

Л.М. Яковлева¹, Л.В. Махия¹, Т.Н. Щербина¹, Л.Е. Огородник²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП Д03680, Украина

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

MICROSCOCUS SP. – ВОЗБУДИТЕЛЬ НЕКРОЗА ЛИСТЬЕВ КАШТАНОВ (*AESCULUS L.*) В КИЕВЕ

В работе описаны симптомы заболевания и дана характеристика группы высокоагрессивных фитопатогенных микроорганизмов, которые выделены из образцов усыхающих каштанов (*Aesculus L.*) в г. Киеве. Микроорганизмы идентифицированы как *Microscocus sp.*

Ключевые слова: Фитопатогенные бактерии, бактериозы, каштан, *Microscocus sp.*, *Aesculus L.*

Виды рода *Aesculus L.* относятся к быстрорастущим древесным породам, они отличаются высокой декоративностью, особенно в период цветения. Каштаны – это ценные парковые культуры, которые используют для одиночных и групповых посадок, посадки вдоль дорог, озеленения улиц, создания аллей и в других садово-парковых композициях. В благоприятных условиях их возраст может достигать 300-500 лет. В Украину интродуцировано 10 видов, из которых 8 видов горькокаштанов произрастает в Киеве. В настоящее время в Киеве насчитывается около двух миллионов деревьев каштанов, в т.ч. около 11000 – в возрасте 50-130 лет [4].

В последние годы экологи и городские власти обеспокоены тем, что каштаны стали желтеть в середине лета, сбрасывать преждевременно листья и усыхать. Такое явление отмечено в Киеве и других городах Украины: Черновцах, Тернополе, Львове, Ужгороде, Луцке, Днепропетровске, а также в странах Западной Европы. Среди причин называются разные, в том числе антропогенного характера: тяжелые металлы, которые попадают в пространство с выхлопными газами автомобилей, системы подземных коммуникаций, засоленность почвы вследствие посыпания солью дорог в зимний период, летом – парниковый эффект, создаваемый городским асфальтом и, как следствие, страдают корни деревьев, каштаны не получают достаточного питания через корневую систему, в результате ослабевают защитные функции перед патогенами [4; 5].

В литературе имеются данные о поражении каштанов возбудителями грибной микрофлоры [4-5, 10], представителями энтомофауны [4], в частности в Украине – каштановой минирующей молью *Cameraria ohridella* [2, 5]. Первые упоминания об ожоге каштанов встречаются в литературе в конце 18-го столетия [8]. Среди бактериальных болезней упоминают бактериальный рак корней (возбудитель *Agrobacterium tumefaciens*) и корневой шейки (возбудитель *Bacterium costanicolus* Cavare) [4]. *Pseudomonas (Bacterium) castaneae* вызывает «ожог», который проявляется в виде пятнистостей на листьях, молодых побегах и почках [11]. Однако признаки названных видов микроорганизмов и их систематическое положение недостаточно изучены [11].

Целью наших исследований было определить, имеют ли отношение фитопатогенные бактерии к массовому пожелтению, преждевременному сбрасыванию листьев и усыханию каштанов в Киеве.

Материалы и методы. Обследования деревьев каштанов на улицах и в парках Киева проводили с апреля по август, начиная с 2004 г. Набухшие и нераспустившиеся почки, пораженные листья, 1-3-летние побеги подвергались фитобактериологическому анализу. Кусочки пораженных тканей гомогенизировали и высевали на картофельный агар (КА). Бактерий выращивали при температуре 27-28 °С.

Патогенные и вирулентные свойства изолятов определяли путем искусственного заражения почек, листьев на срезанных ветвях каштана в лабораторных условиях и в естественных природных условиях на каштанах, произрастающих в районе Института микробиологии и вирусологии НАН Украины (Киев, Феофания). Кроме того, проводили искусственное заражение зеленых плодов каштанов. Во всех вариантах использовали суспензию бактерий

© Л.М. Яковлева, Л.В. Махия, Т.Н. Щербина, Л.Е. Огородник, 2013

(в концентрации 10^9 кл/мл стерильной водопроводной воды), которую наносили на поверхность набухших почек, листьев, черешков растений с последующим ранением иглой. Как контроль использовали стерильную водопроводную воду. Повторность опытов 5-7-кратная. За искусственно инфицированными образцами наблюдали 3 недели в лабораторных условиях и до 2 месяцев в природных условиях. Результаты искусственного заражения учитывали по 5-бальной шкале.

