

**ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ ЛУКОВИЧНЫХ
ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР В ПРИЛОЖЕНИИ К РАЗРАБОТКЕ
ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЖЕЛТОЙ БОЛЕЗНИ ГИАЦИНТА
XANTHOMONAS HYACINTHI (WAKKER) VAUTERIN ET AL.**

*Дренова Наталия Васильевна*¹, с.н.с., E-mail: drenova@mail.ru

*Яремко Анастасия Богдановна*², м.н.с., E-mail: an_ya94@mail.ru

*Шнейдер Елена Юрьевна*¹, с.н.с., E-mail: seunch@mail.ru

*Ванькова Анна Андреевна*³, д.б.н., доцент, E-mail: anna.vankova@gmail.com

*Свиридова Людмила Александровна*³, к.с.-х.н., доцент,

E-mail: lyudmilaser@mail.ru

*Меньшова Серафима Сергеевна*³, студент, E-mail: smenshova00@mail.ru

*Кондратьев Максим Олегович*¹, агроном, E-mail: affut24@rambler.ru

¹Научно-методический отдел вирусологии и бактериологии

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

²НМО молекулярных методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР»

³ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», кафедра микробиологии и иммунологии

Аннотация: В статье изложены результаты первого этапа исследований состава и характеристик микробных сообществ растений-хозяев возбудителя карантинного заболевания желтой болезни гиацинта (*Xanthomonas hyacinthi*), имеющих потенциальное значение при разработке культурально-морфологических и молекулярных методов диагностики.

Ключевые слова: желтая болезнь гиацинта, *Xanthomonas hyacinthi*, растение-хозяин, *Hyacinthus*, *Scilla*, *Muscari*, микробиота, антагонизм, карантин.

Введение. Возбудитель желтой болезни гиацинта в 2018 г был включен в Единый Перечень карантинных объектов ЕАЭС в качестве отсутствующего КВО под названием *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi* (Wakker) Dowson et al., однако в настоящее время приоритетным считается название *X. hyacinthi* (Wakker) Vauterin et al. [1]. В настоящее время встречается в некоторых странах Европы, в США, Японии и Австралии.

Возбудитель причиняет существенный ущерб производству гиацинта и других мелколуковичных культур подсем. *Scilloideae* (пролески, мускари, хионодоксы, гиацинтелы, эвкомиса). Наряду с экономическими потерями, велик риск его распространения в научных коллекциях и естественных фитоценозах, что может нанести урон редким и эндемичным видам растений, обитающих в РФ, где произрастает около 20 видов потенциальных растений –

хозяев, относящихся к 6 родам: Барнардия (*Barnardia*), Гиацинтик (*Hyacinthella*), Ложномускари (*Pseudomuscari*), Пролеска (*Scilla*), Пушкиния (*Puschkinia*), Птицемлечник (*Ornithogalum*). Большинство видов встречаются в Республике Крым и в регионе Кавказа. Некоторые виды произрастают в зоне широколиственных лесов и лесостепи. *Barnardia japonica* (Thunb.) Schult. & Schult. F. обитает на Дальнем Востоке [3].

Основной путь распространения возбудителя – перевозки зараженных луковиц и горшечных выгоночных растений гиацинта и других хозяев. Одной из необходимых фитосанитарных мер является эффективная лабораторная диагностика возбудителя в образцах подкарантинной продукции. В настоящее время в карантинной диагностике используют комплекс из 2-3 экспресс-тестов на основе серологических и молекулярных методов выявления возбудителя в растительном экстракте. Однако изоляция чистой культуры с последующей идентификацией рекомендуется по крайней мере в критических случаях, например, при первом выявлении на территории [4]. Для разработки надежной диагностической схемы необходимо учитывать ряд характеристик как самого патогена, так и растений-хозяев, в частности, их микробиоту, которая может оказывать влияние как на результаты экспресс-тестов, так и на эффективность изоляции микроорганизма на питательные среды.

Сведения о микробиоте мелколуковичных практически отсутствуют, ограничиваясь лишь фитопатогенными видами. [2]. Между тем, важно понимать, присутствуют ли в растительном материале другие виды рода *Xanthomonas* (как фитопатогенные, так и сапрофитные) или прочие организмы, способные давать ложноположительные реакции при проведении тестов. Для разработки методов и оценки надежности изоляции чистой культуры важна информация о присутствии морфологически и физиологически близких, а также антагонистических микроорганизмов.

