

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.26.253.2.871

ФЕНОТИПОВІ ОЗНАКИ ШТАМІВ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*, ВИДІЛЕНИХ ІЗ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ

© 2008 р. С. М. Мороз¹, Є. П. Черненко²,
Л. М. Яковлева¹, Р. І. Гвоздяк¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

²Національний аграрний університет

(Київ, Україна)

Досліджено фенотипові ознаки та агресивність штамів збудника бактеріального раку томата *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, виділених із різних екологічних ніш України. Показано, що штамам властиві як постійні, так і гетерогенні фенотипові ознаки, незалежно від місця виділення, органа рослини-живителя, терміну зберігання за штучних умов. Штами, ізольовані в Україні, відрізняються від виділених у інших регіонах світу кількістю засвоєваних вуглецьвмісних речовин у межах, характерних для виду. Високоагресивні штамми за довгого зберігання в колекції частково втрачають агресивність.

Ключові слова: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Lycopersicon esculentum* Mill., бактеріальний рак томата, фенотипові ознаки, агресивність, екологічні ніші

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) вперше описаний у 1910 р. в Північній Америці як збудник бактеріального раку томата. Це спорадичний, але дуже важливий і агресивний патоген томата, який останніми роками поширився в усі країни світу, в тому числі в Україну. Часто недооцінка загрози патогена є помилковою через те, що впродовж кількох років він не виявляється або знаходиться в обмеженій кількості, а потім раптово захворювання сягає масштабів епідемії [5, 6].

Симптоми захворювання можуть виявлятися двома шляхами: або як системна судинна інфекція, або як поверхнева чи локальна інфекція. Широкий спектр симптомів залежить від різних чинників (сорту, технології вирощування, клімату, стадії росту рослини, погодних умов,

агресивності патогена і т. п.). Зважаючи на це важлива рання діагностика захворювання, яка базується на виділенні патогена та його ідентифікації.

Ідентифікація Cmm за фенотиповими ознаками є надійною і відносно простою, однак часто відзначають гетерогенність Cmm навіть в ізолятів, виділених з одного зразка [1]. Гетерогенність популяції бактерій зумовлена необхідністю пристосування до певної екологічної ніші, зміни умов існування, що забезпечує збереження виду.

Метою досліджень було вивчення впливу екологічних чинників на фенотипові ознаки Cmm. Для цього досліджували фенотипові ознаки штамів Cmm, виділених із уражених рослин томата в Україні в 1953-1960 рр. (колекційні) та в 2004-2006 рр. (свіжовиділені) і порівнювали їх з ознаками штамів, виділених з томата в інших регіонах світу, що наведені в роботі [6].

Адреса для кореспонденції: Мороз Світлана Миколаївна, Інститут мікробіології і вірусології НАНУ, вул. Академіка Заболотного, 154, м. Київ МСП, Д03680, Україна, e-mail: Svitmoroz@ukr.net

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були 9 свіжовиділених штамів *Stm* та 11 штамів із колекції фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАНУ (табл. 1). Для виділення *Stm* зразки уражених томатів отримували з різних господарств, а також при обстеженні нами томатів у Київській, Харківській та Херсонській областях. Колекційні штами зберігали на скошеному картопляному агарі за кімнатної температури зі щорічним пересіванням на свіже середовище. Агресивність штамів визначали за результатами штучного зараження зелених плодів томатів за 5-ти бальною шкалою [1]. Морфологічні, фізіологічні та біохімічні властивості бактерій вивчали методами, описаними в [2, 7]. Кластерний аналіз проведено за допомогою програми SPSS. Порівнювали характеристики свіжовиділених і колекційних українських штамів *Stm* та виділених з інших регіонів світу й описаних в [1, 6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Зразки томатів для мікробіологічного аналізу відбиралися з такими симптомами: однібічне або загальне в'янення листків, яке починається зазвичай з нижніх листків. Згодом в'януть квітки і вся рослина. При повздовжньому і поперечному зрізах стебла спостерігали покориичневіння судин. На плодах – світлі плями з темним центром – характерний симптом “пташине око.”