Физиолого-биохимические, культуральные свойства выделенных бактерий изучали, используя классические методы [3, 13]. Микроскопию окрашенных и неокрашенных клеток проводили, используя микроскоп Olympus-BX 41. Жирные кислоты определяли согласно [12]. Метаноллиз жирных кислот проводили при 100°C , метиловые эфиры дважды экстрагировали смесью эфир-гексан (1:1), с последующим упариванием. Метиловые эфиры жирных кислот растворяли в гексане и определяли на хромато-масс-спектрометре Agilent 6800/5973 N.

Бактерии идентифицировали в соответствии с определителем Берджи [7] и оригинальными работами [1, 9, 11].

Результаты и их обсуждение. Образцы с признаками поражения почек и листьев каштанов для анализа отбирали при периодических обследованиях деревьев каштанов на улицах Киева: Богдана Хмельницкого, Дехтяревская, Белорусская, Обсерваторная, Тургеневская, Гоголевская, Академика Заболотного, Воздухофлотский проспект, Донецкая, Павловский сквер, Мариинский парк, в районах аэропорта «Жуляны», Лукьяновского рынка, Института сахарной свеклы, на Русановке в период конец апреля – август, начиная с 2004 г. На отобранных образцах веток каштанов отмечали наличие укороченных побегов и нераспустившихся почек. На листьях уже в конце мая – середине июня – наличие некротических пятен. Светло-коричневые, ярко-коричневые или рыжевато-коричневые неправильной формы, угловатые или с закругленными краями некротические пятна с более темной окантовкой. Некрозы от небольших до очень крупных размеров, расположены по всей поверхности листа, часто – между жилкам или вдоль жилок. Иногда к некротизированной ткани листа примыкала зона водонасыщенных тканей, что свидетельствовало об активном развитии патологического процесса. Вокруг некрозов отмечали хлороз в виде неравномерной зоны или нецельной каймы. Пораженные листья вскоре желтели и преждевременно опадали. На некоторых видах каштанов пораженная ткань листьев подсыхала и выпадала (образцы отобранные в Павловском сквере). Листья становились продырявленными. Встречались поражения по типу краевого ожога листьев. Пораженные листья усыхают и опадают, начиная с конца июля – начала августа. Деревья преждевременно оголяются, становятся декоративно непривлекательными. Признаки заболевания отмечали на деревьях различного возраста: как на молодых, так и на старых. Со временем заболевание приводило к усыханию деревьев, если деревья не были своевременно выкорчеваны коммунальными службами города. На некоторых деревьях с описанными признаками заболевания начиная с 2006 г. уже в конце мая отмечали наличие сначала в небольших количествах, а с годами – массовое заселение минирующей моли.

Нами было проанализировано более 100 собранных образцов листьев и 16 – почек каштанов, выделено 62 изолята. После проверки патогенных свойств отобрано более 40 патогенных изолятов для дальнейших исследований. Среди патогенной микрофлоры наше особое внимание привлекла группа медленно растущих микроорганизмов, которые вырастали на картофельном агаре через 8–10 суток после посева образца. Колонии очень мелкие (до 0,5–1 мм в диаметре) выпуклые, блестящие, гладкие, с ровными краями, бледно желтого, желтого или розового цвета. Бактерии с колониями розового цвета при пересеве иногда вырастали с образованием жидкой слизи. Такие бактерии при последующем пассаже не росли, отмирали. Использование питательных сред с дрожжевым автолизатом или экстрактом не способствовало продлению их жизнеспособности и не стимулировало скорость роста этих микроорганизмов. При длительном хранении культур в лабораторных условиях при пересевах в ноябре-декабре бактерии могли вырастать в виде беловато-кремовых или бледно желтых колоний, которые очень медленно приобретали свою исходную пигментацию.

Бактерии грамположительные, при микроскопии – клетки сферические, располагаются в мазках одиночно, парами, скоплениями, сеточкой (рис. 1). Аэробы. Спор не образуют. Неподвижны. В МПБ – лишь следы роста. Инертны по отношению к различным источникам углерода. Нитраты редуцируют, желатин не разжижают, крахмал не гидролизуют. Сероводо-

род и индол не выделяют. Каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Не вызывают гнили картофеля и моркови. На питательных средах быстро теряют жизнеспособность. Для поддержания в жизнеспособном состоянии свежеизолированные изоляты необходимо пересеивать через каждые 2 недели, а со временем адаптированные к искусственным питательным средам – каждые 4–5 недель.

