

МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА И ЕГО ОПАСНОСТИ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ МЕСТНЫХ И ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ И ГРУШИ БИОСФЕРНОЙ ТЕРРИТОРИИ «ЫСЫК –КЁЛЬ»

Т. Доолоткелдиева, С. Бобушева, М. Конурбаева

Кыргызско- Турецкий Университет Манас, кафедра Защиты растений, Бишкек, Кыргызстан

Пять изолятов *Erwinia amylovora* как возбудителя бактериального ожога были идентифицированы из сорта груш Талгарка (*Pyrus communis*), и 2 изолята из культурного сорта яблонь (*Malus domestica*), выращиваемых в селах Джети-Огузского и Тюпского районов. Дикие формы розоцветных кустарников, таких как шиповник, рябина, боярышник и смородина проявляли свою естественную сопротивляемость, так как среди них не были выявлены возбудители бактериального ожога. Был проведен *in vitro* и *in vivo* скрининг на относительную устойчивость сортов яблони к бактериальному ожогу. Повышенной устойчивостью к бактериальному возбудителю обладали сорта Вкусная, Дискавери, Каравелла и Останкино. Полученные результаты доказали угрозу возможной вспышки этого заболевания в диких лесах в ближайшее время, так как очаги были уже обнаружены в Тюпском районе, расположенном всего в нескольких километрах от естественных лесов с богатым биоразнообразием розоцветных кустарников и деревьев.

Ключевые слова: *E. amylovora*; молекулярная идентификация; дикие и культурные формы розоцветных; степень устойчивости сортов яблони.

Местные виды яблонь и груш являются важным генетическим ресурсом, их необходимо защищать от возможной гибридизации с культурными сортами яблони, а также от нашествия опасных вредителей и болезней [1,2].

Бактериальный ожог, вызываемый бактерией *Erwinia amylovora* (Enterobacterales; Erwiniaceae), является наиболее разрушительным заболеванием, влияющим на производство семечковых плодов во всем мире [3,4].

С тех пор как в 2009 году в Кыргызстане впервые было сообщено о бактериальном ожоге, он неуклонно распространялся из первоначального эпицентра в северной части, в южную и восточную части страны. В 2011-2015 годах бактериальный ожог нанес значительный ущерб садам в северных и восточных регионах страны [5].

Целью исследования являлся молекулярный мониторинг распространения бактериального ожога в садах и плодовых питомниках биосферной территории Иссык-Куля и фенотипическая характеристика устойчивости местных и коммерческих форм яблони к бактериальному ожогу, а также выявление бактериальных агентов для борьбы с этим заболеванием.

Материал и методика

В 2018- 2021 гг экспедиции были организованы в районы Иссык-Кульской области с биоразнообразием фруктовых деревьев и диких розоцветных растений. Отбор образцов

(листья, плоды и ветки) проводился у шиповника (*Rosa canina*), дикой смородины (*Ribes nigrum*), рябины (*Sorbus sp.*) и боярышника (*Crataegus altaica*) в естественных лесах Ак-Суйского района, у разных сортов яблони (*Malus domestica*) и груши (*Pyrus communis*) в садах и питомниках города Кара-Куль, села Ананьево, Джети-Огузского и Тюпского районов.

Для генетической характеристики использовали специфическую диагностическую ПЦР с парами праймеров PEANT-1 / PEANT-2, G1-F / G2-R и FER1-F / rgER2R для *E. Amylovora*, разработанную ранее [6, 7]. Для различных спейсерных областей использовали специфические праймеры, нацеленные на ранее идентифицированные генотипы CRISPR [8].

Проводили оценку восприимчивости сортов яблонь *in vitro* путем искусственной инокуляции плодов [9]. 24-часовой культурой штамма *Erwinia amylovora* Zh-2. Инокулировали в стерильный буфер с раствором PBS и кожицу плода прокалывали с помощью одноразовых шприцев. Затем инъецированные плоды тестировали в трех экземплярах методом влажной камеры в стерильных чашках Петри при температуре 25–27 ° С в течение пяти дней. Результаты оценивали визуально через 2-5 дней после заражения по времени появления некроза на тканях плодов, чтобы выразить степень восприимчивости сортов яблонь (рис.1).