Досліджувані нами штами виділені з вегетуючих томатів у різні роки та з різних регіонів України (“українські штами”). Частина з них тривалий час (38–54 роки) зберігалися за штучних умов, які для бактерій є вторинною екологічною нішею. Всі колекційні штами одразу після ізоляції з первинної природної екологічної ніші були високоагресивними. За умов зберігання в колекції вони не втратили патогенності, але у половини з них знизилася агресивність, зокрема у штамів 7960 і 7961 до межі, близької до повної її втрати (табл. 1).

Таблиця 1

Походження, агресивність та належність до кластерів за фенотиповими ознаками штамів *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, виділених в Україні

| Кластер | Штам | Походження штаму | | | Агресивність штаму |
|---------|------------|--------------------------------|---------------|------------------------|--------------------|
| | | місце виділення | рік виділення | орган рослини-живителя | |
| 1 | 2п, 3, 3-1 | Київ, Пуща-Водиця, теплиця | 2006 | стебло | ++++ |
| | 7744 | Київська обл. | 1954 | * | +++ |
| | 7961 | Черкаська обл., Умань | 1957 | * | ++ |
| | 14 | Київська обл. | 1953 | плоди | ++++ |
| | 7934 | * | 1956 | * | +++ |
| | 7905 | Київська обл. | * | листки | ++++ |
| | 13а | Черкаська обл. | 1953 | плоди | ++++ |
| | 7960 | Черкаська обл., Умань | 1957 | * | ++ |
| | Тк-5 | Київ, Пуща-Водиця, гідропоніка | 2004 | корінь | +++ |
| 2 | 7748 | Київська обл. | 1954 | * | ++++ |
| | 8504 | Київ | 1969 | * | +++ |
| | Совки-1 | Київ, Совки, теплиця | 2004 | листки | +++ |
| 3 | Тл-3 | Київ, Пуща-Водиця, теплиця | 2004 | листки | +++ |
| | 8240 | * | 1960 | листки | ++++ |
| 4 | 7741 | Черкаська обл. | 1954 | * | +++ |
| | 20 | Харківська обл., смт Мерефа | 2006 | стебло | ++++ |
| 5 | 25 | Харківська обл., смт Мерефа | 2006 | головний корінь | ++++ |
| 6 | Херсон | Херсон, теплиця | 2004 | чашолистик | +++ |

Примітка. * – дані відсутні. Агресивність ++++ – висока, +++ – середня, ++ – помірна.

Відмінності у використанні як єдиного джерела вуглецю цитрату та деяких вуглеводів штамми *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, виділеними в Україні та інших регіонах світу

| Джерело вуглецю | Кількість штамів, (%) | | | |
|------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------|----------------------------------------|
| | Українські штами | | | Штами з інших регіонів світу [6], n=16 |
| | свіжовиділені n=9 | колекційні n=11 | всього n=20 | |
| цитрат | 7 (78) | 11 (100) | 18 (90) | 12 (75) |
| маноза | 8 (89) | 11 (100) | 19 (95) | 1 (6) |
| глюкоза | 7 (78) | 10 (91) | 17 (85) | * |
| галактоза | 7 (78) | 7 (64) | 14 (70) | 1 (6) |
| арабіноза | 4 (44) | 4 (36) | 8 (40) | 2 (12) |
| мальтоза | 3 (33) | 1 (9) | 4 (20) | 1 (6) |
| лактоза | 3 (33) | 2 (18) | 5 (25) | * |
| рафіноза | 1 (11) | 0 | 1 (5) | 0 |
| меліцитоза | 0 | 0 | 0 | 3 (19) |
| сахароза | 0 | 0 | 0 | 1 (6) |
| дульцитол, манітол, сорбітол | 0 | 0 | 0 | 0 |

Примітка. * - не визначали.

