

УДК: 632.3:633.491:579.842

DICKEYA A DIANTHICOLA - НОВЫЙ ДЛЯ РОССИИ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ
ПАТОГЕН КАРТОФЕЛЯ

А.Н. КАРЛОВ¹, В.С. ЗОТОВ³, Э.Ш. ПЕХТЕРЕВА³, Е.В. МАТВЕЕВА³,
Ф.С. ДЖАЛИЛОВ¹, И.А. ФЕСЕНКО², Г.И. КАРЛОВ², А.Н. ИГНАТОВ⁴

¹ Лаборатория защиты растений; ² Центр молекулярной биотехнологии
РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева; ³ ВНИИ фитопатологии РАН;
⁴ Центр «Биоинженерия» РАН)

Проведено изучение видового состава фитопатогенных пектолитических бактерий, поражающих стебли и клубни картофеля. Выделенные из образцов пораженного картофеля штаммы бактерий были идентифицированы до вида и подвида с помощью основных биохимических тестов и ПЦР-анализа со специфичными праймерами. При анализе образцов из Липецкой обл. впервые в Российской Федерации среди возбудителей черной ножки и мокрой гнили картофеля были выделены штаммы фитопатогенных бактерий, относящиеся к роду *Dickeya*, идентифицированные по последовательностям генов *pelB*, *dnaX* и спектру AFLP как *D. dianthicola*.

Ключевые слова: черная ножка картофеля, *Dickeya dianthicola*, ПЦР, AFLP.

Фитопатогенные пектолитические бактерии вызывают наиболее вредоносные болезни картофеля — черную ножку и мокрую гниль [2]. Обычный возбудитель — *Pectobacterium carotovorum* имеет два подвида, которые вызывают преимущественно черную ножку у вегетирующих растений картофеля и мокрую гниль клубней вегетирующих растений (*P. carotovorum* ssp. *atrosepticum* (Pea)) или гниль клубней картофеля после уборки урожая (*P. carotovorum* ssp. *carotovorum* (Pec)) [15]. Вид, ранее известный как *Erwinia chrysanthemi*, вызывал как сосудистое поражение растений картофеля в поле (черную ножку), так увядание и гниль широ-

кого круга с.-х. и декоративных растений в регионах с жарким климатом. В 2005 г. в результате изучения комплекса физиологических и молекулярных признаков эти бактерии перенесены в новый род *Dickeya*, включающий 6 видов (табл. 1) [11].

В 1990-е годы *Dickeya* spp. (*Dsp*) распространился в странах Западной (Великобритания, Нидерланды), Северной (Финляндия, Дания, Швеция), Восточной Европы (Польша, Венгрия) и странах Ближнего Востока (Турция, Израиль), что, вероятно, объясняется климатическими изменениями в Северном Полушарии. Потери от этого патогена в Нидерландах, связанные только с выбраковкой за-

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по образованию в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», государственный контракт П2380 «Молекулярно-генетическая оценка внутривидового полиморфизма возбудителей бактериальных болезней картофеля».

Список оригинальных и коллекционных штаммов бактерий родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, использованных в работе

Штамм	Растение-хозяин	Географическое происхождение	Биовар/реакция с ADE1/2	Вид
201-3, 204-3	<i>Zea mays</i>	Краснодарский край	?/+	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>
D8, D9, D17, D33	<i>Solanum tuberosum</i>	Липецкая обл.	?/+	<i>D. dianthicola</i>
2115	<i>Dahlia</i> sp.	Румыния, 1962	A	<i>D. dianthicola</i>
2116	<i>S. tuberosum</i>	Франция, 1975	7	<i>D. dianthicola</i>
2117	<i>Parthenium argenatum</i>	США, 1945	6	<i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>parthenii</i>
2118	<i>Chrysanthemum</i>	США, 1958	5	<i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>
2119	<i>Helianthus annuus</i>	Франция, 1986	5	<i>D. chrysanthemi</i> bv. <i>Chrysanthemi</i>
2120	<i>Pelargonium capitatum</i>	Коморские острова, 1960	3	<i>D. dadantii</i>
2121	<i>Ananas comosus</i>	Малайзия, 1961	3	<i>D. dadantii</i>
2122	<i>Ipomea batatas</i>	Куба, 1987	A	<i>D. dadantii</i>
2124	<i>Dieffenbachia</i> sp.	Франция, 1972	2	<i>D. dieffenbachiae</i>
2125	<i>Dieffenbachia</i> sp.	США, 1957	2	<i>D. dieffenbachiae</i>
2126	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Куба, 1987	2	<i>D. dieffenbachiae</i>
2127	<i>Musa paradisiacal</i>	Колумбия, 1968	4	<i>D. paradisiacal</i>
2128	<i>Zea mays</i>	Куба, 1987	4	<i>D. paradisiacal</i>
2129	<i>Musa paradisiacal</i>	Колумбия, 1970	A	<i>D. paradisiacal</i>
2131	<i>Zea mays</i>	США, 1970	3	<i>D. zeaе</i>
2132	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	США, 1970	3	<i>D. zeaе</i>
2133	<i>Ananas comosus</i>	Франция, Мартиник, 1991	3	<i>D. zeaе</i>
2094	<i>S. tuberosum</i>	Финляндия, 2005, 04V043 ^k , w0443 ^k	3	<i>D. solani</i>
2222	<i>S. tuberosum</i>	Нидерланды, 2007	3	<i>D. solani</i>