Рис. 1. Возникновение бактериального экссудата на плодах сорта Юпитер

Скрининг на относительную устойчивость или чувствительность сортов яблони к бактериальному ожогу проводили и *in vivo* в условиях карантинного изолированного помещения. Семнадцать различных сортов яблони были посажены в горшки глубиной 35,5 см и диаметром 10,5 см и выращивали в течение нескольких недель перед инъекцией. Для каждого сорта за один повтор инокулировали пять деревьев. Искусственное заражение бактериальным ожогом осуществляли путем рассечения кончиков двух верхних листьев растущих побегов (минимальная длина побега 25 см) ножницами, пропитанными суспензией высоковирулентного штамма *E. amylovora* Zh-2 содержащей 10^9 КОЕ / мл.

Результаты

Как показали результаты ПЦР и CRISPR анализов из 30 выделенных изолятов, 6 изолятов были идентифицированы как *E. amylovora*, остальные были идентифицированы как *Pantoea agglomerans* и *Pantoea vagans* (Enterobacterales; Erwiniaceae); *Pseudomonas orientalis* и *Pseudomonas marginalis* (Pseudomonadales; Pseudomonadaceae) и *Rahnella* (Enterobacterales; Yersiniaceae).

Пять изолятов бактериального ожога были выделены из сорта груш Талгарка (*P. communis*), и 2 изолята из культурного сорта яблонь (*M. domestica*), выращиваемых в селах Джети- Огузского и Тюпского районов.

Дикие формы розоцветных кустарников, как шиповник, рябина, боярышник и смородина проявляли свою естественную сопротивляемость, так как этот патоген – неместный, вторгающийся из дру-

гих континентов мира. Совместная эволюция этих местных диких сортов с возбудителем бактериального ожога была невозможна, поскольку возбудитель был интродуцирован только в последние десять лет.

С другой стороны, наши результаты доказали угрозу возможной вспышки этого заболевания в диких лесах в ближайшее время, так как очаги этого заболевания были уже обнаружены в Тюпском районе, расположенном всего в нескольких километрах от естественных лесов с богатым биоразнообразием розоцветных кустарников и деревьев.

Спейсерная организация последовательности массивов CRISPR-2 оказалась уникальной к кыргызским изолятам. Кроме того, организация массива CRISPR-1 и CRISPR-2 и их нуклеотидные последовательности были наиболее тесно связаны с повторяющимися регионами, о которых сообщалось из штаммов *E. amylovora*, выделенных со всей Европы (Великобритания, Франция, Испания, Германия, Сербия-Черногория, Беларусь), а также с Ближнего Востока (Ливан, Израиль) и Новой Зеландии, тогда как более отдаленные родственники, генотипы и паттерны CRISPR-2 были практически исключены, широко встречающиеся в североамериканской и восточноазиатской *E. amylovora* (рис.2). Среди плодов сортов яблони, по предварительным данным, повышенной устойчивостью к бактериальному возбудителю обладают сорта Вкусная, Дискавери, Каравелла и Останкино. Сорта Айнур, Старкримсон, Айчурек, Боровинка, а также дикий сорт *Malus niedzwetzkiiana* были среднеустойчивыми, остальные сорта были восприимчивы к бактериальному возбудителю (рис.3).

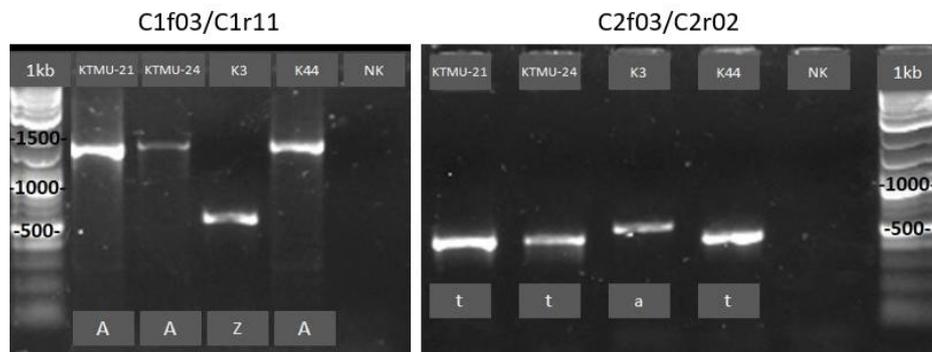


Рис.2. ПЦР-генотипирование CRR1 и CRR2 выбранных изолятов *E. amylovora* с использованием пар праймеров C1f03 / C1r11 и C2f03 / C2r02 соответственно. Предполагаемый размер ампликонов соответствовал ожидаемой длине фрагмента ПЦР между соответствующими праймерами, полученными с использованием секвенирования по Сэнгеру. Делеции спейсеров в соответствующих областях CRISPR приводят к соответственно более коротким ампликонам, которые можно легко отличить с помощью гель-электрофореза