В уражених тканинах популяція патогена завжди гетерогенна за агресивністю і складається з високоагресивних та авірулентних клонів. Можливо, популяція, яка сформувалася за штучних умов, теж складається з клонів різної агресивності, у тому числі авірулентних, що знижує агресивність популяції в цілому. Це питання потребує додаткового вивчення.

Збереження патогенних властивостей штамів *Стт* за культивування поза рослиною-живителем вказує на те, що ця властивість бактерії закріплена на генетичному рівні.

Незалежно від екологічних ніш, усі досліджені штами характеризуються як постійними, так і варіабельними фенотиповими ознаками. За умов вирощування на пластинках картопляного агару при 28 °С на третю добу росту бактерії утворювали круглі опуклі з рівним краєм непрозорі жовті колонії. Ріст повільний, стаціонарної фази досягали на 3-тю добу. Клітини – короткі, часом зігнуті палички із заокругленими кінцями, неспорозні, грам-позитивні, нерухомі. Штами *Стт* завжди оксидазонегативні, каталазопозитивні, не розкладають білок до індоли і сірководню.

Всі досліджені штами викликали дуже повільне зсідання молока (на 21–30 день) з утворенням характерного жовтого кільця (на 7–

14 день). Майже половина виявляли слабкі редуруючі властивості щодо лакмусового молока. Жоден штам *Стт* не був здатний відновлювати нітрати до нітритів. Цитрат використовували як єдине джерело вуглецю всі колекційні штами *Стт*, виділені в Україні, а також 78 і 75 % свіжовиділених українських штамів та з інших регіонів світу [6] відповідно (табл. 2).

Незалежно від місця ізолювання, штами були однаково варіабельні за низкою ознак (табл. 2). Однак кількість (відсоток) штамів, гетерогенних за певною ознакою, залежав від екологічної ніші. Тривале (38–54 pp.) сапротрофне перебування колекційних штамів дещо змінило їх реакцію на джерела вуглецевого живлення. Постійне багаторазове вирощування на картопляному агарі сприяло засвоєнню всіма колекційними штамми цитрату і манози, тоді як свіжовиділені штами за цією ознакою склали 78–89 %. Глюкозу теж частіше використовували колекційні, ніж свіжовиділені штами. Щодо вуглецю інших органічних сполук, то, за штучних умов відсоток штамів, які їх засвоювали, був меншим порівняно зі свіжовиділеними. Якщо для засвоєння галактози й арабінози ці відмінності були незначними, то для лактози та мальтози вони були суттєвими. Рафінозу засвоював тільки один свіжовиділений ізолят. Втрата здатності засвоювати певні джерела ву-

ФЕНОТИПОВІ ОЗНАКИ ШТАМІВ

глецевого живлення за тривалого зберігання штамів відбувалася частіше за тими ознаками, які рідше зустрічалися серед свіжовиділених (табл. 2).