раженного семенного картофеля, составили в 2007 г. более 25 млн евро, а прямые потери урожая картофеля — более 15 млн евро [13]. Первоначально наиболее часто встречающимся патогеном этого рода был *D. dianthicola*, вызывавший медленное увядание растений в поле. В последние годы из растений картофеля с симптомами типичной черной ножки была выделена новая группа бактерий, условно названная *D. «solani»*. Считается, что *Dsp* менее жизнеспособна в почве по

сравнению с *Pcc* и *Pca*, но она выживает и размножается в речной воде в ассоциации с водорослями. Ранее *Dsp* выделяли из растений кукурузы в Краснодарском и Ставропольском краях [1]. В 2009 г. в результате анализа пораженных черной ножкой и мокрой гнилью образцов из Липецкой обл. нами впервые были выделены штаммы фитопатогенных бактерий, относящиеся к роду *Dickeya*, которые в ходе работы были идентифицированы как *D. dianthicola*.

Материалы и методы

Выделение и хранение штаммов

Из пораженных образцов картофеля, полученных из Липецкой обл., проводили выделение бактерий на картофельный агар (КА) с генциан-виолетом и на среду Логана в чашках Петри [12]. Чашки инкубировали в термостате в течение 2—4 сут. при 28°C. Изолировали колонии, окаймленные зоной разжижения пектатного геля. Бактериальные суспензии изолятов хранили в 15%-м глицерине при ~70°C. Определение фенотипических свойств проводили согласно методам, описанным в методическом руководстве по идентификации фитопатогенных бактерий [2]. Патогенность выделенных культур оценивали по способности вызывать мягкую гниль ломтиков картофеля. Выделение ДНК из бактерий проводили с помощью набора «Проба-ГС» («ДНК-технология», Москва) согласно рекомендациям производителя. Для генетической характеристики выделенных штаммов проводили ПЦР с праймерами ADE1/ADE2, специфичными к фрагменту гена *pelB* *Dickeya* spp. [4], и с праймерами *dnaXF/dnaXR*, специфичными к фрагменту гена *dnaX* [13]. Для ПЦР использовали 5x MasterMix (Диалат лтд, Москва). Температурно-временной профиль для праймеров ADE1/ADE2 составлял: начальная денатурация — 95°C 9 мин, последующие 25 циклов — 94°C 1 мин и 72°C 2 мин; завершающая элонгация — 72°C 8 мин. Для праймеров *dnaXF/dnaXR* начальная денатурация 94°C 3 мин, 35 циклов, включая денатурацию — 94°C 1 мин, отжиг — 59°C 1 мин, и элонгацию — 72°C 2 мин; завершающая элонгация — 72°C 5 мин.

После проведения ПЦР проводили прямое определение последовательности ДНК амплифицированных фрагментов генов *pelB* и *dnaX* с помощью автоматического секвенато-

ра ABI-3130XL. Для сравнения использовали ДНК коллекции штаммов *Dickeya*, любезно предоставленных д-ром Ван дер Вольфом (van der Volf) (Plant Research International (IPO), Wageningen, the Netherlands) (см. табл. 1). Для определения вида вновь выделенных штаммов оценивали степень прямого сходства ДНК. Филогенетическое дерево строили методом ближнего соседа [10] с помощью программы MEGA4.0 [14]. Достоверность построенного дерева определяли методом бутстрэпа [6].