Растения гиацинта поражаются возбудителями различной природы. Среди фитопатогенных грибов наиболее опасными являются виды родов *Fusarium* и *Botrytis*. *Fusarium culmorum* и *Botrytis cinerea* вызывают гниль донца луковицы и серую гниль, приводящих к полному отсутствию цветения при выгонке и потерях при хранении луковиц гиацинта. Различные виды рода *Penicillium*, например, *P. verrucosum* вызывают пенициллез луковиц, или хранилищную гниль. Ризоктониоз - первичная инфекция, вызываемая грибом *Rhizoctonia solani*. В Американскую коллекцию микроорганизмов депонирован штамм *Cladosporium scillae* Deighton (ATCC 38024TM), изолированный в Новой Зеландии из растения Сциллы перуанской (*S. peruviana* L.).

Среди бактерий-возбудителей болезней Пролесковых известны энтеробактерии родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, вызывающие мокрую или мягкую гниль (*D. chrysanthemi* [2], *D. solani*, *P. rhapontici*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. c. subsp. odoriferum*). В коллекции депонированы штаммы *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (NCPPB 1690, гиацинт), *Acinetobacter nectaris* (LMG 26958, нектар цветков *Muscari comosum*). *Rhodococcus fascians* отмечен на *Muscari botrioides*. В последние годы при выгонке гиацинтов,

пролески и особенно мускари значительный вред наносит *Candidatus Phytoplasma asteris* из группы пожелтения астр (Aster Yellows).

Среди возбудителей вирусных болезней - Tobacco rattle virus (TRV), Tobacco necrosis virus (TNV), Hyacinth mosaic virus (HMV) и Ornithogalum mosaic virus (OMV), Arabis mosaic virus (ArMV), Cucumber mosaic virus (CMV) и Tomato aspermy virus (TAV) [2].

Цель данного этапа исследования – определение микробиотических характеристик растений-хозяев возбудителя желтой болезни гиацинта *Xanthomonas hyacinthi*, значимых для его диагностики.

Материалы и методы. Для изучения культивируемых микроорганизмов, ассоциированных с растениями-хозяевами *X. hyacinthi*, были использованы растения 3 сортов гиацинта и 1 сорта мускари в контейнерах, приобретенные в розничной торговле в марте 2021 г, а также 5 растений и непроросших луковиц гиацинта с признаками болезней. Кроме того, исследовали 2 декоративных растения пролески из Республики Крым, растения двух сортов Пролески сибирской (*S. sibirica* L.) и двух сортов Мышиного гиацинта (Мускари) армянского (*M. armeniacum* Leichtlin), культивируемых в открытом грунте в Московской области из посадочного материала происхождением из Нидерландов. Состав микробиоты изучали в фазу позднего цветения – плодоношения.

Растения промывали под водопроводной водой с детергентом, ополаскивали стерильной водой и обсушивали стерильной салфеткой. С помощью стерильных ножниц вырезали около 1 см надземной части непосредственно над луковицей и в верхней трети растения. Луковицы освобождали от сухих чешуй, скальпелем разрезали вдоль и поперек, отбирали сегменты толщиной около 2 мм от верхнего горизонтального и противоположного нижнего вертикального среза, захватывая донце. Растительную ткань взвешивали, помещали в пакеты для гомогенизации, разбивали деревянным молотком до однородной массы. Добавляли фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,2). Встряхивали в течение 15 мин на ротационном шейкере со скоростью 150 об/мин. Готовили 5-8 10-кратных разведений в стерильном PBS. По 100 мкл экстрактов и их разведений высевали на чашки Петри с ПДГА. Для определения количества бактерий в разных частях растения экстракты и разведения высевали в 2-кратной повторности. Чашки инкубировали 96 часов при 27°C, а затем в течение 14 дней на свету при комнатной температуре. Просматривали после 24 часов инкубации ежедневно.

Определяли среднее количество колониеобразующих единиц бактерий в 1 г растительной ткани стандартными методами [5]. Колонии бактерий и грибов различной морфологии отсевали на ПДГА и КГА соответственно. Для определения антагонистических свойств по 4 бактериальных изолята наносили крестом на чашку Петри со средой ПДГА, инкубировали, как указано выше в течение 4-5 суток. Между изолятами наносили по 2 дуги суточной культуры типового штамма *X. hyacinthi* CFBP 1156. Грибные изоляты помещали в центр чашки со средой ПДГА и инкубировали при комнатной температуре до

достижения размера 1-2 см. Культуру *X. hyacinthi* подсевали радиальными лучами [5]. На данном этапе работы отдельные грибные изоляты определяли классическими методами, бактериальные изоляты идентифицировали методом секвенирования по Сэнгеру с универсальными праймерами 8UA/519R.