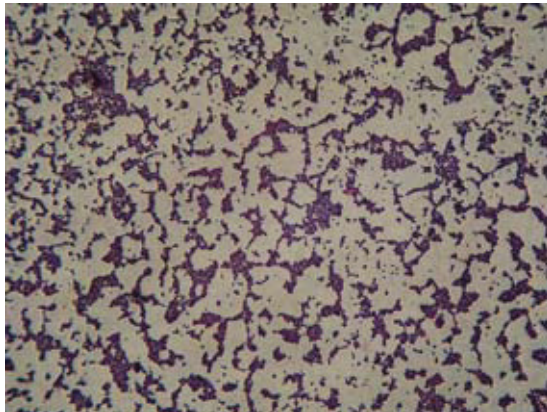


Рис. 1. Окрашенные по Грамму клетки изолята Д-28

Исследуемые изоляты при искусственном заражении вызывали усыхание или замедленное развитие почек. Из таких почек развивались молодые листочки с признаками водонасыщенных краевых поражений. Молодые листочки и точка роста побегов вскоре усыхали. При заражении листьев в конце мая – июле на листьях развивались огромные, различных оттенков коричневые некрозы, которые могли занимать $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ листовой пластинки, вокруг некрозов – широкая зона хлороза, которая увеличивалась и могла охватывать весь лист. Развитие некрозов и хлороза направлено к краю или вершине листа. Инфицированные листья скручиваются вверх от верхушки или вдоль центральной жилки (рис. 2). Под влиянием инфекции листья усыхали. Зона хлороза имела желтый цвет при заражении бактериями с желтоокрашенными колониями и красноватый оттенок – при заражении розовыми культурами. Некрозы, которые развивались в результате заражения бактериями с розовыми колониями, имели часто красно-оранжевую окантовку. Симптомы инфекции, которые проявлялись в результате искусственного заражения штаммами этой группы микроорганизмов, были аналогичны природным. Все изоляты характеризовались высокой степенью агрессивности, которую не утратили при хранении на искусственных средах в течение 5–6 лет. При искусственном заражении бактерии инфицировали листья липы (рис. 3) и слабо – листья клена. Умеренная патогенность бактерий для липы свидетельствует о том, что на месте выбракованных усохших деревьев каштанов нельзя высаживать липы.



Рис. 2. Листья каштанов, искусственно зараженные изолятами Д-28-2 и Д-526.

Несмотря на то, что в лабораторных условиях эти патогены очень медленно растут, при искусственном заражении первые признаки заболевания четко проявляются уже на 4–5-ый

день инфицирования и продолжают развиваться дальше. Появление больших зон хлороза на инфицированных листьях свидетельствует о токсинобразовании этими возбудителями.



Рис. 3. Лист липы, искусственно зараженный изолятом Д-28-1а.

Одним из важных хемотаксономических фенотипических критериев при идентификации бактерий признан состав клеточных жирных кислот. У представителей исследуемых патогенов в составе клеточных жирных кислот выявлены насыщенные кислоты с длиной углеродной цепи от $C_{14:0}$ до $C_{18:0}$ (табл.). Их количество составляло от 72,8 до 97 % от общей площади пиков. Ненасыщенные жирные кислоты не обнаружены. Выявленные тетрадекановая $C_{14:0}$, пентадекановая $C_{15:0}$, гексадекановая $C_{16:0}$, октадекановая $C_{18:0}$ жирные кислоты характерны и для некоторых представителей микрококков [1, 9].

Таблица

Состав основных клеточных жирных кислот исследуемых изолятов

Жирные кислоты	Изоляты			Микрококки (по данным Abel et al., 1963; Васюренко с соавт., 1992)
	Д-28-1а	Д-28х	Д-52б	
Тетрадекановая ($C_{14:0}$)	22,05	34,68	14,94	+
Пентадекановая ($C_{15:0}$)	11,39	12,90	4,33	+
Гексадекановая ($C_{16:0}$)	22,17	24,28	5,97	+
Октадекановая ($C_{18:0}$)	16,29	1,8	72,45	+
Общая сумма пиков	72,8	73,66	97,03	
Другие кислоты	27,2	26,34	2,97	+

Среди описанных фитопатогенных бактерий по биологическим свойствам выделенные нами бактерии не имеют аналогичных. По ряду свойств (замедленный рост, окраска колоний, инертность по отношению к источникам углерода и др.) они схожи на *Xylophilus ampelinus* – возбудителя бактериального некроза и рака древесных частей *Vitis vinifera* в районах Средиземноморья, в Южной Африке, Болгарии, на Канарских островах и в Аргентине [7, 14]. Однако *Xylophilus ampelinus* – это грамотрицательные бактерии и подвижны за счет одного полярного жгутика.

