

УДК 632.3.01/08:635.342

ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА ПРИ СЛИЗИСТОМ БАКТЕРИОЗЕ КАПУСТЫ

Ф.С. ДЖАЛИЛОВ, П.В. КОРСАК, О.Е. ЖЕРЕБИЛО, Р.И. ГВОЗДЯК

(Кафедра фитопатологии)

Выявлена внутривидовая дифференциация возбудителя слизистого бактериоза капусты по патогенным, физиолого-биохимическим и серологическим свойствам. Показано, что в популяции патогена имеются штаммы, стабильно сохраняющие различный уровень патогенности. Выявлены непатогенные штаммы *E. carotovora* subsp. *carotovora*, роль которых в патогенезе обсуждается. Подтверждено, что патоген представлен большим количеством серотипов, хорошо различимых в реакции иммунодиффузии. Установлено преобладание в штаммовом составе возбудителя слизистого бактериоза серогрупп III и IX, что необходимо учитывать при использовании серологического метода диагностики. Установлено, что поливная вода может являться источником инфекции слизистого бактериоза капусты.

Слизистый бактериоз является одной из основных причин потерь урожая кочанов в поле и в период хранения, а также выпадов семенников. Так, потери урожая семян в годы эпифитотии достигают 50—70%, а за период хранения поражается от 12 до 100% кочанов в зависимости от сорта [2].

Возбудитель заболевания — *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* — это широко специализированный патоген, поражающий

растения многих семейств. Его экология является предметом детальных исследований. Хорошо известно, что патоген сохраняется в растительных остатках и пораженных маточниках [14, 17]. Установлено [8], что возбудитель в сапротрофной фазе входит в бактериальный ризосферный комплекс ряда овощных культур (капусты, моркови, картофеля, свеклы) и некоторых сорняков (лебеды, пырея, мать-мачехи, оду-

ванчика, подорожника, клевера, подыни, куриного проса, горца, почечуйного, сурепки, шалфея и др.), растущих на этих полях. Переносчиками инфекции могут быть летняя и весенняя капустные мухи, гусеницы и имаго капустной и репной белянки, рапсовый цветоед и полевые слизни [9]. Несмотря на то, что капусту в нашей стране выращивают на поливе, мало сведений о возможной роли ирригационной воды как источника инфекции.

Рациональная система защиты капусты от бактериозов должна базироваться на знании особенностей биологии патогенов, определяющих сохранение инфекции и ее передачу в поле от растения к растению.

В задачу настоящей работы входило изучение внутривидовой изменчивости биохимических, серологических и патогенных свойств возбудителя слизистого бактериоза капусты и уточнение источников инфекции.

Методика

Исследования проводили в 1990—1995 гг. Пораженные образцы капусты получали из различных регионов.

Возбудитель выделяли из пораженных органов на среду Логана в модификации Е.В. Матвеевой [8] и картофельный агар с 2,3,5-трифенилтетразолиумхлоридом (ТТХ). Применение ТТХ при изоляции бактерий рода *Erwinia* основано на том, что они обладают дегидрогеназной активностью и восстанавливают бесцветные соли тетразолия в красные соединения формазона [6].

В 1993—1994 гг. анализировали воду из рек Оки и Яхромы, являющуюся основным источником поливной воды для капусты в Московской области. Для этого раз в месяц в стерильные колбы отбирали ее пробы объемом 500 мл из указанных водонеточников вблизи капустных полей АО «Ленинское» и АО «Акатъевский» Коломенского района и совхоза-колледжа «Яхромский» Дмитровского района, а также непосредственно из оросительной системы. Пробы доставляли в лабораторию не позже чем через 48 ч и сразу же высевали на питательные среды, как было указано выше.

Патогенность выделенных штаммов определяли инокуляцией паренхимной части кочерыги сорта Амагер 611. Заражение проводили уколом препаративной иглой, предварительно смоченной в бактериальной суспензии плотностью 10^8 к/мл [13]. Затем через 48 ч измеряли диаметр мацерированной ткани. На основании полученных данных штаммы разделяли на сильно-, средне- и слабопатогенные.

