Pacific Northwest. – Plant Dis. - 89. - P. 896-907.

Gilbertson, R. L. 2002. Bacterial leaf blight of carrot. In: Compendium of Umbelliferous Crop Diseases (R. M. Davis, R. N. Raid,eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul. APS Compendium of Plant Disease Series PRESS. MN. - P. 11-12.

Kendrick, J.B. Bacterial blight of carrots. J. Agric. Res. - 1934. - 49 (6). - P.493-510.

Kimbrel, J. A., Givan, S. A., Temple, T. N, Johnson, K. B., Chang, J. H. 2011. Genome sequencing and comparative analysis of the carrot bacterial blight pathogen, *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, for insights into pathogenicity and applications in molecular diagnostics. Mol. Plant Pathol. - 12 (6). - P. 580-594.

Kuan, T.-L., Minsavage, G. V., Gabrielson, R. L. 1985. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed. - Plant Dis. – 69. – P. 758-760.

Meng, X. Q., Umesh, K. C., Davis, R. M., and Gilbertson, R. L. 2004. Development of PCR-based assays for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, the carrot bacterial leaf blight pathogen from different substrates.- Plant Dis. – 88. – P. 1226-1234.

Nishiyama, K., Tukunishi, T., Toreda, T., Ezuka, A. Bacterial blight of carrot caused by *Xanthomonas carotae*, a bacterial disease new to Japan. - Ann. Phytopath. Soc. Japan. - 1979. - 45 (5). - P. 683-688.

Pfleger, F.L., Harman, G.E., Marx, C.A. Bacterial blight of carrots; interaction of temperature, light and inoculation procedures on disease development of various carrot cultivars. - Phytopath. - 1974. - 64 (5). - P. 746-749.

Temple, T.N., du Toit, L.J., Derie, M.L., Johnson, K.B. 2013. Quantitative Molecular Detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in Carrot Seed Before and After Hot-Water Treatment. - Plant Disease. - 97 (12). - P. 1585-1592.

Umesh, K. C., Davis, R. M., Gilbertson, R. L. 1998. Seed contamination thresholds for development of carrot bacterial blight caused by *Xanthomonasm campestris* pv. *carotae*. - Plant Dis. – 82. – P. 1271-1275.

Watson, H.D. Carrot bacterial blight control in Idaho. - Plant. Dis. Rep. - 1948. - 32 (l-2). -P. 238-239.

Williford, R. E., Schaad, N. W. 1984. Agar medium for selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* from carrot seeds (abstr.). – Phytopath. – 74. – P. 1142.

Wu, B. M. Effects of sampling methods on the assessment of populations of Xanthomonas hortorum pv. carotae on carrot plants and on harvested carrot seeds. 2010. Am. Phytopath. Soc. Ann. Meet. (August 7-11, 2010). Charlotte, North Carolina, USA (abstr.). – Phytopath. - 100. – P. 139.

АРЕАЛ И ЗОНА ВРЕДОНОСНОСТИ УГЛОВАТОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ФАСОЛИ

А.М. Лазарев[1], И.Н. Надточий[1], В.А. Коробов[2]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

[2] Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»), Белгород;
e-mail: allazar54@mail.ru

DISTRIBUTION AND HARM CAUSED BY BACTERIAL LEAF SPOT DISEASE OF COMMON BEENS

A.A. Lazarev[1], I.N. Nadtochii[1], V.A. Korobov[2]

[1] Russian Research Institute of plant protection, St. Petersburg.

[2] Belgorod State Research University, Belgorod

Summary

Pathogen Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola (Burkholder 1926) Gardan et al. 1992 (syn.: Ps. syringae pv. phaseolicola (Burkholder 1926) Young, Dye, Wilkie 1978) is wide-spread in Russia. The disease is the most harmful at Primorie Kray (Far East of Russia) with up to 40% of damagedplants and 25% of yield loss in average.

Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) - ценное бобовое растение, которое имеет высокое продовольственное значение как зерновая и овощная культура. В числе ее вредоносных заболеваний входит угловая бактериальная пятнистость. Эта болезнь поражает все надземные части растения, ее обнаруживают уже на ранних фазах развития (на семядолях). Сначала на листьях появляются мелкие угловатые маслянистые темно-зеленые пятна, которые располагаются между жилками листа. Затем они приобретают красно-коричневый цвет. Очаги больной ткани могут сливаться, однако четкость углов этих пятен сохраняется. При влажной погоде в местах поражения выделяется грязно-белый экссудат, который после подсыхания отчетливо заметен на нижней стороне листа в виде серой тонкой пленки. Важным диагностическим признаком угловатой бактериальной пятнистости фасоли является наличие больших хлоротических зон (окаймления) вокруг поражения. По мнению ряда специалистов (Schwartz, 1980; Hildebrand, et al., 1988; Ishimaru, et al., 2005), этот желто-зеленый хлороз становится более выраженным при температуре от 18 до 23°С за счет производства патогеном токсина. Но если температура становится выше, выработка последнего снижается и хлоротичные симптомы несколько менее заметны. В ряде случаев наблюдают слабое увядание кончиков листьев. На стеблях пораженных растений появляются удлиненные серо-зеленые (позднее бурые) пятна. На бобах отмечают маслянистые водянистые пятна округлой формы, которые позднее сливаются. С созревающих плодов инфекция переходит на семена, тогда на них можно обнаружить желтоватые и коричневые пятна, напоминающие уколы насекомых. Семена сморщиваются, остаются недоразвитыми и мелкими (Израильский, 1960; Билай и др., 1988). Бактериоз вызывает преждевременное опадение листьев, уменьшение их ассимиляционной поверхности на 40-50%, что приводит к снижению урожая, вплоть до гибели всходов и взрослых растений вследствие перелома стебля в местах поражения. У больных растений повышается интенсивность дыхания и транспирация, снижается активность фотосинтеза и количество хлорофилла в листьях. Массовое проявление бактериоза наблюдается во второй половине вегетативного сезона, когда происходит вторичное заражение растений. Поражение бактериозом зависит от сорта и климатических условий. Развитию бактериоза способствуют дождливая погода и низкие температуры. Бактериальная инфекция сохраняется в пораженных растительных остатках и семенах.

Клетки возбудителя бактериальной угловатой пятнистости фасоли *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder 1926) Gardan et al. 1992 (син.: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder 1926) Young, Dye, Wilkie 1978) представляют собой подвижные (посредством жгутика) прямые палочки (объединены в цепочки), размером обычно 0,7-1,5x1,5-3 мкм. Нет ни спор, ни капсул. Грамотрицательные. На питательных средах колонии округлые, серовато-белые, приподнятые в центре, с прозрачными, голубыми краями. Леван и флюоресцирующий пигмент образуют. Бактерии разжижают желатин медленно, не восставливают нитраты, не свертывают молоко. NH_3 выделяют,

а индол и H_2S - нет. Оксидазоотрицательные. Образуют кислоты из декстрозы, галактозы, левулезы, ман-нозы, арабинозы, ксилозы, сахарозы, глицерина. Не образуют кислоту из рамнозы, мальтозы, лактозы, раффинозы, маннита, салицина. Оптимальная температура роста 20-23°С, минимальная 2,5°С, максимальная 33°С (Израильский, 1960; Билай и др., 1988).

Меры борьбы состоят в соблюдении севооборота (подбор непоражаемых предшественников, в тщательном уничтожении растительных остатков). Немалое внимание уделяют использованию устойчивых сортов к этому бактериозу (Conway, 1982; Zaiter, Coyne, 1984; Boelema, 1985; Velich, et al., 1993). Важно правильно диагностировать семенные партии на предмет бактериоза (Mohan, Schaad, 1987).

Угловатая бактериальная пятнистость фасоли отмечена в США, Бразилии, Южной Африке, Австралии и во многих европейских странах (Франции, Италии, Испании и др.) (Ercolani, et al., 1974; Fouilloux, 1975; Schwartz, 1980; Sherf, MacNab, 1986; Legard, Schwartz, 1987; Garrett, Schwartz, 1998; Fourie, 2002; Ishimaru, et al., 2005). Она распространена на всей территории б. СССР, где выращивают эту культуру - в Российской Федерации, а также в Узбекистане, Молдове, Литве, Латвии, Эстонии, Казахстане и на Украине.

При составлении ареала угловатой бактериальной пятнистости фасоли на территории Российской Федерации и сопредельных государств за основу взята карта распространения этой культуры, предложенная Н.В. Терехиной и Т.В. Буравцевой (2003), а также использованы опубликованные в открытой печати литературные источники. Карта векторная (рис. 1) состоит из тематических слоев, характеризующих зону распространения и зону высокой вредоносности болезни на фасоли (Афонин и др., 2008).

.В данной сводке отмечена распространенность заболевания на всей территории б. СССР, где выращивают эту культуру - в РФ (Взоров, 1938; Горленко, 1947, 1949, 1966; Герасимов, Осницкая, 1961; Методические указания по исследованию…, 1971; Диагностика бактериальных болезней.1979; Шпаар и др., 1980; Исследование и определение возбудителей…, 1982; Билай и др., 1988; Бактериозы зернобобовых культур…, 2006), Узбекистане, Молдове, Литве, Латвии, Эстонии, Казахстане, на Украине (Взоров, 1938; Горленко, 1947, 1949; Израильский, 1960; Казенас, 1965; Методические указания по исследованию…, 1971; Диагностика бактериальных болезней…, 1979; Исследование и определение возбудителей…, 1982; Куниченко, 1985; Билай и др., 1988). Зона высокой вредоносности определена в тех регионах, где спорадически возникают эпифитотии и могут поражаться более 20% растений. Она включает Дальний Восток (Приморский край), где количество пораженных растений достигает 40%