Среди медленно растущих на искусственных средах фитопатогенных бактерий в 1987 г. описан возбудитель бактериозов растений *Xylella fastidiosa* [6]. *Xylella fastidiosa* поражает широкий круг растений, в том числе и древесные породы – персик, сливу, виноград, вяз, дуб и др. Возбудитель вызывает увядание побегов, ожог и опадение листьев, отмирание веток и гибель растений. В составе жирных кислот у штаммов *Xylella fastidiosa* выявлены $C_{16:0}$ - 30%, $C_{16:1}$ - 26,7%, $C_{17:0}$ - 11,6%, $C_{15:0}$ - 8%, в то время как у исследуемых нами микроорганизмов $C_{16:1}$ и $C_{17:0}$ отсутствуют.

В связи с тем, что выделенные нами микроорганизмы из пораженных каштанов – это грамположительные кокки и по качественному составу жирных кислот они схожи с представителями рода *Micrococcus*, мы идентифицируем их как *Micrococcus* sp. Микрококки являются представителями эпифитной микрофлоры на поверхности листьев различных растений. На заре развития фитобактериологии (конец 19 – начало 20 веков) исследователи бактериозов

растений относили возбудителей к видам рода *Micrococcus*. Однако со временем, с усовершенствованием микроскопии и методов идентификации, эти микроорганизмы были переклассифицированы в другие роды и виды фитопатогенных бактерий. В настоящее время только один вид *Micrococcus varians* признан как фитопатоген, хотя фитопатогенность – это свойство необычное для рода *Micrococcus* Cohn. *M. varians* вызывает гниль стебля *Musa textiles* при неблагоприятных условиях культивирования в Гондурасе, Коста Рике и Панаме [11].

Следует отметить, что микрококки, выделенные из пораженных каштанов в г. Киеве, высокоагрессивны на протяжении многих лет сохранения их на картофельном агаре в лабораторных условиях. Возможно, нами выделен новый вид бактерий, или под влиянием Чернобыльской катастрофы или каких-либо других факторов произошли генетические изменения одного из уже имеющегося в Украине вида бактерий. Ведь усиленно болеть каштаны в Украине и Европе стали спустя 13-15 лет после аварии на Чернобыльской АЭС. Из 8-ми видов горькокаштанов, произрастающих в Киеве, более устойчивыми к возбудителю заболевания оказались гибридные *Aesculus carnea*. В связи с изложенным чрезвычайно важно изучение распространения этого вида микроорганизмов в других регионах Украины, пути передачи инфекции, вопросы систематического положения возбудителя и пути снижения его вредности и др.

Л.М. Яковлева¹, Л.В. Махия¹, Т.Н. Щербина¹, Л.Е. Огородник²

¹ Інститут мікробіології і вірусології, Національна Академія Наук України, Київ

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

MICROCOCCUS SP. – ЗБУДНИК НЕКРОЗУ ЛИСТЯ КАШТАНІВ (AESCULUS L.) У КИСВІ

Резюме

Из зразків масово всихаючих каштанів (*Aesculus L.*) у м. Києві ізольовано низку фітопатогенних бактерій. В статті наведено дані щодо групи збудників, які дуже повільно ростуть, є високоагресивними мікроорганізмами. Вони виростають на 8-10 добу після посіву. Колонії дуже дрібні (до 0,5–1 мм у діаметрі) випуклі, блискучі, гладкі, з рівними краями, блідо-жовтого, жовтого або рожевого кольору. Бактерії грампозитивні, клітини сферичні, розташовуються у мазках поодинокі, парами, скопиченнями, сіткою. Аероби. Спор не утворюють. Нерухомі. Інертні щодо різних джерел вуглецю. Нітрати редукують, желатин не розріджують, крохмаль не гідролізують. Сірководень та індол не виділяють. Каталазопозитивні, оксидазонегативні. В лабораторних умовах швидко втрачають життєздатність. У складі жирних кислот виявлені насичені кислоти C_{14:0}^o, C_{15:0}^o, C_{16:0}^o, C_{18:0}^o. Мікроорганізми ідентифіковані як *Micrococcus* sp. Збудник високоагресивний: при зараженні листя каштанів викликає розвиток некрозів, які займають 1/3–1/2 листової пластівки, навколо некрозу – широка зона хлорозу, яка може обіймати увесь лист. Інфіковане листя скручується угору від верхівки або уздовж жилки, всихає.