Патогенные штаммы идентифицировали общепринятыми в бактериологии методами [1, 10]. Анализировали следующие признаки: степень патогенности на листьях и кочерыгах капусты; рост при максимальной температуре; образование индола и сероводорода; разжижение желатина; редукцию нитратов; образование кислоты при сбраживании сахарозы, арабинозы, галактозы, инозита, лактозы, рафинозы, рамнозы, дульцита, мальтозы, глицерина; реакция Фогес — Проскауэра; актив-

ность каталазы; чувствительность к различным концентрациям NaCl в среде; O/F тест. В качестве эталонов использовали музейные и выделенные нами из капусты штаммы *E. carotovora*. Принадлежность штаммов патогена к различным серологическим группам определяли методом иммунодиффузии в агаре. Для этого в виварии лаборатории защиты растений получали сыворотки к международному набору типовых штаммов различных серогрупп *E. carotovora*, описанных в [16].

Антисыворотки получали иммунизацией кроликов живыми клетками *E. carotovora* [16]. Реакцию иммунодиффузии в агаре проводили с антигенами, извле-

ченными из плотной бактериальной суспензии (10^{10} кл/мл) с помощью насыщенного раствора фенола [16].

За период 1990—1995 гг. было выделено более 270 изолятов возбудителя слизистого бактериоза из пораженных образцов капусты различных сортов и гибридов из Московской области, Краснодарского и Ставропольского краев и Дагестана.

Результаты

Наиболее многочисленной (46,7%) оказалась группа среднепатогенных штаммов. В целом наблюдалось распределение, близкое к нормальному со смещением в сторону сильнопатогенных штаммов (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
Степень патогенности штаммов возбудителя слизистого бактериоза, выделенных из капусты (1993)

Диаметр поражения, мм	Всего штаммов, шт.	Степень патогенности	В % к общему числу
0—10,0	48	Слабая	20,0
10,1—20,0	112	Средняя	46,7
> 20,0	80	Сильная	33,3

Не было обнаружено зависимости между степенью патогенности штамма и его географическим происхождением либо устойчивостью сорта, из которого он был выделен.

Все патогенные изоляты были грамотрицательные, подвижные, образующие через 1—2 сут на мясопептонном агаре округлые с ровными краями слегка выпуклые гладкие серовато-белые на просвет голубоватые колонии. Указанные штаммы разлагали глю-

козу в анаэробных условиях, выделяли H_2S из цистерна, не обладали амилазной активностью, редуцировали нитраты, росли при $36^\circ C$ и на среде с 5% NaCl.

Большое значение в диагностике энтеробактерий придаётся реакции Фогес — Проскауэра. Согласно определителю Bergey (1984), бактериям *E. carotovora* свойственна положительная реакция. В наших опытах патогенные штаммы возбудителя слизистого бактериоза обладали отрицатель-

ной или слабовыраженной положительной реакцией. Подобная штаммовая неоднородность в образовании ацетона отмечалась и другими исследователями [3, 7, 11]. Свежевыделенные патогенные штаммы быстро (на 7—14-й день) разжижали столбик желатина. Что касается коллекционных культур, то они часто утрачивали эту способность одновременно с потерей пектолитической свойств, на что указывалось также в работе [3]. Вместе с тем некоторые штаммы на протяжении 10 лет наблюдений стабильно сохраняли высокий уровень и их использовали для проведения искусственного заражения при оценке устойчивости селекционного материала. Патогенные штаммы сбраживали большинство углеводов с выделением кислоты и газа, не образовывали редуцирующих веществ из сахарозы, продуцировали кислоту из инозита и не продуцировали ее в среде с добавлением α -метилглюкозида. Не было обнаружено связи между физиолого-биохимическими признаками и степенью патогенности штаммов возбудителя.

По совокупности биохимических свойств патогенные штаммы можно отнести к *E. carotovora subsp. carotovora*, хотя по некоторым тестам были получены противоречивые данные. Так, патогенные штаммы вариательно сбраживали глицерин, а некоторые штаммы обладали слабовыраженной способностью сбраживать мальтозу, что является более характерным для подвида *atroseptica*. Все это, на наш взгляд, свидетельствует о большой близости между под-

видами *E. carotovora* и условности систематических различий между ними.

Из капусты было выделено 9 нетипичных непатогенных штаммов, близких к *E. carotovora subsp. carotovora*. Они отличались от типичных патогенных штаммов отсутствием пектолитической активности, не разжижали желатин, не образовывали кислоты на среде с инозитом и давали четко положительную реакцию Фогес — Проскауэра. На наличие непатогенных эрвиний со сходными характеристиками указывали и другие исследователи [3, 7, 11, 12, 15].