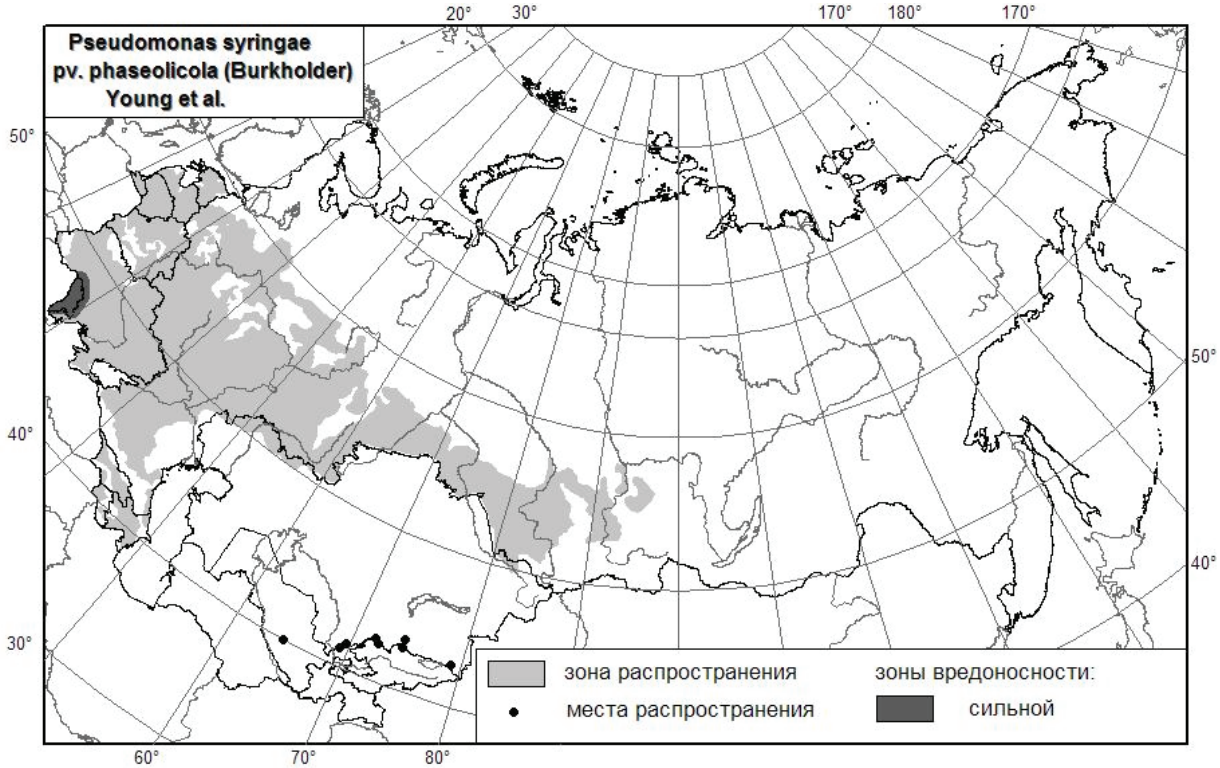


Рис. 1. Векторная карта ареала и зоны вредоносности бактериальной угловатой пятнистости фасоли *Ps. savastanoi* pv. *phaseolicola* (син.: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola*).

(в отдельные годы 70-100%) и урожай снижается более чем на 25%, и Молдову, где количество больных растений в отдельные годы во время эпифитотий достигает 50-80%, потери урожая 30-60% (Горленко, 1966; Куниченко, 1985).

Векторная карта распространения бактериоза в масштабе 1:20 000 000 в проекции Равновеликая Альберса на СССР, 9, 1001, 7, 100, 0, 44, 68, 0, 0 с помощью средств ГИС-технологий.

Литература

Афонин А.Н., Грин С.Л., Дзюбенко Н.И., Фролов А.Н. Агроэкологический атлас России и сопредельных государств: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения. (Интернет-версия 2.0). 2008 http://www.agroatlas.ru.

Бактериозы зернобобовых культур и меры борьбы с ними // Методические рекомендации (ред. Павлюшин В.А.). - СПб: ВИЗР, 2006. – 41 с.

Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г., Краев В.Г., Элланская И.А., Зирка Т.И., Мурас В.А. Микроорганизмы - возбудители болезней растений. – Киев: Наукова думка, 1988. - 552 с.

Взоров В.И. Состав и распространение бактериозов сельскохозяйственных растений в Советском Союзе // Изв. Рост. станции защиты растений, 1938. – 9. - С. 87-91.

Герасимов Б., Осницкая Е. Вредители и болезни овощных культур. - М.: Гос. изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1961. - С. 358-361.

Горленко М.В. Бактериальные болезни растений. М., Высшая школа, 1966, 292 с. Горленко М.В. Итоги изучения бактериальных болезней в СССР за 30 лет (1917-1947) // Микробиология, 1949. – 181. - С. 71-81.

Горленко М.В. Очерк географического распространения бактериальных болезней в СССР // Бюлл. об-ва испытателей природы. Отд. биологии, 1947. - 32 (2). - С. 61-70.

Диагностика бактериальных болезней зернобобовых культур и меры борьбы с ними // Методические рекомендации (ред. Кирюхина Р.И.). - М.: ВАСХНИЛ, 1979. – 28 с.

Израильский В.П. Бактериозы бобовых растений // Бактериальные болезни растений. - М.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1960. - С. 221-227.

Исследование и определение возбудителей бактериозов, изучение устойчивости к ним однолетних бобовых культур // Методические указания (ред. Корсаков Н.И.). - Л.: ВИР, 1982. – 90 с.

Казенас Л.Д. Болезни сельскохозяйственных растений Казахстана. - Алма-Ата: Кайнар, 1965. - С. 227-228.

Куниченко Н.А. Бактериозы овощных культур в Молдавии // Фитонциды. Бактериальные болезни растений (тез. докл.). - Киев: Наукова думка, 1985.- 2. - С. 67-68.

Методические указания по исследованию и определению возбудителей бактериозов однолетних и многолетних бобовых культур (ред. Горленко М.В.). - Л.: ВИР, 1971. - 74 с.

Терехина Н.В., Буравцева Т.В. Ареал фасоли обыкновенной (Phaseolus vulgaris L.). 2003. www.agroatlas.ru.

Conway, J. 1982. White-seeded beans (Phaseolus vulgaris) resistant to haloblight (Pseudomonas phaseolicola) to bean common mosaic virus, and to anthracnose (Colletotrichum lindemuthianum). - Agr. Sc. – 99 (3). - P. 555-560.

Boelema, B.H. 1985. A glasshouse test for screening green bean cultivars for resistance to halo blight caused by Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. - Phytophyl. - 17. - P. 99-100.

Ercolani, G. L., Hagedorn, D. J., Kelman, A., Rand, R. E. 1974. Epiphytic survival of Pseudomonas syringae on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. - Phytopathol. – 64. – P.1330-1339.

Fouilloux, G., 1975. Etude de la résistance à la graisse du Haricot (Pseudomonas phaseolicola), sélection pour ce caractère. C.R. Eucarpia Haricot, Versailles, France. - P. 115–124.

Fourie, D. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (Phaseolus vulgaris L.) in South Africa. - J.Phytopathol., 2002. – 150 (4/5). -P. 220-226.

Ishimaru, C., Mohan, S. K., Franc, G. D. 2005. Common bacterial blight. In: Compendium of Bean Diseases (H. F. Schwartz, J. R. Steadman, R. Hall, and R. L. Forster, eds.). - Am. Phytopath. Soc., St. Paul, MN. - P. 47-49.

Garrett, K. A., Schwartz, H. F. 1998. Epiphytic Pseudomonas syringae on dry beans treated with copper-based bactericides. - Plant Dis. – 82. – P. 30-35.

Legard, D. E., Schwartz, H. F. 1987. Sources and management of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola and Pseudomonas syringae pv. syringae epiphytes on dry beans in Colorado. - Phytopathol. – 77. – P. 1503-1509.

Messiaen, C.-M., Seif, A.A. Phaseolus vulgaris L. (French bean). Prota 2: Vegetables/Légumes. ICIPE, P.O. Box 30772, Nyago Stadium, Nairobi, Kenya.

http://database.prota.org/PROTAhtml/Phaseolus%20vulgaris%20(French%20bean).

Schwartz, H. F. 1980. Miscellaneous bacterial diseases. In: Bean Production Problems (H. F. Schwartz, G. E. Galvez, eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aereo 6713, Cali, Columbia. - P. 173-194.

Sherf, A.F., MacNab, A.A., 1986. Vegetable diseases and their control (2nd Edition. John Wiley and Sons). New York, United States. - 728 p.

Velich, I., Szarka, J., Neda, P., Horvath, I., Csizmadia, L. 1993. New results in the breeding of beans against Pseudomonas and Xanthomonas. Tag. Ber. Akad. Landwirtsch.-Wiss. Berlin. Berlin. - P. 115-118.

Zaiter, H., Coyne, D. 1984.Testing inoculation methods and sources of resistance to the halo blight bacterium (Pseudomonas syringae pv. phaseolicola) in Phaseolus vulgaris. - Euphytica.- 3 (1). - P. 133-141.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПРЕПАРАТАМИ ПРОТИВ ПОЛОСАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ (PSEUDOMONAS ANDROPOGONI) НА СОРГОВЫХ КУЛЬТУРАХ В ЛЕСОСТЕПИ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.В. Матвиенко

ГНУ Поволжский НИИСС им. П.Н. Константинова
e-mail - opel0076687@yandex.ru

EFFICIENCY OF PRESEEDING PROCESSING OF SEEDS PREPARATIONS AGAINST STRIPED SPOTTINESS (PSEUDOMONAS ANDROPOGONI) ON SORGOVY CULTURES IN THE FOREST-STEPPE OF THE SAMARA REGION

E.V. Matvienko

SSI Povolzshskiy Science Research Institute of Selection and seeds production Named after P.N. Konstantinova
e-mail - opel0076687@yandex.ru

Summary

Results of experiences on efficiency of preseeding processing of seeds against striped spottiness on the sorgovykh cultures in 2010-2012 are presented. As preseeding processing against striped spottiness of seeds of a sugar and grain sorghum of a grade of Kinelskoye 4 and the Premiere it is possible to recommend prestige and грандсил; on a grain sorghum of a grade of Ros high rates of efficiency of preseeding processing of seeds were received in experiences with albite, fitosporiny and grandsily.

Введение. Возбудитель полосатой пятнистости листьев бактерия *Pseudomonas andropogoni* (E. Smith Stapp) широко распространена и губительна для сорго зернового и сахарного. Первые проявления полосатой пятнистости на листьях сорго обычно появляются в первой половине июля в виде красных полос вдоль главной жилки. Образуется обильный экссудат, который засыхает в виде красных пленок или чешуек на нижней поверхности листьев. Этот экссудат часто появляется в виде капли липкой и вязкой в ранние утренние часы. Затем он высыхает, оставляя после себя твердый отпечаток, как правило, красноватого или коричневого цвета. Пятна никогда не отделяются от здоровой ткани красной каймой [5].