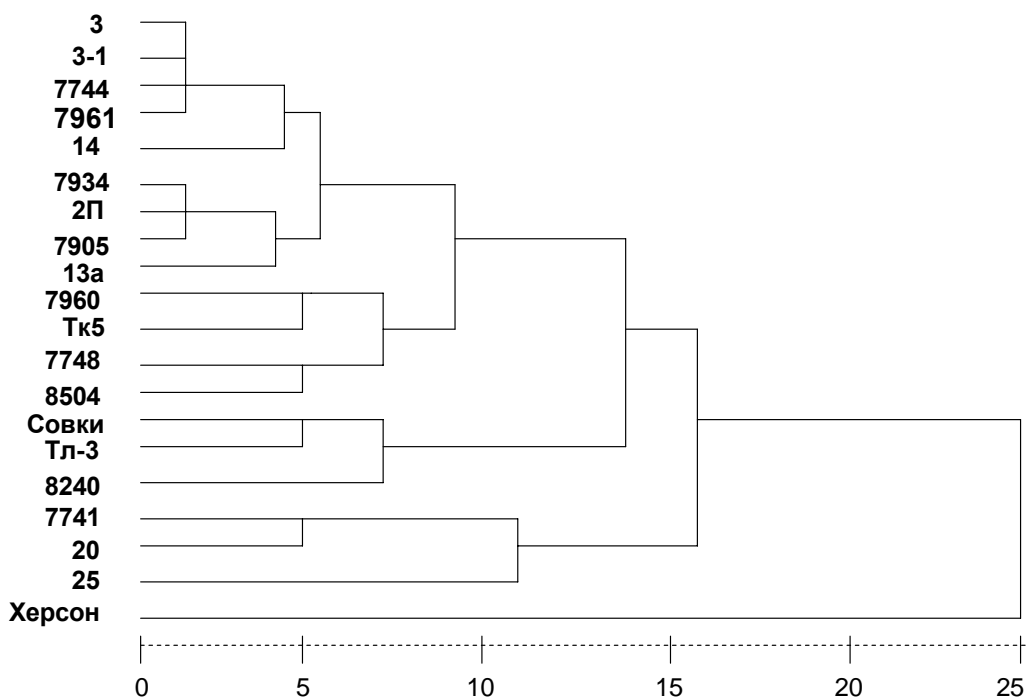
Дещо більший вплив на властивості бактерій *Stm* мають відмінні від українських умови вирощування рослин-живителів. Так, розкладати білки до сірководню був нездатний жоден штам *Stm*, виділений із уражених органів рослин, які росли в Україні, так само як і вірменські штамми [1]. У цей же час, утворення сірководню з пептону є характерною ознакою збудників бактеріального раку томата, ізольованих в інших країнах [3–5]. Виділені в Україні штамми *Stm* засвоювали більшу кількість вуглецьмісних сполук, ніж іноземні. Меліцитозу і сахарозу українські штамми не засвоювали, а незначний відсоток штамів з інших країн були здатні це робити.

Досліджені штамми *Stm*, виділені з різних органів уражених рослин томата в різних областях України впродовж 1953–2006 рр., за ступенем спорідненості за їх фізіологічними та біохімічними характеристиками були згруповані у 6 кластерів (рисунок, табл. 1).

До складу першого кластера увійшли три свіжоізольовані з теплиці Києва та шість колекційних штамів *Stm*, виділені в Київській і Черкаській областях в 2006 та 1953–56 рр. від-

повідно. Всі штамми цього кластера розріджували желатин, використовували цитрат як єдине джерело вуглецю, ферментували з утворенням кислоти глюкозу та манозу, більшість також галактозу, чотири штамми освітлювали лакмусове молоко. Другий кластер сформували один свіжоізольований (2004 р.) та три колекційні штамми *Stm*, також з Київської і Черкаської областей (1954–69 рр.). Всі штамми другого кластера розріджували желатин, мали цитратазу, використовували з кислотоутворенням глюкозу, галактозу, арабінозу та манозу, два штамми, в тому числі свіжоізольований, також лактозу. Лакмусове молоко освітлювали два штамми *Stm*.

У третьому кластері об'єднані два свіжоізольовані штамми *Stm* з різних тепличних господарств Києва та один колекційний штам. Штамми третього кластера характеризувалися наявністю желатинази та цитратази, редукцією лакмусового молока, ферментацією з утворенням кислоти глюкози, мальтози, арабінози, манози, більшість також галактози і лактози. До складу четвертого кластера увійшли один свіжоізольований штам *Stm* з Харківської та колекційний штам з Черкаської області. Ці штамми розріджували желатин, але не редукували лакмусове молоко, з досліджених вуглеводів використовували з утворенням кислоти тільки манозу, цитрат використовував лише колекційний штам.



Дендрограма спорідненості за фенотиповими ознаками штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, виділених з різних еконіш (ієрархічний кластерний аналіз)

У п'ятому кластері – один свіжоізольований штам *Cmm* з Харківської області, найменш ферментативно активний, не використовував жоден із досліджених вуглеводів, але мав желатиназу та цитратазу, освітлював лакмусове молоко. Шостий кластер представлений окремим свіжоізольованим штамом *Cmm* з Херсона, який виявляв найбільшу ферментативну активність: розщеплював з утворенням кислоти глюкозу, галактозу, арабінозу, мальтозу, лактозу, манозу та рафінозу. Разом з цим, він не мав желатинази і цитратази, але редукував лакмусове молоко.