Результаты серотипирования (табл. 2) показывают, что среди штаммов возбудителя слизистого бактериоза доминировали III (24,3%) и IX (10,8%) серогруппы. Это необходимо учитывать при серологической диагностике заболевания. Помимо них встречались с небольшой частотой II, VII, VIII и X серогруппы. Более половины (51,4%) всех испытанных штаммов не были отнесены ни к одной из известных серогрупп, что указывает на огромное разнообразие антигенов у *E. carotovora subsp. carotovora* в отличие от другого подвида — *atroseptica*, возбудителя черной ножки картофеля, у которого около 90% штаммов относится к I серогруппе [4, 5]. Данные о преобладающих серогруппах патогена следует принимать во внимание при приготовлении серологического диагностикума для выявления возбудителя слизистого бактериоза без предварительной изоляции на питательную среду.

Таблица 2

Частота встречаемости серогрупп *E.carotovora subsp.carotovora* среди штаммов, выделенных из капусты (1995)

Серогруппа	Число штаммов, шт.	В % к общему числу
II	2	2,7
III	18	24,3
VII	2	2,7
VIII	4	5,4
IX	8	10,8
X	2	2,7
Не идентифицировано	38	51,4
Всего испытано	74	100,0

В 11 из 14 проанализированных образцов речной воды нами выделен возбудитель слизистого бактериоза. Все выделенные из воды штаммы со стабильной патогенностью относились к *E.carotovora subsp.carotovora*. Их концентрация в воде составляла 100—260 КОЕ/мл. Эти штаммы по своим физиолого-биохимическим свойствам существенно не отличались от музейных и выделенных из капусты штаммов *E.carotovora subsp. carotovora*. Не обнаружен возбудитель в водопроводной воде, хотя водозабор осуществлялся из тех же водосточников, откуда были взяты пробы, показавшие положительные результаты изоляции. Очевидно, применяемые меры по обеззараживанию городской водопроводной воды были достаточными для инактивации клеток патогена.

Среди штаммов патогена, выделенных из воды, встречались в основном серогруппы III (13%) и XI (9,3%), что соответствовало

результатам серотипирования штаммов, выделенных из капусты (табл. 2). Не выявлено каких-либо существенных различий в серологических свойствах между штаммами, выделенными из воды и из пораженных растений. Это позволяет говорить о циркуляции патогена в природе: весной возбудитель с пораженных растительных остатков с тальми водами попадает в водоемы, а в течение вегетационного периода с поливной водой попадает на поверхность растений. Конечно, концентрация клеток *E.carotovora subsp.carotovora* в поливной воде очень мала для гарантированного инфицирования растений, но, попадая на поверхность растений, возбудитель способен к эпифитному существованию и может вызывать патологический процесс при благоприятных обстоятельствах, открывающих «ворота инфекции», таких, как повреждение насекомыми, механическое травмирование при проведении операций ухода, а также при развитии сосудистого бактериоза, который повышает восприимчивость к слизистому.

Из воды была выделена также группа штаммов, которая в процессе культивирования быстро потеряла первоначальную патогенность и отличалась по ряду свойств от музейных штаммов *E.carotovora*.

Заключение

Выявлена значительная изменчивость штаммов возбудителя слизистого бактериоза капусты по физиолого-биохимическим, серологическим и патогенным свой-

ствам, что указывает на высокую пластичность патогена и способность адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды, а также, вероятно, объясняет его широкий ареал.

Наряду с штаммами различного уровня патогенности выделены авирулентные штаммы. Наличие авирулентных форм, очевидно, способствует выживанию патогена в природе без связи с растением-хозяином, при этом отбор будет способствовать накоплению форм, более соответствующих сапротрофному существованию, что значительно расширяет границы существования вида патогена. Как было показано на картофеле, авирулентные формы *E. carotovora* subsp. *atroseptica* при размножении на растении способны давать в потомстве штаммы патогенные [12, 15].

Серологические и физиолого-биохимические свойства штаммов *E. carotovora* subsp. *carotovora* не были связаны со степенью их патогенности, что доказывает невозможность предварительной оценки степени патогенности по косвенным признакам без проведения инокуляции.