В последние годы из-за сильного поражения болезнями сорговые культуры сами стали накопителями многих инфекций и поэтому получение здорового семенного материала в настоящее время очень актуально.

Цель исследований – оценить эффективность предпосевной обработки семян сорговых культур препаратами против полосатой пятнистости в условиях лесостепи Самарской области.

В задачи исследований входило:

– изучить влияние предпосевной обработки семян регуляторами роста с фунгицидным действием (альбит), биопрепаратами (фитоспорин) и химическими препаратами (престиж, грандсил) на распространенность и развитие полосатой пятнистости на сорговых культурах;

– провести в период вегетации учёты по распространенности и развитию полосатой пятнистости на сахарном и на зерновом сорго.

Материалы и методы исследований. Полевые исследования по эффективности предпосевной обработки семян препаратами против полосатой пятнистости на сорговых культурах проводились на опытных полях первого селекционного севооборота ГНУ Поволжского научно-исследовательского института селекции и семеноводства им. П. Н. Константинова, лабораторные – на кафедре химии и защиты растений СГСХА в 2011-2012 гг. Для опытов были взяты сорта зернового сорго Премьера и Рось, сахарного – Кинельское 4.

Почва опытного участка – чернозём обыкновенный среднегумусный среднемощный тяжелосуглинистый. Предшественник – яровая пшеница. Основная предпосевная обработка почвы – общепринятая для поздних культур в данной зоне. Посеву предшествовали две разноглубинные культивации [1, 4]. Посев в 2011 и 2012 гг. проводился ручными сеялками-хлопушками 30 мая.

В 2010 г. были собраны семена зернового сорго сорта Премьера с растений, различавшихся разной степенью поражения красным бактериозом (в среднем 9,3; 45,1; 64,5 и 79,1%). В 2011 г. изучалось действие, а в 2012 г. последействие предпосевной обработки семян с растений, в разной степени пораженных полосатой пятнистости. Предпосевная обработка семян проводилась

непосредственно перед посевом в лабораторных условиях водными растворами следующих препаратов: системным инсектофунгицидом престиж (1 мл/кг); системным фунгицидом грандсил (0,5 мл/кг); биопрепаратом фитоспорин (1 мл/кг) и регулятором роста растений с фунгицидным действием альбит (30 мг/кг), расход рабочей жидкости – 10 мл/кг.

Опыт закладывался в 3-х кратной повторности по методике Б. А. Доспехова (1979) [1], с двухрядковыми делянками, каждая площадью 4,5 м²: длина – 9 м, ширина междурядий – 50 см, глубина посева – 4-5 см.

Учёты распространенности и развития полосатой пятнистости на опыте с предпосевной обработкой семян были проведены в фазу цветения 3 августа 2011 г. и 28 июля 2012 г.; в фазу молочной спелости зерна – 20 августа 2011 г., 7 августа 2012 г., (табл. 1-2).

Бактериальную пятнистость листьев по сортам учитывают в двух несмежных повторениях путем осмотра первого, второго, третьего и четвертого листьев пяти растений подряд, расположенных в пяти равноудаленных друг от друга местах делянки [3]. Учет проводят глазомерно, определяя процент пораженной поверхности листьев [2].

Результаты исследований. В 2011 и 2012 гг. в фазу цветения при посеве семян с растений зернового сорго сорта Премьера, наиболее пораженных бактериозом (79%), получены высокие показатели эффективности предпосевной обработки семян на всех вариантах опыта. При посеве семян с растений, наименее поражённых красным бактериозом (9,3%), сравнительно высокая эффективность применения престижа и грандсила наблюдалась в засушливом 2012 г., когда интенсивность развития бактериоза в фазу цветения уменьшалась, соответственно на 10-27% по сравнению с контролем, однако в 2011 г. предпосевная обработка семян не давала эффекта против полосатой пятнистости. Вариант с применением фитоспорина хорошо зарекомендовал себя в относительно засушливый 2011 г. и сильно засушливый, особенно в начальный этап роста и развития растений, 2012 г.

Сравнительно высокие показатели эффективности предпосевной обработки семян зернового сорго сорта Рось были получены в 2011 г. на вариантах с применением альбита, фитоспорина и грандсила. В 2012 г. варианты с фитоспорином и альбитом не показали достаточной эффективности в защите от полосатой пятнистости и превышали контроль на 26 и 11%, варианты с применением престижа и грандсила показали эффективность предпосевной обработки и снижали интенсивность бактериоза на 21-24%, соответственно (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние предпосевной обработки семян препаратами на распространенность и развитие бактериоза на зерновом и сахарном сорго в 2011-2012 гг. в фазу цветения (дата посева – 30 мая; данные учетов 3 августа – в 2011г., 28 июля – в 2012 г.)

Сорт и степень заражения бактериозом семенных растений в 2010 г., %		*Распространенность (1) и развитие болезни (2), %*	*Контроль*		*Варианты опыта (отклонение от контроля, %)*							
					престиж		*грандсил*		*фитоспорин*		*альбит*	
			2011 г.	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*
Премьера	79,1	1	80	86	-5,0	-23	-5,0	-38	0	-15	+10	-19
		2	4,1	4,3	-22	-23	-4,8	-28	-17	-19	-3	-21
	64,5	1	90	83	+6	-24	+2	-20	+2,2	-8	-2	-12
		2	3,2	3,6	+3	-14	+19	-11	-3,1	-6	+16	-6
	45,1	1	78	83	+3	-40	+8	-32	-7,6	-20	-3	-12
		2	3,5	4,8	-11	-42	+9	-42	-5,7	-27	-23	-29
	9,3	1	88	80	-5	-29	+5	-21	+4,5	-17	0	-17
		2	2,5	3,0	+20	-27	+8	-10	-4,0	-7	+12	-7
Рось		1	84	76	+10	-13	+19	-26	0	0	+5	-4
		2	3,1	3,8	+6	-21	-9,6	-24	-13	+26	-23	+11
Кинельское 4		1	88	73	-5	-36	0	-23	+4,5	+14	+5	-18
		2	2,2	2,8	+5	-18	+18	0	+14	-7	+45	-11

Для сахарного сорго сорта Кинельское 4, варианты с применением престижа, фитоспорина и альбита имели высокий достоверный эффект в защите от полосатой пятнистости в очень засушливый период вегетации 2012 г., интенсивность развития болезни была ниже, соответственно на 18, 7 и 11% чем в контрольном варианте без обработки [6].

В таблице 2 представлены исследования, проведенные в фазу молочной спелости зерна. В острозасушливый в первой половине вегетации и влажный во второй половине 2011 г., на большинстве вариантов с предпосевной обработкой семян сахарного сорго сорта Кинельское 4 и зернового сорго сорта Рось показатели распространенности и развития заболевания были ниже, таковых в контроле.

В 2011 и 2012 гг. при посеве семян с растений зернового сорго сорта Премьера, наиболее пораженных бактериозом (79%), в фазу молочной спелости зерна получены высокие показатели эффективности предпосевной обработки семян на всех вариантах опыта с применением престижа, грандсила, фитоспорина и альбита.

Таблица 2.

Влияние предпосевной обработки семян препаратами на распространенность и развитие бактериоза на зерновом и сахарном сорго в 2011-2012 гг. в фазу молочной спелости зерна (дата посева 30 мая; данные учетов 20 августа в 2011 г., 7 августа – в 2012 г.)

Сорт и степень заражения бактериозом семенных растений в 2010 г., %		*Распространенность (1) и развитие болезни (2), %*	*Контроль*		*Варианты опыта (отклонение от контроля, %)*							
					престиж		*грандсил*		*фитоспорин*		*альбит*	
			2011 г.	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*	*2011 г.*	*2012 г.*
Премьера	79,1	1	92	95	-13	-16	0	-11	-13	-16	+4	-16
		2	5,3	10	-11	-57	-13	-37	-9,4	-30	-3,7	-35
	64,5	1	92	90	+4	-22	0	-11	0	-5,5	-4,3	-6
		2	5,0	6,7	0	-45	-6,0	-33	-10	-19	-4,0	-24
	45,1	1	88	85	-9	-5,8	-4,5	0	-18	0	-14	0
		2	5,0	7,4	-16	-42	-12	-49	-4,0	-26	-6,0	+9
	9,3	1	88	85	0	-24	+4,5	-24	+5	-2,0	+9	-12
		2	4,2	5,4	+40	-28	+36	-26	0	-11	-2,3	-6
Рось		1	92	95	+4	-26	+8,6	-5,2	0	-5,2	-4,3	-16
		2	5,2	12	-13	-55	+9,6	-38	-9,6	-18	+37	-38
Кинельское 4		1	92	91	0	-24	-4,3	-29	0	-7,2	0	-18
		2	6,0	4,8	+12	-19	-25	-27	-20	-17	-25	0

При посеве семян с растений, наименее поражённых бактериозом (9,3%), высокие показатели эффективности предпосевной обработки семян были получены в 2012 г., на вариантах с применением престижа и грандсила, интенсивность развития полосатой пятнистости была ниже на 26-28%, чем таковая в контроле.

Коэффициенты корреляции между распространенностью бактериоза и урожайностью культуры составили r = -0,228 – -0,393, а между развитием болезни и урожайностью r = -0,374 – -0,471.

На основе исследований, проведенных в 2010-2012 гг. в условиях лесостепи Самарской области, можно сделать следующие ***выводы:***

1) В качестве предпосевной обработки против полосатой пятнистости семян сахарного и зернового сорго сорта Кинельское 4 и Премьера можно рекомендовать престиж и грандсил; на зерновом сорго сорта Рось высокие показатели эффективности предпосевной обработки семян были получены в опытах с альбитом, фитоспорином и грандсилом;

2) Если сравнить сорта зернового сорго Премьера и Рось, а также сорт сахарного сорго Кинельское 4 между собой, то получится, что в среднем зерновое сорго поражались полосатой пятнистости больше в течение вегетации, чем сахарное.