Оценка межвидового и внутривидового разнообразия бактерий методом AFLP

ДНК вновь выделенных и типовых штаммов *Dickeya* sp. разрезали с помощью рестриктаз XbaI и NotI и лигировали с адаптерами, комплементарными сайтам рестрикции, как было описано ранее [9]. Последующую ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл, включая: 1x буфер для полимеразы BioTaq, 5 нМ dNTP, 50 нг ДНК-матрицы, 12.5 пкМ праймера и 1.25 ед. BioTaq («Диалат лтд», Россия). Для амплификации использовали следующий температурно-временной профиль: первый цикл — 94°C 3 мин.; последующие 35 циклов — 94°C 30 с, 37°C 40 с и 72°C 1 мин; окончательная элонгация — 7 мин при 72°C. Продукт амплификации анализировали электрофорезом в агарозном геле и документировали при помощи системы UVP GelDoc (Велико Британия).

Наличие или отсутствие AFLP-фрагментов у отдельных штаммов учитывали как 1 или 0 соответственно, и попарное фенетическое расстояние между штаммами определяли по показателю, равному 1 — коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты и их обсуждение

Растения картофеля с типичными симптомами черной ножки и мокрой

бактериальной гнили были получены из нескольких хозяйств Липецкой обл. летом 2009 г. В результате выделения бактерий из пораженных клубней картофеля на среду КА с генцианвиолетом колонии имели специфический вид, а именно — сгусток бледно-белого цвета в центре с прозрачной слизистой каймой. Так как пектолитические бактерии разжижают пектатный гель, то изолировали колонии, формирующие углубления в среде Логана. Было выделено и изучено по физиологическим диагностическим признакам 134 изолята. Выделенные бактерии в основном принадлежали Psc (более 60%), но ряд изолятов обладал характерными для Dsp морфологическими и физиологическими признаками [11] (табл. 2).

Все исследуемые штаммы были проверены на их способность вызывать сверхчувствительную реакцию (СВЧ) на листьях табака. Штаммами с положительной СВЧ-реакцией были инокулированы ломтики картофеля. Все исследуемые штаммы были патогенными для этих растений-хозяев, но их агрессивность была различной. Принадлежность бактерий к роду *Dickeya* была подтверждена амплификацией в ПЦР, специфичных для этого рода фрагментов с праймерами ADE1/2.

Анализ последовательностей фрагментов гена *dnaX* показал высокое сходство штаммов D8, D9, D17 и D33 и типовых культур *D. dianthicola* (рис. 1). Последовательности различались только в одной позиции секвенированного фрагмента длиной 464 п.о. Различия последовательностей ДНК этого гена со штаммами других видов в среднем составляли 5%, но наиболее близкой группой была *D. «solani»* (до 3% различий). У ряда типовых штаммов *Dickeya* не был получен ожидаемый продукт амплификации с праймерами ADE1/2 (см. табл. 1). Анализ последовательности гена *pelB*, амплифицируемой этими диагностическими праймерами, выявил более высокую степень полиморфизма (до 10% различий), что обусловлено наличием нескольких локусов и аллельных вариантов изучаемого гена.

Анализ полученных спектров AFLP-фрагментов подтвердил принадлежность штаммов D8, D9, D17 и D33, выделенных из картофеля в Липецкой обл. к виду *D. dianthicola* (рис. 2), в то время как ранее выделенные из подсолнечника штаммы 201 и 204, положительно реагировавшие с диагностическими праймерами ADE1/2, не имели аналогов среди типовых культур 6 видов и группы *D. «solani»* и по последовательности фрагмента гена

Таблица 2
Основные диагностические признаки штаммов бактерий *Dickeya spp.* из Липецкой обл.