К л ю ч о в і с л о в а: Фітопатогенні бактерії, бактеріози, каштан, *Micrococcus* sp., *Aesculus L.*

L.M. Yakovleva¹, L. V. Makhinya¹, T.H. Scherbina¹, L.E. Ogorodnik²

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

²Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv

MICROCOCCUS SP. – THE AGENT OF LEAF NECROSIS OF HORSE-CHESTNUTS (AESCULUS L.) IN KYIV

S u m m a r y

A group of phytopathogenic bacteria was isolated from patterns of drying horse-chestnuts (*Aesculus L.*), which grow in Kyiv. The properties of slowly growing, highly aggressive microorganisms have been described in the paper. They grow up on the 8-10th day after sowing. The investigated microorganisms form very small (0.5-1 mm in diameter) colonies on the potato agar. Bacteria are protuberant, shining, smooth with flat edges, they are pale yellow, yellow, or pink. The bacteria are Gram-positive, spherical, are disposed in smears singly, in pairs, as accumulations, or netting. They are aerobes, do not form spores, are not mobile. They are inert in respect of different sources of carbon. They reduce nitrates, do not dilute gelatin, do not hydrolyze starch, do not

release hydrogen sulphide and indole. The bacteria are catalase-positive, oxidase-negative. They do not cause potato and carrot rot. They lose quickly their viability under the laboratory conditions. The saturated acids C 14:0; C 15:0; C16:0; C18:0 have been revealed in the composition of cellular fatty acids. Microorganisms are identified as *Micrococcus* sp. Under artificial inoculation this highly aggressive pathogen causes drying of the horse-chestnut buds and necrosis, which occupies 1/3-1/2 of the leaf plate. A wide zone of chlorosis, surrounding necrosis, may occupy the whole leaf surface. The infected leaves use to twist up from the top (apex) or along a midrib and to dry.

Key words: phytopathogenic bacteria, bacteriosis, horse-chestnut, *Micrococcus* sp., *Aesculus* L.

The author's address: *Yakovleva L.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.*

1. Васюренко В.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных. – Киев: Наук. думка, 1992. – 264 с.
2. Гаманова О.М. Каштанова міль у Києві // Сучасні методи захисту рослин від шкідливих організмів. Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та спеціалістів (2-5 жовтня 2006 р.). – Київ: Колобіг, 2006. – С. 6–7.
3. Гвоздяк Р.І., Яковлева Л.М. Диагностика бактериальных болезней лесных древесных пород // Методические указания. – Москва: ВАСХНИЛ, 1980. – 23 с.
4. Григорюк І.П., Машковська С.П., Яворовський П.П., Колесніченко О.В. Біологія каштанів. – К.: Логос, 2004. – 379 с.
5. Дrajнікова А.В. Моніторинг стану дерев каштана за умов ушкодження мінуючою мілью *Cameraria ohridella* та фітопатогенними грибами // Агроекологічний журнал. – 2010. – № 4. – С. 99–101.
6. Коробко А.П. Новый возбудитель бактериозов растений // Защита и карантин растений. – 1997. – № 7. – С.31.
7. *Определитель* бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – М.: Мир, 1997. – Т.1. – 432 с.
8. Ячевский А.А. Бактериозы растений. – Москва-Ленинград: ОГИЗ (Государственное изд-во колхозной и совхозной литературы), 1935. – 709 с.
9. Abel K., de Schmetzing H., Peterson J.I. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition // J. Bacteriology. – 1963. – **85**, N 5. – P. 1039–1044.
10. Erincik O., Doken M.T., Acikgoz S., Ertan E. Characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates collected from Aydin province in Turkey // Phytoparasitica. – 2008. – **36**, N 3. – P. 249–259.
11. Bradbury J. F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. – Great Britain: Cambrian News Ltd., 1986. – 334 p.
12. Brian B. L., Gardner E. W. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography // Applied Microbiology. – 1967. – **15**, № 6. – P. 1499–1500.
13. *Methods in phytobacteriology* / Ed. Z. Klement, K.Rudolph, D.C.Sands. – Budapest: Arademial Kiado, 1990. – 568 p.
14. Willems A., Gillis M., Kersters K., Van Den Broecke L., De Ley J. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol., 1987. – **37**, N 4. – P. 422–430.

Отримано 15.09.2012