Литература

1. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М. : Колос, 1979. – 416 с.
2. Каплин В.Г. Учебная практика по защите растений: учебно-методическое пособие / В. Г. Каплин, А. М. Макеева, А. Б. Кошелева, Н. Р. Авраменко. – Самара, 2004. – 142 с.
3. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. – М., 1971. – Вып. 1. – 225 с.
4. Методика по оценке устойчивости сортов полевых культур к болезням на инфекционных и провокационных фонах. – М. : Россельхозакадемии, 2000. – 88 с.
5. Станчева Й. Атлас болезней сельскохозяйственных культур. – М., 2003. – №3. – С. 28-58.
6. Матвиенко Е.В. Эффективность предпосевной обработки семян препаратами против красного бактериоза на сорговых культурах в лесостепи Самарской области / Е.В.Матвиенко//ИзвестияСГСХА.–2013.–№4–С.54-59

СОСУДИСТЫЙ БАКТЕРИОЗ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В ЦЧР

Г.А. Селиванова, Л.Н. Путилина
Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы имени А.Л. Мазлумова
e-mail: g.selivanova@mail.ru

VASCULAR BACTERIOSIS OF SUGAR BEET IN THE CENTRAL BLACK-EARTH REGION

G.A. Selivanova, L.N. Putilina
The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet
e-mail: g.selivanova@mail.ru

Summary

The factors influencing accumulation of phytopathogenic microorganisms in soil connected with nonobservance of agrotechnics for intensification of agricultural production are considered. External traits and features of pathogenesis of the most harmful disease agents have been described. Measures to prevent development of sugar beet vascular bacteriosis have been indicated.

Scale indicating a degree of plant affection by this disease was developed. Technological qualities of beet row material affected in a different degree by vascular bacteriosis were studied.

В последние годы все более возрастает вредоносность бактериальных гнилей целого ряда сельскохозяйственных культур [2]. Среди причин, обусловивших это явление, стоит изменение погодных условий в сторону повышения среднегодовых температур, способствующих размножению фитопатогенных бактерий и неблагоприятных для развития растений; нарушения агротехники, заключающиеся в увеличении доли монокультуры в севообороте, нарушении технологии основной обработки почвы; применение возрастающих объемов пестицидов, угнетающих сапротрофную антагонистическую микробиоту почвы. Не самое последнее место в распространении бактериозов занимает использование в агробиоценозах в качестве средств защиты растений, а также в качестве протравителей семян только *фунгицидных* препаратов. Подавление фитопатогенных грибов освобождает нишу для возбудителей бактериальных болезней, которыми при наличии стресс-факторов могут стать обычные почвообитающие микроорганизмы, обладающие широким набором гидролитических ферментов.

В ЦЧР наиболее экономически значимыми для сахарной свеклы много лет были болезни грибной этиологии: церкоспороз, эризифоз и фузариозная гниль корнеплодов. Из бактериозов этой культуры известны бактериальная пятнистость листьев, гоммоз (или хвостовая гниль, встречается на поливной свекле), слизистый бактериоз (развивается в тканях корнеплода при дефиците бора в почве), а также рак и туберкулез, проявляющиеся в виде наростов в верхней части корнеплода. Перечисленные болезни бактериальной этиологии не имеют широкого распространения и развития в этом регионе. Ситуация изменилась с 2008 – 2009 годов, когда свеклосеющие хозяйства ЦЧР стали нести экономически значимые потери от сосудистого увядания сахарной свеклы, вызываемого комплексом бактерий, и приводящего к массовой гибели растений в процессе вегетации. Болезнь распространяется очагами (рис. 1). К концу вегетации площадь очагов погибших растений местами составляла до 70 % площади поля.

Рис. 1. Очаги поражения сосудистым бактериозом на свекловичном поле

Наблюдениями за посевами было установлено, что гибели растений, проявляющейся в усыхании листового аппарата, потере тургора и загнивании корнеплода, предшествует увядание листьев отдельных растений, отмечающееся уже в начале – середине июля (когда интенсивно разрастается корнеплод). Вслед за увяданием листового аппарата или усыханием единичных листьев в жаркую и сухую погоду происходит потеря тургора в нижней части корнеплода. Такие растения легко выдергиваются из почвы даже при достаточно большой массе корнеплода. На разрезе корнеплода выделяются потемневшие сосудисто-проводящие пучки. Постепенно все листья усыхают, а корнеплод теряет тургор и загнивает. Максимальное развитие болезни и загнивание корнеплодов происходит в конце августа – сентябре.

Видовой состав возбудителей определен в Центре «Биоинженерия» (А.Н. Игнатов): несколько видов из родов *Pectobacterium, Pseudomonas* (в том числе *Ps. syringae*), *Bacillus mesentericus* и *Pantoea agglomerans.* Проникновение возбудителей в сосуды может осуществляться как из почвы через поврежденные корневые волоски, так и из инфицированного семени: при прорастании семян инфекция заражает всходы и постепенно накапливается в сосудистой системе корнеплода. Возрастающая бактериальная масса нарушает транспорт воды по сосудам, что приводит к увяданию листьев и потере тургора корнеплода; кроме того, бактерии оказывают токсическое действие на близлежащие к сосудам клетки паренхимы. Сапротрофная микрофлора, заселяющая потерявшие тургор ткани, ускоряет загнивание корнеплода.

Бактерии, заселяющие сосудистую систему сахарной свеклы, относятся к факультативным паразитам, способным развиваться в корневой системе при ослаблении растений в результате ухудшения условий существования (засуха или обильные осадки, истощение и переуплотнение почвы и т.п.). В ЦЧР основным стрессовым фактором, ослабляющим растения, является длительная засуха весной, ослабляющая растения в начальном периоде вегетации. Почвенные микроорганизмы также нуждаются в источнике влаги, которым для них в период засухи являются живые растительные ткани. Сапротрофы, поселяющиеся на ослабленных растениях, обладают соответствующими ферментами для внедрения в ткани корня. В дальнейшем резкая смена засушливых и влажных периодов благоприятствует активизации патогенных организмов.

Другой важный стрессовый фактор, препятствующий нормальному развитию растений и способствующий развитию болезни – эдафический, определяющийся низким уровнем агротехники. В большинстве свеклосеющих хозяйств региона грубо нарушаются установленные много лет назад и проверенные на практике правила землепользования: безотвальная основная обработка почвы под сахарную свеклу, отсутствие междурядных культиваций, короткие севообороты вплоть до монокультуры. Более десятка лет не вносятся органические удобрения; это при выращивании гибридов интенсивного типа приводит к истощению запасов органического вещества в почве, снижению ее водоудерживающей способности, ухудшению структуры [1], что и наблюдается при обследованиях свекловичных полей с развитием бактериоза. Произошло обесструктуривание почвы и переуплотнение нижней части пахотного горизонта . Минеральные удобрения при длительном использовании приводят к закислению и токсикозу, а также оказывают деструктивное влияние на гумус [5]. Но и они зачастую вносятся в недостаточном количестве в целях экономии.

При всем многообразии агротехнических факторов, способствующих развитию бактериоза, существенное влияние на интенсивность развития болезни играют погодные условия вегетационного сезона: в засушливые годы частота встречаемости, степень развития и площадь очагов поражения возрастала. Именно этим объясняется тот факт, что наибольшие потери свекловичного сырья от сосудистого бактериоза отмечались в южных регионах свеклосеяния, где засушливые условия наиболее резко выражены.

В центральных и северных районах ЦЧР, где гидротермический режим более благоприятен для выращивания сахарной свеклы, развитие болезни протекает менее выраженно. Отмечено, что при обильных осадках в конце вегетации (как это было в 2012 – 2013 годах) пораженные сосудистым бактериозом растения не погибают; их очень трудно отличить от здоровых по внешнему виду, поскольку наличие достаточного количества влаги позволяет поддерживать нормальный тургор, маскируя внешние признаки поражения. В этом случае обнаружить, поражен корнеплод или нет, можно только на поперечном срезе в хвостовой части по пожелтевшим или потемневшим кольцам сосудов, на что производственники обычно не обращают внимания. Такое в слабой степени пораженное бактериями свекловичное сырье поступает на переработку. В последние годы в свеклосахарной отрасли наблюдается устойчивое снижение сахаристости свекловичного сырья с 17 – 19 % до 14 – 16 %, что может быть обусловлено именно массовой пораженностью корнеплодов в скрытой форме.

По результатам обследований свекловичных полей в 2011-2013 годах в разных районах ЦЧР составлена шкала пораженности сахарной свеклы сосудистым бактериозом (табл. 1).

Таблица 1.
Шкала поражённости сахарной свёклы сосудистым бактериозом

Оценка поражённости корнеплодов (балл)	*Признаки заболевания*
0	Здоровые растения: листовой аппарат в хорошо развитом состоянии, растение выдергивается из почвы с большим усилием
1	Единичные листья усохли, остальные могут иметь признаки увядания, корнеплод выдергивается из почвы с меньшим усилием, хвостовая часть корнеплода слегка привядшая, изгибается без обламывания
2	Листья нижнего яруса усохли, остальные привядшие, корнеплод выдергивается из почвы с незначительным усилием, нижняя часть корня (15 %) имеет ослабленный тургор, на разрезе изменений сосудистых пучков не обнаруживается
3	Отмирание листового аппарата на 50 %, корнеплод выдергивается из почвы легко, нижняя часть корня (30 %) имеет ослабленный тургор, на разрезе наблюдается изменение цвета сосудистых пучков, может иметь место загнивание хвостовой части корня
4	Отмирание листового аппарата на 75 %, корнеплод выдергивается из почвы легко, нижняя часть корня (50 %) имеет ослабленный тургор, на продольном разрезе отчетливо видно потемнение сосудистых пучков, наружные ткани хвостовой части корня имеют серо-коричневый цвет, загнивание нижней части корнеплода
5	Листовой аппарат усох, корнеплод (на 75 % и более) потерял тургор, наружные ткани имеют серо-коричневый или черный цвет, от 50 до 100% корня поражено гнилью

В процессе жизнедеятельности фитопатогенные бактерии могут перехватывать определенные элементы минерального питания растений, перемещающиеся по сосудам ксилемы, а своими продуктами метаболизма, содержащими такие биологически активные вещества как ферменты и токсины, нарушать клеточный метаболизм растительных тканей [3]. Это может привести к замедлению накопления сахарозы, трансформации растворимых азотистых соединений в легко удаляемые белковые формы, накоплению зольных элементов, что снижает технологические качества производимого сырья. Более того, известны данные о том, что при сосудистых поражениях растений в их тканях происходит снижение концентрации сахарозы [4].