Штамм	Тест					
	PCЧ	ПЦР ADE1/2	синтез индола	рост на среде Логана	пектолитическая активность	образование редуц. сахаров
3	+	-	+	+	+	-
32	+	-	+	+	+	-
33	+	-	+	+	+	-
35	+	-	+	+	+	-
36	+	+	+	+	+	-
D8	+	+	+	+	+	-
D9	+	+	+	+	+	-
D17	+	+	+	+	+	-
D33	+	+	+	+	+	-

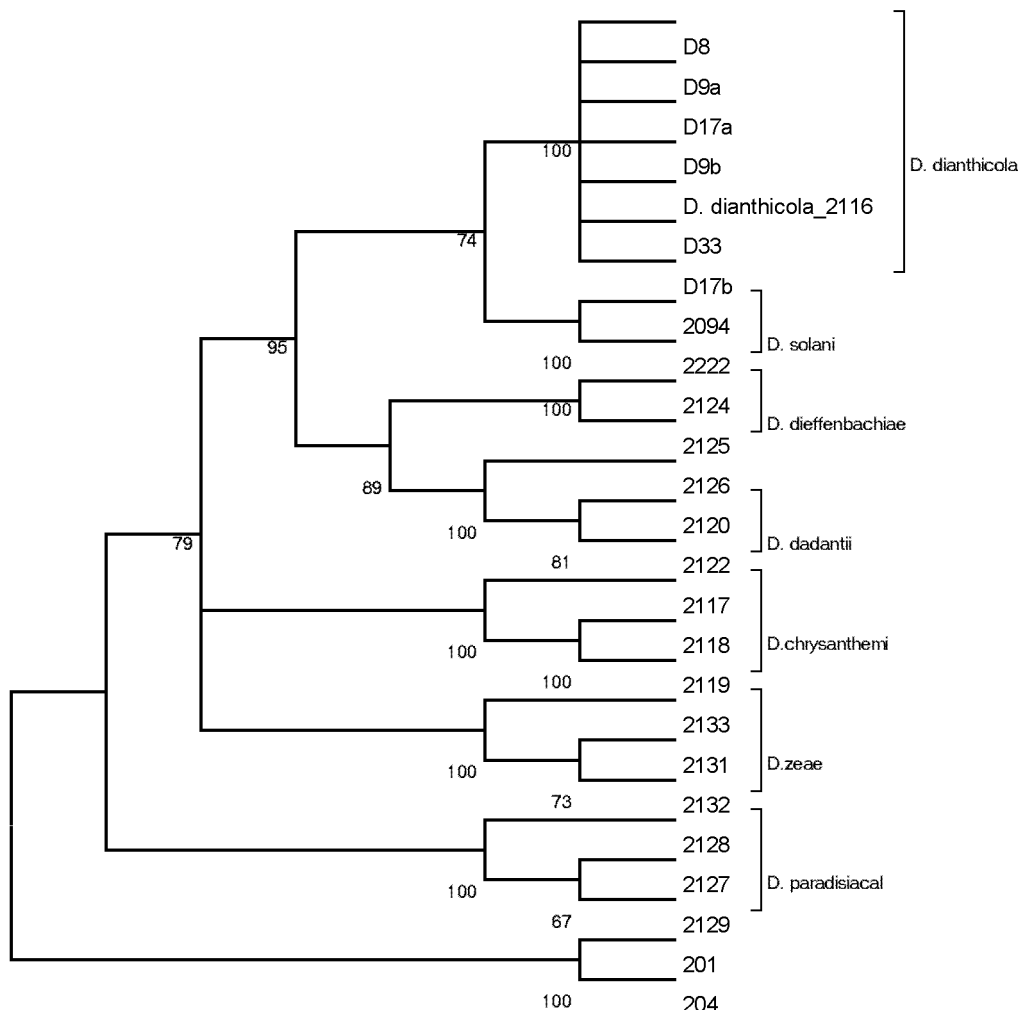


Рис. 1. Филогенетическое дерево для последовательности фрагмента гена *dnaX23* штаммов *Dickeya sp.* и 2 штаммов *Pectobacterium carotovorum sbsp. atrosepticum* (201 и 204), построенное методом ближнего соседа, (NB) с помощью программы MEGA4. Достоверность топологии дерева определена методом бутстрепа с 1000 повторений

dnaX были с большой долей вероятности отнесены к виду *Pectobacterium carotovorum sbsp. atrosepticum* (сходство 97%) (см. рис. 1). Сравнение спектров AFLP (см. рис. 2) также показало большую близость вновь выделенных штаммов из Липецкой обл. к *D. dianthicola* (среднее расстояние 0,12), чем к другим видам рода *Dickeya* (среднее расстояние 0,56).