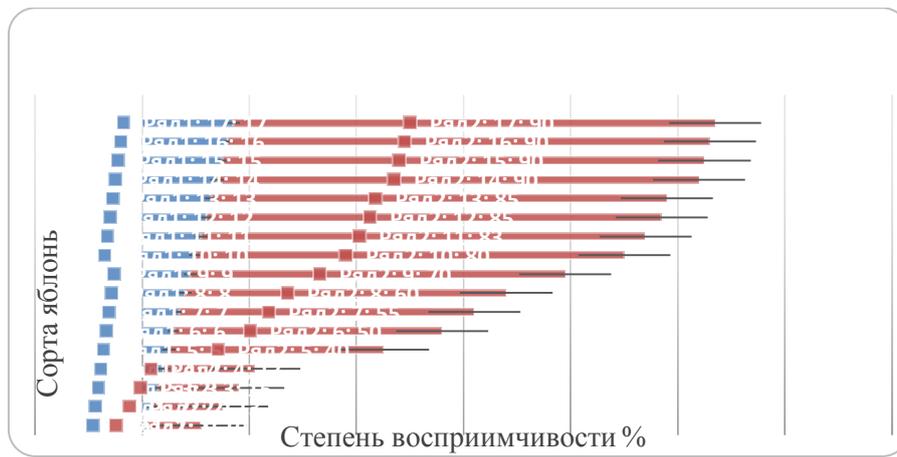


Рис. 3. Степень восприимчивости сортов яблони к бактериальному ожогу. 1- Вкусная; 2-Дискавери; 3- Каравелла; 4- Останкино и др.

Выводы. В целом, наши результаты говорят о том, что торговля посадочным растительным материалом с Европейского континента в Азиатские страны была основным путем прихода этой опасной болезни в Среднюю Азию. Наверное, не случайно, что первая волна болезни поразила как Казахстан, так и Кыргызстан сразу после реализации национальных планов по преобразованию больших площадей, предназначенных для выращивания семечковых фруктов от местных до международных сортов.

Текущая ситуация требует принятия решающих мер для защиты исчезающих видов от дальнейшего распространения инфекционных болезней. К ним относятся строгий мониторинг и ограничение потенциально опасной сельскохозяйственной деятельности в районе, прилегающем к участкам, где обитают эти виды.

Литература

1. First national forest inventory of the Kyrgyz Republic. Manual (2000).
2. Wilson, B., Mills, M., Kulikov, M., & Clubbe, C. The future of walnut–fruit forests in Kyrgyzstan and the status of the iconic Endangered apple *Malus niedzwetzkyana*. *Oryx*, - 2019. 53(3), 415-423. doi: 10.1017/S0030605318001230
3. Van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N., & Zeller, W. (2012). Fireblight: History, biology and management. St. Paul: APS Press.-2012.
4. Thompson S. Epidemiology of fire blight. In: Fire blight, the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora* (Ed. Vanneste, J). CAB International, Wallingford (GB).- 2000.
5. Doolotkeldieva T., Bobushova S., Schuster C., Konurbayeva M., Leclercq A. Isolation and genetic characterization of *Erwinia amylovora* bacteria from Kyrgyzstan. *Eur J Plant Pathol*.-2019. 155: 677-686.
6. Llop, P., Bonaterra A., Peñalver J., López M. M. (2000). Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic

plant material. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000.66, 2071– 2078.

7. Taylor, R. K., Guilford, P., Clark R. G., Hal C. N., Forster R. L. S. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers.
8. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. -2001. 29, 35–43.
9. Rezzonico F., Smits T. H., Duffy B. Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly inter spaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*. -2011. 77,3819–3829. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-11>.
10. Zhao, Y., Blumer, S.E., Sundin, G.W. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol*.-2005. 187: 8088-8103.