В свете вышеизложенного представляет научный и практический интерес определение влияния возбудителей сосудистого бактериоза на технологические качества свекловичного сырья, поражённого болезнью в разной степени. Технологические качества корнеплодов сахарной свеклы представляют собой комплекс свойств, определяющих выход и качество кристаллического сахара в процентах к весу переработанной свеклы, а также размер потерь в процессе его производства. Прежде всего, это сахаристость корнеплодов – процентное содержание сахара. Кроме того, качество свекловичного сырья определяется количеством примесей редуцирующих веществ (РВ), состоящих из моносахаров, и «несахаров», состоящих из органических кислот, белковых веществ, зольных элементов, α-аминного азота, снижающих количество и ухудшающих качество получаемого сахара.

Технологический анализ корнеплодов провели в лаборатории хранения сахарной свеклы ВНИИСС в 2013 году. Вегетационный сезон года характеризовался повышенным количеством осадков в июле (когда начинается накопление бактерий в сосудисто-проводящей системе интенсивно разрастающихся корнеплодов), и обилием осадков в сентябре, что существенно ослабило развитие бактериоза. Поэтому в прошедшем вегетационном сезоне поражение растений в основном составило 2-3 балла.

Отбор проб для технологического анализа проводился сотрудниками лаборатории иммунитета перед уборкой (в начале октября): проба здоровых растений и проба растений с усохшим нижним ярусом листьев и изменением цвета сосудов в нижней части корнеплодов (соответствуют 3 баллам по шкале пораженности). Для анализа взяты корнеплоды сахарной свеклы гибрида Каньон с опытного поля ВНИИСС (Рамонский район).

Наличие бактерий в сосудах и тканях подтверждено фитопатологическим анализом.

По результатам технологического анализа (табл. 2) обнаружены значительные различия между пробами по ряду параметров. Сахаристость корнеплодов с признаками поражения сосудистым бактериозом снизилась с 16,40 до 15,80 %. Содержание редуцирующих веществ в свёкле в 2 с лишним раза превысило таковое

в здоровых тканях, составляющее 0,077%, содержание α-аминного азота увеличилось с 2,93 до 4,54 ммоль/100 г свёклы. Содержание щелочных элементов в пробе пораженных растений несколько возросло, а общая щелочность клеточного сока этой пробы возросла в 1,7 раза по сравнению с соком здоровых корнеплодов. Возбудители сосудистого бактериоза оказали влияние на качество свекловичного и очищенного соков: чистота снизилась, а содержание солей кальция увеличилось в 1,5 раза.

Таким образом, вредоносность сосудистого бактериоза сахарной свеклы состоит не только в снижении урожая вследствие усыхания и загнивания корнеплодов в поле, но и в снижении сахаристости и ухудшении технологических качеств внешне здоровых корнеплодов вследствие бактериального инфицирования их сосудисто-проводящей системы в период вегетации. Получены экспериментальные данные, подтверждающие ухудшение качества свекловичного сырья под влиянием фитопатогенных бактерий.

Таблица 2.
Технологические и химические показатели корнеплодов сахарной свёклы

№ п/п	*Исследуемые параметры*	*Единица измерения*	*Проба*	
			1 (больные)	*2 (здоровые)*
1. Свёкла				
1.1.	Сахаристость	%	15,80	16,40
1.2.	Содержание калия	(ммоль/100 г свёклы)	2,27	2,23
1.3.	Содержание натрия	(ммоль/100 г свёклы)	1,20	1,17
1.4.	Содержание α-аминного азота	(ммоль/100 г свёклы)	4,54	2,93
1.5.	Массовая доля РВ	%	0,167	0,077
1.6.	Массовая доля углекислой золы	%	0,367	0,323
2. Нормальный клеточный сок				
2.1.	Чистота	%	85,50	87,80
3. Очищенный клеточный сок				
3.1.	Массовая доля солей Са	%CaO	0,068	0,045
3.2.	Натуральная щелочность	%CaO	0,053	0,033
3.3.	Чистота	%	88,40	91,80

Литература

1. Елфимов М.Н. Влияние систем обработки и удобрений на структурное состояние чернозема выщелоченного / М.Н. Елфимов// Инновации в свеклосахарном производстве: Сб. науч. тр. – Воронеж, 2012. – С.218 – 222.
2. Игнатов А.Н. Распространение возбудителей опасных бактериозов растений в Российской Федерации: реальность опережает прогноз / А.Н. Игнатов, А.М. Лазарева // Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем: III Всероссийский съезд по защите растений. – С.-Петербург, 2013. С. 240 – 242.
3. Купревич В. Ф. Физиология больного растения в связи с общими вопросами паразитизма. – М. - Л. – 1947. – 247 С.
4. Матышевская М.С. Влияние фитопатогенных бактерий на физиолого-биохимические свойства растений / М.С. Матышевская. – Киев: Наукова Думка, 1975. – 233 с.
5. Цвей Я.П. Влияние удобрений в зерносвекловичном севообороте на содержание гумуса / Я.П. Цвей, В.В. Иванина, О.Т. Петрова // Сахарная свекла. – 2012. – № 3. – С.24 – 26.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФИТОПЛАЗМИНА ПРОТИВ ПРИКОРНЕВОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГНИЛИ ОГУРЦА

О.Н. Смирнова, Л.Г. Сметанина, К.Л. Алексеева
Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства
e-mail: vniio@yandex.ru

ON THE EFFECTIVENESS OF PHYTOPLAZMIN AGAINST THE BACTERIAL ROOT ROT OF CUCUMBER

O.N. Smirnova, L.G. Smetanina, K.L. Alekseeva
Russian Research Institute of Vegetable Growing, Moscow region
e-mail: vniio@yandex.ru

Summary

The effect of water soluble concentrate of Phytoplasmin (based on antibiotic isolated from the soil actinomycete Streptomyces fradiae) on root rot of cucumber in greenhouses was studied. Its biological efficacy under high infectious background is about 70%. The application of Phytoplasmin allows the prolongation of protection period against the root rot of cucumber not less then 21 - 28 days. The optimal dose and timing of treatment are recommended.

Огурец является наиболее распространенной культурой защищенного грунта, характеризуется быстрыми темпами отдачи урожая, высокой урожайностью, однако в значительной степени поражается болезнями и вредителями. Значительный ущерб культуре огурца, особенно в пленочных теплицах, наносят бактериальные болезни, среди которых наиболее вредоносны прикорневая бактериальная гниль (возбудитель *Erwinia tracheiphila (*Smith) Bergey et al.), бактериальная гниль корневой шейки (возбудитель *Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora),* угловатая пятнистость листьев (возбудитель *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* (Smith et Bryan) Young et al.). В результате ослабления и выпадов растений при эпифитотийном развитии бактериозов значительно снижается выход товарной продукции, ухудшается качество плодов, за счет досрочной ликвидации культуры продолжительность оборота сокращается на 2-3 месяца. (Будынков и др., 2001; Алексеева, 2010). Для предотвращения развития заболевания необходимы обработки бактерицидными препаратами.

Высокой бактерицидной активностью обладают препараты на основе стрептомициновых антибиотиков. Наиболее технологичны для применения в хозяйствах водорастворимые концентраты (ВРК) этих препаратов, так как, в отличие от смачивающихся порошков, они не засоряют капельницы поливной системы.

В задачу исследований входило оценить эффективность препарата Фитоплазмин, ВРК производства ООО НБЦ «Фармбиомедсервис» против прикорневой бактериальной гнили огурца. Действующее вещество (д.в.) Фитоплазмина – комплекс макролидных антибиотиков на основе почвенного актиномицета *Streptomyces fradiae*. В качестве эталона использовали Фитолавин, ВРК (действующее вещество (д.в.) – антибиотик фитобактериомицин (ФБМ) на основе *Streptomyces. spp*.), разрешенный для применения на овощных культурах в РФ.

Работа выполнялась в пленочной грунтовой теплице ВНИИ овощеводства (Московская область, Раменский район) в 2012–2013 гг. В опыте использовали партенокарпический гибрид F1 Рябинушка селекции ВНИИО, предназначенный для выращивания в весенних пленочных теплицах и открытом грунте. Посев семян проводили 7 мая в горшки 10х10 см, наполненные рассадной смесью (торф низинный, торф верховой Агробалт, опилки). Рассаду выращивали в течение 23 суток. Уход за рассадой включал 2 подкормки комплексным минеральным удобрением Кемира, поливы. Высадку рассады в грунтовую пленочную теплицу осуществляли 31 мая. Лунки копали по двухстрочной схеме 90х50 с расстоянием между лунками 35х40 см. Густота посадки 2,5 растения на 1м^2. Растения формировали в 1 стебель, подвязывали на шпагате к шпалерам 2 м высотой. Уход за культурой осуществляли в соответствии с принятой технологией. Эффективность дейст-вия бактерицида Фитоплазмин изучали при трехкратном внесении препарата путем полива под корень при норме расхода 8 л/га. Первую обработку проводили через 2 недели после высадки растений в грунт, вторую и третью – с интервалом 3 недели. В контрольном варианте растения обрабатывали водой,

в эталонном варианте вносили Фитолавин, ВРК, 8 л/га. Расход рабочей жидкости 1000 л/га. Опыты закладывали с использованием стандартных методик, принятых в овощеводстве (Литвинов, 2011). Повторность опыта 4-х кратная. Площадь опытной делянки 10 м^2 учетной делянки - 5 м^2. Учеты развития болезни проводили в соответствии с «Методическими указаниями...., 2009) по 4-х балльной шкале: 0 – отсутствие увядания, 1- увядание 3-4 листьев, 2- увядание 50% листьев, 3 – увядание всего растения.

Как показали наблюдения за динамикой развития болезни, первые симптомы прикорневой бактериальной гнили начинают появляться в теплице в начале плодоношения, и при недостаточном контроле инфекция может распространяться быстрыми темпами, вызывая ослабление и выпады растений. Патогенные бактерии проникают в растение через корни и разрушают сосудистую систему. Типичные симптомы заболевания проявляются в виде увядания и пожелтения листьев, начиная с нижних, при сохранении зелёной окраски стебля. У пораженных растений замедляются процессы роста и развития, снижается тургор, постепенно они увядают и засыхают.