D. dianthicola обычно вызывает медленное увядание растений, сопровождающееся внутренним некрозом стебля, а впоследствии усыханием инфицированного стебля. В отличие от этих симптомов признаки заражения *D. «solani»* больше сходны с симптомами типичной черной ножки, вызванной *Pca*, т.е. увядание может быть быстрым с черной мягкой гнилью,

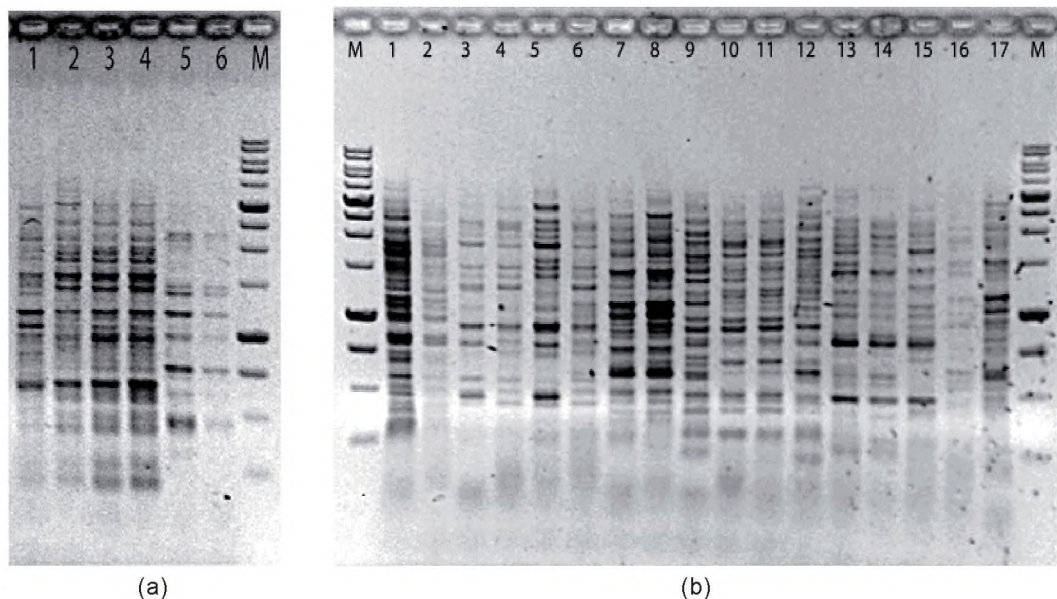


Рис. 2. Оценка межвидового и внутривидового разнообразия *Dickeya* методом AFLP с использованием рестриктаз XbaI и NotI.

(а) 1-4 штаммы *D. dianthicola* 2116, D8, D9, D17, 5 и 6 — *P. carotovorum* sbsp. *atrosepticum* 204 и 201, М — Маркер Dialat M1 kb, (б) 1 и 2 — *D. solani* 2094 и 2222, 3-5 — *D. zeaе* 2131-2133; 6-8 — *D. paradisiaca* 2127-2129; 9 — *D. dieffenbachiae* 2124; 10-12 — *D. dadantii* 2120-2122; 13-15 — *D. chrysanthemi* bv. *parthenii* 2117-2119; 16 и 17 — *D. dianthicola* 2115 и 2116; М — Маркер Dialat M1 kb

развивающейся вверх по сосудистой системе от инфицированного клубня. *D. dianthicola* и *D. «solani»* больше адаптированы к теплой погоде, чем *Pca* и поэтому ранняя теплая погода, которая установилась в Англии в 2007 и 2009 гг., привела к сильному поражению *D. «solani»* картофеля в поле и к моменту уборки значительная часть клубней нового урожая имели симптомы бактериального загнивания [5].

Dickeya поражает также цветочные луковичные растения, в частности, сильно страдает гиацинт. Так, в 2007 г. потери от этого патогена при выращивании луковичных в Голландии составили 15 млн евро. С учетом

значимости этой проблемы в Голландии утверждена исследовательская программа, посвященная изучению патогенов *Dickeya*, в размере 7,5 млн евро, которая будет финансироваться за счет государственного бюджета и производственных компаний [5].

Таким образом, в популяции возбудителей черной ножки, выделенных из картофеля в Липецкой обл., нами впервые были обнаружены штаммы нового для Российской Федерации опасного патогена картофеля *D. dianthicola*. Для учета распространенности этого возбудителя и оценки возможного экономического ущерба требуются дальнейшие исследования.