Штами *Cmm*, які входять до чотирьох найчисельніших кластерів, були виділені з різних уражених органів томата – стебла, кореня, плодів, листя.

Отже, штами *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* різного екологічного походження, крім низки постійних фенотипових ознак, мали й гетерогенні ознаки. Штами, виділені з уражених рослин томатів в Україні, відрізнялися від виділених в інших регіонах світу кількістю засвоюваних вуглецевмісних речовин у межах, характерних для *Cmm*. Високоагресивні штами *Cmm* за довгого зберігання в колекції частково втрачали агресивність.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Галачьян Р. М.* Бактериальные болезни томатов в Армянской ССР и мероприятия по борьбе с ними. – Ереван: Изд-во АН Армянской ССР, 1958. – 272 с.
2. *Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений / К.И. Бельтюкова, М.С. Матышевская, М.Д. Куликовская, С.С. Сидоренко.* – Киев: Наук. думка, 1968. – 316 с.
3. *Определитель бактерий Берджи.* 9-е издание / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса (Пер. с англ.). – М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 432 с.
4. *Bradbury J. F.* Guide to Plant Pathogenic Bacteria. – CAB International mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England, 1986. – 332 p.
5. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* // OEPP/EPPO Bulletin. – 2005. – V. 35. – P. 275-283.
6. *Kämpfer P., Seiler H., Dott W.* Numerical classification of coryneform bacteria and related taxa // J. Gen. Appl. Microbiol. – 1993. – V. 39, N 2. – P. 135–214.
7. *Methods in phytobacteriology / Ed. Z. Klement, K. Rudolf, D.C. Sands.* – Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. – 568 p.

Надійшла до редакції
07.02.2008 р.

PHENOTYPIC PROPERTIES OF *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* STRAINS, ISOLATED FROM DIFFERENT ECOLOGICAL NICHES

S. M. Moroz¹, E. P. Chernenko², L. M. Yakovleva¹, R. I. Gvozdyak¹

¹*Institute of Microbiology and Virology
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

²*National Agrarian University
(Kyiv, Ukraine)*

Phenotypic properties and aggressiveness of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strains, an agent of bacterial cancer of tomato, isolated from different ecological niches of Ukraine were studied. It is shown that both permanent and heterogeneous phenotypic properties are incident to the strains, regardless of place of isolation, organ of host plant, term of storage in simulated conditions. Strains, isolated in Ukraine, differ from the ones, selected in other regions of the world, by amount of the mastered carbonaceous substances in the range of species. High-aggressive strains partly lose an aggressiveness at the protracted storage in collection.

Key words: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Lycopersicon esculentum* Mill., bacterial canker of tomato, phenotypic properties, aggressiveness, ecological niches

ФЕНОТИПОВІ ОЗНАКИ ШТАМІВ

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ШТАММОВ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ

С. Н. Мороз¹, Е. П. Черненко², Л. М. Яковлева¹, Р. И. Гвоздяк¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

²Национальный аграрный университет
(Киев, Украина)

Исследованы фенотипические признаки и агрессивность штаммов возбудителя бактериального рака томата *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, выделенных из разных экологических ниш Украины. Показано, что штаммам свойственны как постоянные, так и гетерогенные фенотипические признаки, независимо от места выделения, органа растения-хозяина, срока хранения в искусственных условиях. Штаммы, изолированные в Украине, отличаются от выделенных в других регионах мира количеством усваиваемых углеродсодержащих веществ в пределах, характерных для вида. Высокоагрессивные штаммы при длительном хранении в коллекции частично теряют агрессивность.

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Lycopersicon esculentum* Mill., бактериальный рак томата, фенотипические признаки, агрессивность, экологические ниши