В результате проведенных испытаний установлено, что обработки препаратом Фитоплазмин, ВРК существенно снижали темпы развития прикорневой бактериальной гнили растений огурца по сравнению с контролем и снижает их вредоносность. На варианте опыта с применением бактерицида первые симптомы болезни появились на 16 суток позднее, чем в контроле. Учеты, проведенные на 10-е сутки после последней обработки показали, что степень развития болезни в вариантах 2 и 3 составила 9,3-9,9%, в контроле - 32,8% (таблица 1).

В условиях пленочных теплиц на высоком инфекционном фоне биологическая эффективность обработок бактерицидами составила 69,8-71,6 %.

Таблица 1.

Биологическая эффективность препарата Фитоплазмин, ВРК против прикорневой бактериальной гнили огурца

Вариант опыта	*Развитие болезни, %*	*Биологическая эффективность, %*	*Средняя урожайность, кг/м^2*	*Величина сохраненного урожая, кг/м^2*
1. Контроль - вода	32,8	-	9,4	-
2. Эталон - Фитолавин, ВРК 8 л/га	9,9	69,8	10,8	1,4
3.Фитоплазмин, ВРК 8 л/га	9,3	71,6	11,2	1,8
$НСР_{05}$	-	-	1,3	-

Фитоплазмин обладает не только контактным, но, что особенно важно, системным действием. Действующие вещества Фитоплазмина, как и Фитолавина, легко проникают в растения и циркулируют по их тканям, взаимодействуют с рибосомами патогенных бактерий, подавляя синтез белка и нарушая правильность считывания генетического кода возбудителей бактериозов (Алексеева, Борисова, 2012). Применение Фитоплазмина позволяет растениям длительное время противостоять внедрению в них возбудителей заболевания. Период защитного действия составляет не менее 21-28 суток. В системе защиты огурца от бактериозов возможно чередование препаратов Фитолавин и Фитоплазмин с интервалом 3 – 4 недели.

Литература

1. Алексеева К. Л. Водорастворимые концентраты фитолавина и фитоплазмина в системе защиты томата от бактериозов // Сб. научн. Трудов РУП «Институт овощеводства» НАН Беларуси: «Овощеводство». Минск, 2010. Т. 18. С. 143 – 147.
2. Алексеева К.Л., Бирюкова Н.К., Масловская Е.М., Сметанина Л.Г.// Экологически безопасные приёмы защиты огурца от болезней в плёночных теплицах (Руководство). – М.: ГНУ ВНИИО, 2010. – 32 С.
3. Алексеева К.Л., Борисова И.П. Применение фитолавина и фитоплазмина против бактериальных болезней овощных культур. – Вестник овощевода, 2012, № 2, с. 19 – 21.
4. Будынков Н.И., Никифорова, Е.Ф., Березина Н.В. и др. Эффективность препарата фитолавин-300 против заболеваний овощных культур защищенного грунта.// Гавриш, 2001.– №1. – с.26-28.
3. Литвинов С.С. Методика полевого опыта в овощеводстве.– М.,2011.–679 с.
5. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве/ под ред. В.И.Долженко. – С.-Петербург: ВИЗР, 2009.– 378 с.

БОРОДАТОСТЬ КОРНЕЙ ТЕПЛИЧНОГО ОГУРЦА В РОССИИ

М.В. Ходыкина[1], Э.Ш. Пехтерева[2], Е.И. Кырова[1], С.В. Виноградова[3], А.К. Ахатов[4], В.Н. Юваров[5], И.П. Борисова[6], А.Н. Игнатов [1,2,3]

[1] Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва;
[2] ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы; [3] Центр «Биоинженерия» РАН, Москва;
[4] независимый эксперт, Московская область; [5] ООО Торговый Дом «Агробиотехнология», Москва;
[6] ООО НБЦ «Фармбиомед», Москва

HAIRED ROOTS OF GREENHOUSE CUCUMBERS IN RUSSIA

M.V. Khodykina[1], E.SH. Pekhtereva[2], E.I. Kyrova[1], S.V. Vinogradova[3], A.K. Akhatov[4], V.N. Yuvarov[5], I.P. Borisova[6], A.N. Ignatov[1,2,3]

[1] Russian Peoples' Friendship University (University), Moscow;
[2] Russian Research Institute of Phytopathology, B. Vyazemy;
[3] Center "Bioengineering" of RAS, Moscow;
[4] independent expert, Moscow region; [5] "Agrobiotechnology", Moscow;
[6] "Farmbiomed", Moscow

Summary

In 2013, we found in a number of greenhouses in Russia new disease of cucumber and tomato called in other countries "hairy/haired root" or "crown galls". In England and France, the disease became known as «root mat», «excessive root growth», or «crazy roots».

В 2013 г. в ряде тепличных хозяйств России было отмечено поражение культуры огурца, выращиваемого на минеральной вате. В 2014 г. вредоносность заболевания возросла, особенно на светокультуре при выращивании на минеральной вате с использованием интерплантинга. Это заболевание, ранее не встречавшееся на территории России, имеет несколько названий: «косматый корень», «корончатые галлы», «бородатый корень». В Англии, а затем и во Франции, болезнь получила названия: «root mat» (корневой коврик), «excessive root growth» (чрезмерный рост корня) или «crazy roots» (бешеные корни).

Возбудителем заболевания является форма бактерии ***Argobacterium биовар 1***, несущая плазмиду ***Ri*** (***pRi***) (Weller *et al*., 2000). Бактерии проникают в растения через ранки корня или стебля и размножаются в межклеточном пространстве. Симптомы заболевания проявляются после переноса в растительную клетку фрагмента Т-ДНК (***pRi*** DNA). Гены Т-ДНК из плазмиды ***Ri*** отвечают за синтез ауксина и цитокининов в растительной ткани, из-за чего происходит разрастание корней, а также синтез опина (производное аминокислоты аргинин), который усваивается только бактериальными клетками ***Agrobacterium***, находящимися внутри и вне растения.

На огурцах же подобное заболевание у нас отмечено впервые, хотя в Великобритании оно регистрировалось еще в 70-х годах прошлого века. Тогда болезнь удалось подавить. Повторная вспышка случилась в 1993 г. в гидропонной культуре огурца и томата. **Симптомы новой болезни** развиваются постепенно, первые признаки замечают примерно через месяц после заражения. При снятии пленки с блока минваты видно, что переплетение корней образует сплошной ковер. Урожайность культуры даже при отсутствии других болезеней снижается на 15-20%, ухудшается товарный вид зеленцов за счет увеличения доли изогнутых плодов и плодов с заостренной вершиной. На поздней стадии болезни растения увядают и отмирают из-за распространения самих агробактерий и сопутствующих вторичных патогенов по сосудам. Источники первичной инфекции могут быть в поливной воде, в семенах, в субстрате или в других агрохимикатах. Возможна передача инфекции насекомыми, нематодами, с рассадой, рециркуляционной водой и рабочими в процессе ухода за посадками.

В 2014 г. нами были получены пораженные растения из трёх тепличных хозяйств России (Новгородская, Ульяновская и Тульская области) для диагностики заболевания растений огурца и определения первичных источников заражения. Симптомы заболевания соответствовали известным описаниям «бородатости» корней.

По общепринятым **микробиологическим методам** (Schaad et al., 2001) из разных частей растений (корней, стеблей, галлов), из речной воды, из скважины, из поливной воды после фильтрации, из капельниц, дренажа и семян огурца выделяли фитопатогенные бактерии в чистую культуру на неселективные среды (YDC, NA) (Schaad et al., 2001). Полученные колонии отсевали и определяли их

биохимические признаки свойства в соответствии с руководством по определению фитопатогенных бактерий (Schaad et al., 2001).

ПЦР диагностику проводили с праймерами и пробой, специфичными для гена GALLS на плазмиде Ri (Weller, Stead, 2002). Последовательности праймеров и пробы даны представлены в таблице 1. Они были комплементарны последовательности гена Т-ДНК штамма ***A.radiobacter*** (NCPPB 2659) (ген rolA). Проба ***rol-Pr*** была связана с красителем FAM на 5' конце, и гасителем флуоресценции TAMRA на 3' конце.

Заражение растений огурца и томата трех различных сортов проводили в стадии фазе 1-го настоящего листа методом укола иглой с культурой бактерии в семядольный лист.

Таблица 1.
Последовательности *rol* праймеров и *TaqMan* пробы, использованных при диагностике возбудителя (по: Weller and Stead, 2002)

Праймер/Зонд	*Последовательность (5'-3')*	*Длина (нт)*
rol-F	GGC GAT AAA ACC TTC CAG ATC A	22
rol-R	GTC CGT GCT CAC AAC ATT GC	20
rol-Pr	CGC ACC GCC GCG TGG AA	17

Результаты и обсуждение

Бактерии, сходные с ***A. radiobacter,*** были выделены из растений, воды и субстрата во всех трех изученных местах сбора образцов из всех трех перечисленных тепличных хозяйств. Всего было отобрано 45 изолятов, соответствовавших по морфологическим признакам агробактериям на селективной среде. Бактерии, выделенные из растений, воды в поливной и дренажной системах и субстрата, были определены по совокупности признаков как ***Agrobacterium* sp**. В Новгородской обл. патоген был выделен из речной воды в концентрации не менее 10 КОИ в 1 мл.

Выделение бактерий в чистую культуру из семян было безуспешным, но ПЦР анализ дал единичные положительные результаты.

Кроме того, по морфологическим и биохимическим признакам изолятов бактерий, полученных на неселективных средах, нами было показано наличие в большинстве изученных образцов бактерий рода ***Pseudomonas*** (группы LOPAT 1 и 5) и пектолитических энтеробактерий (в основном ***Pectobacterium carotovorum***).

Возбудители «бородатого» корня в тепличных хозяйствах РФ соответствовали описанию вида ***A. radiobacter***: грамотрицательные палочки, подвижные, с одним полярным жгутиком, со слизистой капсулой.

Форма колоний на среде YDC круглая, до 2-6 мм в диаметре, поверхность гладкая, приподнято-выпуклая, края колоний гладкие. Внутренняя структура колоний зернистая; колонии просвечивающие, окраска их в проходящем свете от серой до почти белой (рис.9).