Результаты и их обсуждение. Количество бактерий в тканях горшечных растений составило (КОЕ/г) около 10^2 - 10^3 для листьев, 10^3 - 10^5 для основания побегов, до 10^5 - 10^7 для луковиц (табл., рис.1). Растения с симптомами мягкой гнили и усыхания содержали бактерии в количестве более 10^9 КОЕ/г.

Таблица – Результаты анализа образцов горшечных растений и растений с симптомами заболеваний

Растение	№ обр	Часть раст.	Кол-во бакт, КОЕ/г	Желтые	Антагон	Грибы
Горшечные растения						
Гиацинт -1	1	пл	$2,4 \times 10^2$	+ ед	-	+
	2	оп	$2,1 \times 10^4$	+ ед	+	+
	3	лук	$2,1 \times 10^5$	+ед	-	+
Гиацинт -2	4	пл	$8,2 \times 10^2$	-	+	+
	5	оп	$3,6 \times 10^3$	+ ед-	+	+
	6	лук	$4,3 \times 10^5$	+ ед	+	+
Гиацинт-3	7	пл	$4,4 \times 10^1$	-	-	+
	8	оп	$1,6 \times 10^4$	+	-	+
	9	лук	$2,7 \times 10^5$	+ ед	-	+
Мускари-1	16	пл	$3,2 \times 10^3$	+ ед	-	-
	17	оп	$3,7 \times 10^3$	+ ед	-	-
	18	лук	$2,0 \times 10^5$	+ ед	-	-
Мускари-2	19	пл	$6,0 \times 10^2$	+ ед	-	-
	20	оп	$3,4 \times 10^5$	++	-	-
	21	лук	$2,1 \times 10^7$	++	-	-
Растения с симптомами мягкой гнили и усыхания						
Гиацинт-4	22	оп	$\geq 1,5 \times 10^9$	-	-	-
	23	лук	$2,7 \times 10^8$	+ед	-	-
Гиацинт-5	24	оп	$3,6 \times 10^7$	++	-	-
	25	лук	$2,1 \times 10^7$	++	-	-
Гиацинт-6	26	оп	$\geq 3,2 \times 10^3$	NA	-	NA
Гиацинт-7	27	оп	$\geq 3,2 \times 10^9$	-	-	+ ед
Гиацинт-8	28	оп	$\geq 3,6 \times 10^9$	-	-	-

пл – верхняя треть листьев и побега; оп – основание побега, лук - луковица

В тканях горшечных растений гиацинтов и мускари без видимых симптомов заболеваний желтопигментированные изоляты были выявлены в 87% образцов и в 100% растений. Они не встречались в 2-х образцах тканей верхней части листьев. В тканях основания побега 1 растения гиацинта и во всех тканях 1 растения мускари желтые колонии составляли основную массу бактерий (табл.), тогда как в других образцах такие колонии были единичны. Грибы были выделены только из растений гиацинтов, в микробиоте мускари грибов не отмечено, что может быть связано с обработками растений фунгицидами при выгонке.

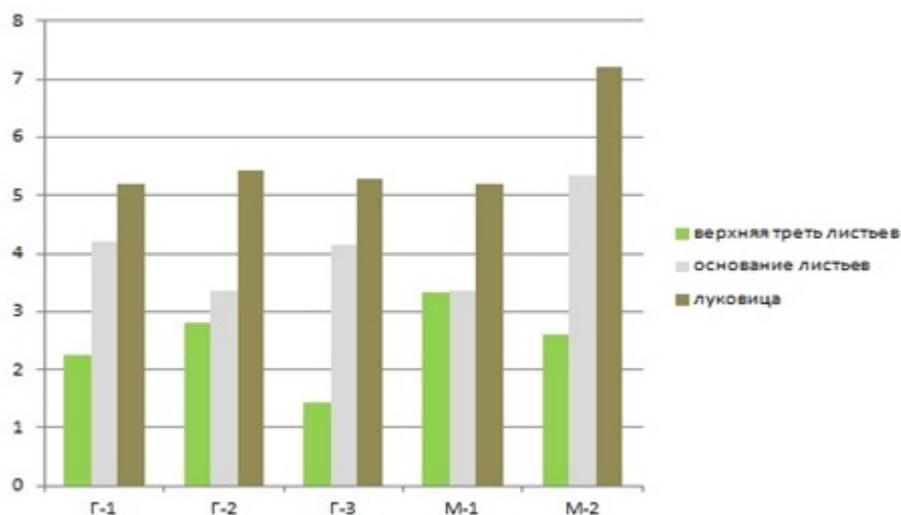


Рисунок 1 – Количество культивируемых бактерий в различных частях горшечных растений гиацинта и мускари