Выявлено, что поливная вода может быть одним из источников инфекции слизистого бактериоза капусты; это необходимо учитывать при планировании защитных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. — Киев: На-

укова думка, 1968. — 2. Дорозжин Н.А., Куневич Л.Р. Слизистый бактериоз капусты БССР. — Тез. докл. IV Всесоюз. совещ. «Состояние и перспективы развития научных исследований по предотвращению резистентности у вредителей и возбудителей болезней к пестицидам и разработка эффективных мер борьбы с бактериальными болезнями растений». Ереван, 22—24 декабря 1980 г. М., 1980, с. 75—76. — 3. Кабашная Л.В., Гвоздяк Р.И. Сравнительная характеристика штаммов *Erwinia carotovora* различной вирулентности. — Микробиол. журн., 1982, т. 44, № 3, с. 8—12. — 4. Козлов Л.П., Лазарев А.М., Рома Е.В. Получение диагностической сыворотки к I серотипу *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* и испытание ее в иммунологических тестах. — В сб.: Защита с.-х. продукции от вредных организмов при хранении. Л.: ВИЗР, 1991, с. 67—71. — 5. Кондратенко Е.В. Выявление доминирующего в Ленинградской области серотипа *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (E.c.a.), возбудителя черной ножки картофеля. — В сб.: Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность. — Тез. докл. Всерос. съезда по защите растений, СПб, 1995, с. 206. — 6. Лазарев А.М. Использование ТТХ для разделения вирулентных и авирулентных штаммов бактерий *Erwinia phytophthora*. — Бюл. ВНИИСХМ, 1985, вып. 41, с. 34—36. — 7. Лазарев А.М., Черняева И.И. Физиолого-биохимические особенности различных по пато-

генности бактерий *Erwinia phytophthora*. — С.-х. биол., 1986, № 8, с. 109—111. — 8. *Матвеева Е.В.* Сапрофитная фаза возбудителей слизистого бактериоза капусты. — Биолог. науки, 1980, № 10, с. 88—91. — 9. *Матвеева Е.В., Пехтерева Э.Ш., Одинцова М.А.* О распространении возбудителей бактериозов капусты. — Картофель и овощи, 1982, № 7, с. 27—28. — 10. *Матвеева Е.В., Семигонова Е.С., Пехтерева Э.Ш., Пивина А.П.* Основные методы диагностики фитопатогенных бактерий. М.: ВАСХНИЛ, 1990. — 11. *Пищик В.Н., Лазарев А.М., Воробьев Н.И.* Сравнение физиолого-биохимических признаков различных по вирулентности бактерий *Erwinia carotovora*. — Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность. Тез. докл. Всерос. съезда по защите растений, СПб, 1995, с. 358—359. — 12. *Попкова К.В., Шнейдер Ю.И., Эль*

Хатиб С.Р. Изменчивость бактерий — возбудителей черной ножки и мокрых гнилей клубней картофеля и устойчивость его к бактериозам. — Изв. ТСХА, 1980, вып. 5, с. 116—122. — 13. *Самохвалов А.Н., Розачев Ю.Б., Шевченко С.И.* Методические указания по ускоренной оценке и отбору капусты на устойчивость к слизистому бактериозу. М., 1989. — 14. *Шнаар Д., Клейнхемпель Г., Мюллер Г., Науманн К.* Бактериозы культурных растений. М.: Колос, 1980. — 15. *Эль-Хатиб С.Р.* Особенности патогенеза черной ножки в зависимости от вирулентных свойств возбудителя *Pectobacterium phytophthorum*. — Автореф. канд. дис. М.: ТСХА, 1977. — 16. *De Boer S.H., Copeman R.J., Vrugink H.* — *Phytopathology*, 1979, vol. 69, № 4, p. 316—319. — 17. *Kikimoto T.* Ecological aspects of the soft rot bacteria. Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ. Sendai., 1980, vol. 31, p. 19—41.

Статья поступила 25 июня 1996 г.

SUMMARY

Intraspecific differentiation of the agent of soft rot in cabbage by pathogenic, physiological-biochemical and serological properties has been detected. It has been shown that in pathogene population there are strains which always keep different level of pathogenicity. Non-pathogenic strains *E. carotovora* subsp. *carotovora* have been found, their role in pathogenesis is being discussed. It has been confirmed that pathogene is presented by many serotypes which are well distinguished in immunodiffusion reaction. It has been found that in strain composition of soft rot agent predominate serogroups III and IX, which should be taken into consideration when applying serological method of diagnostics. It has been found that irrigation water may cause soft rot in cabbage.