Бактерии желатин не разжижают. На среде с глицеро-фосфатом и маннитом роста почти нет. На молоке образуют кислоты, лакмусовое молоко сначала краснеет, потом слегка редуцируется и образует из сыворотки на поверхности небольшое светлое кольцо, которое позднее исчезает. Рост прекращается при pH 4,0. Нитраты не редуцируют. Кислоты образуют без выделения газа из арабинозы, ксилозы, рамнозы, глюкозы, галактозы, маннозы, мальтозы, лактозы и салицина. Оптимальная температура для роста в пределах от 20 до 28°С.

Типичные симптомы проявляются на рассаде огурца через 4-5 недель после инокуляции в семядольный лист; заражаются также растения томата и других овощных культур.

От 70 до 80% выделенных штаммов агробактерий имели положительную реакцию с праймерами ***rol-F/R*** при классическом ПЦР анализе и с пробой ***rol-Pr*** при ПЦР в реальном времени. Все выделенные штаммы, положительные по ПРЦ реакции, вызывали симптомы заболевания при искусственной инокуляции растений огурца, но только часть из них заражала растения томата.

Таким образом, впервые в Российской Федерации обнаружено новое экономически вредоносное заболевание огурца и других овощных культур в условиях защищенного грунта – «бородатость» корней, вызываемое особой группой штаммов вида ***A. radiobacter***. В одном случае патоген был обнаружен в речной воде, использовавшейся для полива без обеззараживания, и мог попасть в воду со смывом с экспортируемой овощной продукции, проходящей предпродажную обработку на соседних с тепличным комплексом предприятиях. Распространение возбудителя семенами пока не подтверждено, но случаи семенной инфекции ***Agrobacterium*** на других культурах хорошо известны.

Патоген сохраняется в почве и в воде неограниченное длительное время, выживает в субстрате даже после стерилизации паром. Как правило, агробактерия устойчива к антибиотикам и препаратам меди; быстро теряет восприимчивость при регулярном применении антибактериальных препаратов.

Развитие вторичных патогенов на растениях, пораженных «бородатостью» корня, усиливается в 1,5-2,3 раза. Экономический ущерб от этого заболевания в Великобритании составляет от 15 до 36 тыс. фунтов стерлингов на гектар.

В связи с возникшей ситуацией, требующей незамедлительного практического решения, для одного из хозяйств, нами был предложен оперативный первичный план мероприятий для снижения вредоносности болезни. Пренебрежение мерами борьбы против этого нового патогена может в скором времени сделать производство овощей в теплицах нерентабельным.

Литература

Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Б., Мешков Ю.И., Джалилов Ф.С., Чижов В.Н., Игнатов А.Н., Полищук В.П. Защита картофеля и овощных культур открытого грунта. Товарищество научных издание КМК, М. 2013. С.200.

Weller S.A. and D.E. Stead Detection of root mat associated Agrobacterium strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. Journal of Applied Microbiology 2002, 92, 118-126

Weller SA, Stead DE, O'Neill TM, Hargreaves D, McPherson GM, 2000. Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 strains and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathology* 49, 43–50.

Weller SA, Stead DE, Young JPW, 2004. Acquisition of an *Agrobacterium* Ri plasmid, and pathogenicity, by other alfa-Proteobacteria in cucumber and tomato crops affected by root mat. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2779–85.

Schaad, N. W., et al. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun, APS Press, 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, MN, 55121-2097, USA**:** i-xii; 1-373.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АБИОГЕННЫХ ЭЛИСИТОРОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ К ПОРАЖЕНИЮ ПОРАЖЕНИИ ФУЗАРИОЗОМ

Е.К. Яблонская, В.В. Котляров

Кубанский Государственный аграрный университет

THE INFLUENCE OF ABIOGENIC ELICITORS ON WINTER WHEAT DAMAGE BY FUSARIUM

E.K. Jablonskay, V.V. Kotlyarov

Kuban State Agrarian University

Summary

Treatment of plants by furolanom, furolanom with methionine allows you to change the anatomical structure of the leaves and improve drought and disease tolerance of wheat.

Среди актуальных эколого-гигиенических проблем России и сопредельных стран СНГ весьма вредоносными являются грибные болезни зерновых колосовых культур, в частности фузариоз колоса озимой пшеницы, который носит эпифитотный характер и значительно распространен. Поэтому поиск эффективных препаратов для борьбы с фитопатогенами приобретает все большую актуальность. Так, только в период с 1993 по 2014 г. за счет болезней зерновых, в первую очередь гнилей, потери зерна в России превысили 230,6 млн т, что составляет в среднем от 6 до 29% ежегодного валового сбора [1].

Патоген поражает растения в течение всего периода вегетации. Заболевание стремительно развивается при чрезмерно раннем, либо позднем сроках сева; плохой закалки растений осенью; Усиливают поражение насыщение севооборотов пшеницей и рожью, зерновые предшественники, засоренность посевов, невыровненность поля, превышение дозы азотных удобрений осенью. Источником инфекции служат зараженные семена, перезимовавшие растения, пораженные фузариозной гнилью. Фузариозная корневая гниль вызывает гибель проростков, гниль корней, подземного междоузлия и основания стеблей, угнетает рост растений, вызывает гибель продуктивных стеблей, полегание, через зерницу, развитие неполноценного колоса с щуплым зерном.

Болезнь поражает все злаки. Получаемое щуплое, с рыхлым эндоспермом зерно приводит

к потери 25-30% урожая. Поражая зерно, грибы вызывают разложение белковых веществ с выделением микотоксинов, которые накапливаются в зерне.

Основные ареалы фузариозов размещены в южных районах России, в частности, на территории Ставропольского и Краснодарского края (в том числе Староминской, Тбилисский, Майкопский). В Краснодарском крае в 2013 году корневыми гнилями на озимых зерновых было поражено 284,1 тыс. га, максимальное распространение и развитие болезни было отмечено в фазу «всходы-кущение» и составляло 39 % и 12 % соответственно. Причинами распространения фузариоза в южных районах европейской части страны могут быть не только теплые влажные погодные условия в период цветения, созревания и уборки, но и нерациональное применение приемов интенсивной технологии возделывания (минимализация обработки почвы, в том числе поверхностная обработка дисковыми орудиями), некондиционные семена, увлечение позднеспелыми сортами, затяжная уборка [2].

Систематическое воздействие пестицидов также увеличивает резистентность и токсинообразующие свойства возбудителей фузариоза.

По прогнозам Россельхозцентра в 2014 г. возможна повышенная вредоносность корневых гнилей. В борьбе с фузариозами применяют фунгициды фундазол, импакт, спортак , альто, фоликур, тилт , рекс КС, гранит, опус и других. Совершенствование химического метода в рамках интегрированной защиты растений направлено на подбор эффективных, но малоопасных для агроценозов препаратов [3]. В месте с тем химический метод защиты растений вызывает возникновение резистентности у фитопатогенов, что снижает эффективность препаратов, приводит к появлению новых еще более вредоносных возбудителей болезней.

Максимальное использование биологического потенциала сельскохозяйственных культур может стать одним из альтернативных путей развития агрономического сектора сельскохозяйственного производства.

Для решения этой проблемы в сельскохозяйственной практике все более широко применяются препараты третьего поколения – индукторы устойчивости к патогенам (элиситоры). Подобные препараты, обладая широким спектром защитных эффектов, не проявляют непосредственного токсического воздействия по отношению к патогену, растениям и животным и не оказывают негативного воздействия на рост растений, не нарушают экологическое равновесие в агробиоценнозах.

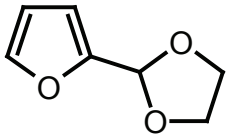
В последнее время все большее внимание уделяется исследованию механизмов взаимодействия патогенов и растений. Принцип метода иммунизации растений путем индукции иммунитета основан на естественных процессах, обусловливающих взаимосвязи между растением и возбудителем заболевания. Согласно современным представлениям, индуцированная резистентность развивается при воздействии на растения элиситоров (индукторов устойчивости). Сигналами, вызывающими ответную реакцию клеток растений на инфицирование патогенами, являются различные вещества химической природы (преимущественно фенольной природы).

Элиситоры включают различные сигнальные системы клеток растений, что приводит к экспрессии защитных генов, запускающих каскад последовательных биохимических реакций, приводящих к синтезу веществ антибиотического действия – фитоалексинов и синтезу соответствующих белков de novo, связанных с патогенезом (pathogenesis-related proteins, PR) в зависимости от их биохимических и молекулярных особенностей, а так же активизацию гормональных и ферментных систем, осуществляющих перестройку клеточных структур, которые в конечном итоге приводят к изменению физиологического состояния растений, в конечном итоге, формированию иммунитета растений к патогенам .

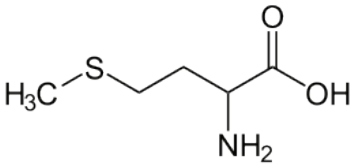
Таким образом при обработке растений индукторами иммунитета в них происходят глубокие изменения на биохимическом и физиологическом уровнях [4,5].

В качестве препаратов, применяемых в предлагаемой технологии используются препарат фуролан и аминокислота метионин, для повышения устойчивости растений к поражению фитопатогенами и снижению токсического воздействия гербицидов.

Фуролан повышает устойчивость растений к поражению грибковыми заболеваниями (Патент РФ № 2042326) положительно влияет



Фуролан – 2(2фурил)-1,3-диоксолан
Патенты РФ № 2284694, 2356225, 2475025



(2-амино-4-(метилтио)бутановая кислота

Рисунок 1. Структура молекулы Фуролана

на физиолого-биохимические процессы, увеличивает продуктивность растений пшеницы, повышает устойчивость к неблагоприятным условиям произрастания и поражению фитопатогенами, способствует получению более выровненного по размерам зерна в колосе и синхронизирует его созревание.

Аминокислота метионин незаменимая серусодержащая гликогенобразующая аминокислота. Входит в состав большинства белков, участвует в процессах ферментативного метилирования, приводящих к образованию холина и других биологически важных соединений.

Применение комплекса препаратов позволяет сохранить существующие в агробиоценозе равновесие микроорганизмов, и при этом, свести к минимуму неблагоприятное воздействие фитопатогенных бактерий на растения.

При воздействии на растения изучаемых препаратов, они воспринимаются растением как сигнальные вещества и растение включает свои защитные механизмы индуцированной иммунной защиты, позволяющие разрушить чужеродные молекулы. Происходит запуск антистрессовых программ. Стабилизируется синтез белка, повышается устойчивость к обезвоживанию, а следовательно засухоустойчивость [6-10].