(ось абсцисс: № растения (см. табл.); ось ординат: lg числа КОЕ в 1 г растительной ткани)

В растениях и луковицах гиацинтов с симптомами мягкой гнили и усыхания желтые колонии были обнаружены в массе в луковице и основании побега 1 растения, а также в луковице еще одного растения, что составило 43% образцов и 40% растений. Следует отметить, что грибы в данных образцах практически не выявлялись, по всей видимости, по причине подавляющей бактериальной инфекции. Угнетения роста *X. hyacinthi* выделенными изолятами не наблюдалось (табл.).



Рисунок 2 - Антагонистические свойства бактерий (слева) и грибов (справа) по отношению к возбудителю желтой болезни гиацинта *X. hyacinthi*.

Среди 24 образцов тканей, отобранных от 11 растений открытого грунта, в 54% и 72% соответственно были обнаружены в основном одиночные желтопигментированные колонии. Среди грибов чаще всего встречались изоляты р. *Cladosporium*. Кроме того, выявлены представители родов

Acremonium, Fusarium, Tritirachium, Aspergillus. Антагонистические свойства по отношению к возбудителю желтой болезни гиацинта отмечены у 2 бактериальных изолятов, выделенных их листьев сциллы из Московской области. Также рост возбудителя подавлял один из изолятов грибов (рис.2).

Бактериальные изоляты, идентифицированные на данном этапе относились к родам *Xanthomonas, Sphingobium, Sphingobacterium, Microbacterium, Rahnella, Curtobacterium, Staphylococcus, Bacillus, Pseudoduganella (Duganella)*. Желтые колонии присутствовали в 63% образцов и в 71% растений. Антагонистические свойства по отношению к возбудителю желтой болезни гиацинта отмечены в 21% образцов и 27% растений. В некоторых случаях среди морфологически сходных изолятов встречались как атагонисты, так и нейтральные по отношению к возбудителю, что требует уточнения на следующем этапе работы.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что в составе культивируемой микробиоты растений-хозяев без признаков повреждений болезнями преобладают бактерии, однако практически во всех образцах присутствовали и грибы. Количество микроорганизмов в здоровых тканях колеблется от 10^2 - 10^3 для листьев до 10^5 - 10^7 для луковиц. Желтопигментированные колонии, некоторые из которых относятся к близким таксонам и могут быть спутаны при изоляции с колониями *X. hyacinthi* или давать с ним перекрестные реакции в экспресс-тестах, выявлены более чем в 70% исследованных растений. Более чем в четверти растений присутствовали микроорганизмы, преимущественно бактерии, способные подавлять рост возбудителя при изоляции на среду ПДГА, а возможно и при хранении и выращивании растений, что может приводить к разнице в результатах тестов, основанных на выявлении живых бактерий и их ДНК. Таким образом, были показаны особенности микробного состава растений-хозяев, которые необходимо учитывать при разработке и испытании методов и схемы диагностики возбудителя желтой болезни гиацинта *X. hyacinthi*.

Библиографический список

1. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cabi.org> (дата обращения 25.10.2021).
2. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.eppo.int> (дата обращения 27.10.2021).
3. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.plantarium.ru> (дата обращения 27.10.2021).
4. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards/pm7_diagnostics (дата обращения 27.10.2021).
5. *Методы почвенной микробиологии и биохимии: учебное пособие* / И. В. Асеева; ред. Д. Г. Звягинцев. - 2-е изд., испр. и доп. - М.: МГУ, 1991.

Characterization of the microbiota of bulb flowers in application to the development of diagnostics of the yellow disease agent *Xanthomonas hyacinthi* (Wakker) Vauterin et al.

Drenova N.V.¹, Yaremko A.B.¹, Sneyder E.Yu.¹, Vankova A.A.², Sviridova L.A.², Menshova S.S.², Kondratyev M.O.¹

¹ *All-Russian Plant Quarantine Center, 140150, Russia, Bykovo, Pogranichnaya str., 32.*

² *Russian Timiryazev State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 49.*

Abstract: *The article presents the first results of the composition and characteristics studies of host plants microbial communities of the causative agent of the quarantine yellow disease of hyacinth (*Xanthomonas hyacinthi*), which have potential value in the development of pathogen isolation and molecular diagnostic methods.*

Key words: *yellow disease of hyacinth, *Xanthomonas hyacinthi*, host plant, *Hyacinthus*, *Scilla*, *Muscari*, microbiota, antagonism, quarantine.*