Библиографический список

1. Матвеева Е.В., Игнатов А.Н. Бактериозы картофеля / В сб.: Интегрированная система защиты картофеля от фитофтороза, грибных, вирусных и бактериальных болезней. М., 2007. С. 16-27.

2. Bradbury J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, UK: CABI. 1986.
3. Chatterjee A.Y., Liu Y., Chatterjee A.K. Nucleotide sequence of pectate lyase structural gene, pel 1 of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* strain 71 and relationship of pel 1 with other pel genes of *Erwinia* species // MRMI, 1995. V.8, № 1. P. 92-95.
4. Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases // Appl. Environ. Microbiology, 1994. V. 60. P. 1437-1443.
5. Elphinstone J. *Erwinia chrysanthemi* (Dickeya spp.) update // Plant Clinic News, 2009. No. 8.
6. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution, 1985. V. 39. P. 783-791.
7. Grabe G., van der Wolf J.M. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe // European Journal of Plant Pathology, 2009. V.125. P. 245-261.
8. Hoepelman A., de Neeling A.J., Bonten M.J.M. Epidemic and Nonepidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* // Emerging Infectious Diseases, 2003 Vol. 9. No.9. P. 1108-1115.
9. Leavis H.L., Willems R.J.L., Top J., Spalburg E., Mascini E.M., Fluit A.C., Perombelon M.C.M., Kelman A. Ecology of the soft-rot erwinias // Ann. Rev. Phytopathology., 1980. V. 18. P. 361-387.
10. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*, 1987. V. 4. P. 406-425.
11. Samson R, Legrandre J.B, Christen R, Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al, 1953) Brenner et al. (1973) and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. International // Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005. V.55. P. 1415-1427.
12. Schaad N.W., Jones J.B., Lacy G.H. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. St. Paul, Minnesota // American Phytopathological Society, 2001.
13. Slawiak M., van Beckhoven J.R.C.M., Speksnijder A.G.C.L., Czajkowski R., Stanghellini M.E., Meneley J.C. Identification of soft-rot *Erwinia* associated with blackleg of potato in Arizona // Phytopathology, 1975. V.65. P. 86-87.
14. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007. 10.1093/molbev/msm092.
15. Thompson S., Hilderbrand D.C., Schroth M.N. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugar beet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* // Phytopathology, 1981. V.71. P. 1037-1042.

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

Research into species composition of phytopathogenic pectolytic bacteria, affecting both stems and potato tubers, has been done. Strains of bacteria, secured from affected potato samples, have been identified as both species and subspecies, by means of basic biochemical tests and PCR-analysis with specific primers. It is the first time in Russian Federation, when analyzing samples from Lipetsk region, among

causative agents of both black stem and wet rot, phytopathogenic bacteria strains have been secured, the bacteria belonging to *Dickeya* type, identified according to sequences of genes *pelB*, *dnaX* and AFLP spectrum as *D. dianthicola*.

Key words: black stem (blackleg) of potato, *Dickeya dianthicola* PCR, AFLP.

Карлов Александр Николаевич — асп. лаборатории защиты растений РГ АУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-12-79. Эл. почта: karlov.zara@gmail.com

Зотов Василий Сергеевич — асп., ВНИИ фитопатологии РАСХН.
Тел. 8 (498) 694-09-04. Эл. почта: adni83@yandex.ru

Пехтерева Эрна Шарифовна — к. б. н., ВНИИ фитопатологии РАСХН.
Тел. 8 (498) 694-09-04. Эл. почта: phytobac@vniif.rosmail.com

Матвеева Евгения Владимировна — к. б. н., ВНИИ фитопатологии РАСХН.
Тел. 8 (498) 694-09-04. Эл. почта: matveeva@vniif.rosmail.com

Джалилов Февзи Сеид-Умерович — д. б. н. Тел. 976-12-79.
Эл. почта: labzara@mail.ru

Фесенко Игорь Александрович — к. б. н. Тел. 977-70-01.

Карлов Геннадий Ильич — к. б. н. Тел. 977-70-01.
Эл. почта: karlov@timacad.ru

Игнатов Александр Николаевич — д. б. н., Центр «Биоинженерия» РАН.
Тел.+7 (916) 671-21-47. Эл. почта: An.ignatov@gmail.com