Увеличивается содержание фенольных соединений, в частности хлорогеновой кислоты, являющейся предшественником лигнина, и как следствие происходит более активная лигнификация тканей растений. Это способствует повышению устойчивости к фитопатогенами и снижению токсического воздействия гербицидов [6-10].

В связи со стабилизацией синтеза белка происходит стабилизация клеточных мембран, в том числе и мембран хлоропластов, что обусловливает в условиях засухи активное протекание фотосинтетических процессов, увеличивается содержание пигментов в растении. Активация фотосинтетических процессов, роста корневой системы улучшает поступление питательных веществ из почвы, синтез углеводов и белковых веществ. Это создает условия для более равномерного налива зерна в колосе, повышения урожайности, выравненности зерна по размерам в колосе, крупности и выполненности, увеличивается масса 1000 зерен, повышается содержание белка и клейковины, улучшается ее качество в связи с более активным синтезом глиадинов и глутаминов, содержащих в большом количество аспарагиновую и глутаминовую кислоты [6-10].

Композиция фуролан с метионином улучшает посевные качества семян, активирует рост корневой системы.

В результате проведенных анатомо-морфологических исследований листовой пластинки пшеницы выявлено, что в вариантах с обработкой метионином и комплексом метионин с фуроланом, листья пшеницы приобретают ряд признаков ксероморфной структуры: утолщение стенок клеток эпидермиса, увеличение общей толщины листовой пластинки, уменьшение размеров клеток хлоренхимы, увеличение толщины хлоренхимы, уменьшение величины устьиц, увеличение размеров пузыревидных клеток.

Все это позволяет растению накопить больше влаги, используемой листом при начале его подсыхания при водном стрессе. Существенное утолщение слоя хлоренхимы, свидетельствует о большом потенциале синтетической активности листа. За счет утолщения клеток эпидермиса и слоя хлоренхимной ткани увеличивается общая толщина листовой пластинки. Кроме того, на поверхности эпидермиса расположены волоски, клетки которых наполняются воздухом и играют защитную роль (от перегрева солнцем, от потери воды). Таким образом, обработка фуроланом, фуроланом с метионином, позволяет изменить анатомическую структуру листа, что имеет значение для повышения засухоустойчивости пшеницы.

При определении содержания пигментов установлено, что в вариантах с применение фуролана, метинина и при совместном внесении увеличивается содержание флорофилла на 24,6% , 9,7% и 17,8% соответственно, и каротина на 47,5% , 27,3% и 50,5% соответственно.

При определении содержания РНК, ДНК и общего белка спектральным методом выявлено увеличение их содержания в вариантах с обработкой фуроланом и композицией фуролан с метионином в среднем на 1,59% и 6,3% соответственно.

При изучении показателей качества зерна пшеницы установлено, что при совместном применении фуролана с метионином улучшаются натура зерна, увеличивается содержание белка и клейковины, улучшается ее качество [9,10].

Литература

1. Тарчевский И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы клеток растений // Физиология растений. 2000.- Т. 47.- № 2.- С. 321–332.
2. Санин С.С., Назарова Л.Н. Фитосанитарная обстановка на посевах пшеницы в Российской Федерации (1991–2008 гг.). Аналитический обзор // Защита и карантин растений. 2010. № 2. С. 69–88.
3. Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в РФ в 2013 г. Прогноз развития вредных объектов в 2014 г.. МИНСЕЛЬХОЗ РФ , ФГБУ «Россельхозцентр», М.2014 г, 653 с.
4. Поликсенова В.Д. Индуцированная резистентность растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) // Вестник БГУ. 2009. сер. 2. № 1. С. 48–60.
5. Тютерев С.Л. Механизмы действия фунгицидов на фитопатогенные грибы. СПб. : ИПК «Нива», 2010. 172 с.

6. Яблонская Е.К. Влияние регулятора роста фуролан на реализацию потенциальной продуктивности и посевные качества зерна озимой пшеницы/ Е.К. Яблонская, Е.А.Окон, Н.И.Ненько, Е.В.Суркова// Труды Кубанского государственного Аграрного университета, КубГАУ, Краснодар, 2009.-В.5(2).-С. 139-145
7. Яблонская Е.К. Взаимосвязь стабильности мРНК бифермента лизикетоглюторатредуктазы-сахаропиндегидрогеназы и формирования технологических качеств зерна пшеницы/ Е.К. Яблонская, Г.И. Букреева, Н.А.Кузембаева , Д.В. Сметанин, А.И. Насонов, В.К. Плотниов // Труды кубанского государственного аграрного университета, КубГАУ, Краснодар, 2010.-В.(3). С.90-95.
8. Яблонская Е.К. Возделывание озимой пшеницы с использованием обработки растений экзогенными регуляторами// Е.К. Яблонская, В.В.Котляров, Д.В.Котляров , Д.Ю. Донченко, Федулов Ю.П. Труды Кубанского государственного Аграрного университета, КубГАУ, Краснодар, 2012.-В3.-С.81-87.
9. Яблонская Е.К., Котляров В.В., Федулов Ю.П. Антидоты гербицидов сельскохозяйственных культур (обзор) Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – №10(094). – IDA [article ID]: 0941310033. – Режим доступа: http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/33.pdf, 1,188 у.п.л.
10. Яблонская Е.К. Антидотная активность композиции препаратов фуролан и метионин к гербициду 2,4-Д / Е.К.Яблонская,В.В.Котляров, Ю.П.Федулов // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2014. – №02(096). – IDA [article ID]: 0961401058. – Режим доступа: http://ej.kubagro.ru/2014/02/pdf/58.pdf, 0,813 у.п.л.

ПОДГОТОВКА МАГИСТРОВ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ В РУДН

Е.Н. Пакина, В.Г. Плющиков, В.В. Введенский
Российский университет дружбы народов
e-mail: e-pakina@yandex.ru

MASTER PROGRAMS IN PLANT PROTECTION IN RUSSIAN PEOPLE'S FRIENDSHIP UNIVERSITY

E.N. Pakina, V.G. Plyuschikov, V.V. Vvedenskii
Russian University of Peoples' Friendship

Summary

Review of educational programms of plant protection at Russian University of Peoples' Friendship

Практически все отрасли аграрной экономики и, в частности, агрохолдинги, специализирующиеся на производстве продукции растениеводства, сегодня, как никогда прежде, ощущают острую нехватку высококвалифицированных специалистов на всех этапах производственного процесса и, особенно, в сфере защиты растений. С аналогичной проблемой сталкиваются и компании различных форм собственности, разрабатывающие и производящие средства защиты растений. Оборот рынка средств защиты растений в современном мире является одним из наиболее капиталоемких среди всех отраслей агробизнеса, однако проблема дефицита высококвалифицированных профессионалов актуальна и в этой сфере.

Сокращение посевных площадей, отказ от возделывания ряда традиционных для РФ культур и ориентация аграрной экономики на импортозамещение не могло не сказаться и на подготовке кадров для сельского хозяйства. В результате осталось небольшое количество высших учебных заведений, ведущих подготовку высококвалифицированных специалистов для агробизнеса, и уж тем более редкость наличие аграрной подготовки в классическом университете. Российский университет дружбы народов является классическим университетом с момента своего основания и по сегодняшний день. Аграрный факультет был создан в университете одним из первых и для преподавания на первоначально сельскохозяйственном факультете были привлечены ученые из ведущих вузов страны.

Сегодня на аграрном факультете РУДН ведется подготовка студентов по различным направлениям и специальностям, но Агрономия по праву занимает ведущее место. При переходе на двухступенчатую систему образования (бакалавриат, магистратура) одной из первых среди магистерских программ была открыта магистратура «Интегрированная защита растений».

При разработке данной программы принимались во внимание все возможные сферы деятельности выпускников, поэтому большое внимание в подготовке магистрантов уделяется изучению современных химических средств защиты растений, особенностей их влияния как на вегетирующие растения, так и на окружающую среду. Большое место отведено изучению биологического метода защиты растений, специфике его применения в открытом и защищенном грунте. Учитывая особенности Российского университета дружбы народов, где обучаются студенты из более, чем 150 стран мира, на аграрном факультете есть возможность изучения новых биологически активных веществ из растений тропического региона, которые могут проходить испытание как потенциальные биопестициды. Подобные исследования представляются крайне перспективными особенно сейчас, когда мировые сельхозтоваропроизводители все большее внимание уделяют производству биологической продукции, потребность в которой постоянно растет и представляет уже сегодня существенный сегмент аграрного сектора экономики. Безусловно, производство и применение современных средств защиты растений химической и биологической природы требует глубоких теоретических знаний, чему уделено большое внимание при преподавании таких дисциплин магистерской подготовки, как иммунитет растений, патологическая физиология, вирусология, бактериальные болезни, нематодные болезни и др. Особое место в магистерской программе «Интегрированная защита растений» занимает карантин. Это комплексная дисциплина, которая готовит специалистов к данной конкретной сфере деятельности с учетом специфики карантинной службы, где требуются знания как биологии фитопатогенов, так и нормативно-правовых документов, регулирующих ввоз в страну сельскохозяйственной продукции. В последние годы с учетом современных тенденций развития агробизнеса в программу подготовки магистров специализации «Интегрированная защита растений» была введена дисциплина «Технология сопровождения договоров страхования урожая сельскохозяйственных культур». Потери агрохолдингов различных форм собственности от природных катаклизмов крайне велики, и не последнее место здесь занимает ущерб, причиняемый фитопатогенами. Углубленная подготовка магистрантов в этом направлении ведется только на аграрном факультете РУДН, и это дает возможность выпускника впоследствии работать как в качестве независимых экспертов в области агрострахования, так и профильными специалистами в ведущих страховых компаниях, представленных в РФ.

Еще одна особенность подготовки студентов магистерской специализации «Интегрированная защита растений» - это возможность обучения на английском языке, так как данная магистерская программа открыта как на русском, так и на английском языке. Немаловажным для выпускников, желающих продолжить образование в данной области знаний и получить степень кандидата наук, является программа подготовки аспирантов специализации «Защита растений», которая на аграрном факультете РУДН открыта как на русском, так и на английском языках. РУДН, являясь международно ориентированным вузом, обладает эксклюзивным правом обучения студентов различного уровня подготовки (бакалавриат, магистратура, аспирантура) как на русском, так и на английском языке.