
БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 581.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ БАКТЕРИОЗАХ РАСТЕНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

ШАО ЧЭНЮЕ¹⁾, Ю. Н. ГОРОВИК¹⁾, С. Г. СИДОРОВА¹⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

В течение 2019–2020 гг. отобраны 75 образцов картофеля, моркови, репы, капусты, лука как в полевых условиях, так и в хранилищах. Бактерии рода *Pectobacterium* изолированы из 60 образцов. Также выделены штаммы *Vacillus pumilus*, *Vacillus* sp., *Pseudomonas* sp. Доминирующими видами, вызывающими мягкие гнили и черную ножку картофеля, были *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. atrosepticum* и *P. brasiliense*. Бактерия *P. carotovorum* изолирована и из других овощных культур. В образцах моркови и картофеля из хранилищ часто

Образец цитирования:

ШАО Чэнюе, Горовик ЮН, Сидорова СГ, Евтушенков АН. Идентификация пектолитических видов бактерий, выделенных при бактериозах растений в Республике Беларусь. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:64–72. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-64-72>

For citation:

Shao Chengyue, Gorovik YuN, Sidorova SG, Evtushenkov AN. Identification of pectolytic bacterial species isolated during plant bacteriosis in the Republic of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:64–72. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-64-72>

Авторы:

ШАО Чэнюе – аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. Н. Евтушенков.

Юрий Николаевич Горовик – старший преподаватель кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Светлана Георгиевна Сидорова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Анатолий Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Shao Chengyue, postgraduate student at the department of molecular biology, faculty of biology. 520095424@qq.com

Yuri N. Gorovik, senior lecturer at the department of molecular biology, faculty of biology. gorovikyn@gmail.com

Swetlana G. Sidorova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology. sidorova@bsu.by

Anatoli N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; head of the department of molecular biology, faculty of biology. evtushenkov@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0002-2755-6979>

выделялись штаммы бактерий рода *Bacillus*. Впервые в Беларуси на растениях картофеля обнаружена бактерия *P. brasiliense*. Полученные результаты по идентификации и распространению бактерий мягких гнилей в Беларуси помогут планировать риски, связанные с инфекциями, вызываемыми этими патогенами.

Ключевые слова: мягкие гнили; черная ножка картофеля; *Pectobacterium brasiliense*; *P. parmentieri*; *P. carotovorum*; *Bacillus pumilus*.

IDENTIFICATION OF PECTOLYTIC BACTERIAL SPECIES ISOLATED DURING PLANT BACTERIOSIS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

SHAO CHENGYUE^a, Yu. N. GOROVIK^a, S. G. SIDOROVA^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. N. Evtushenkov (evtushenkov@bsu.by)

During 2019–2020, we selected 75 samples of potatoes, carrots, turnips, cabbage, onions, both in the field and from storage. Bacteria of the genus *Pectobacterium* were isolated from 60 samples. Strains of *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were also isolated. The dominant species causing soft rot and black leg of potato were *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. atrosepticum* and *P. brasiliense*. Bacterium *P. carotovorum* was isolated from other vegetable crops. In samples of carrots and potatoes, strains of bacteria of the genus *Bacillus* were often isolated from storage. For the first time in Belarus, we found the bacterium *P. brasiliense* on potato plants. The results obtained on the identification and spread of soft rot bacteria in Belarus will help plan the risks associated with infections caused by these pathogens.

Keywords: soft rot; black leg of potato; *Pectobacterium brasiliense*; *P. parmentieri*; *P. carotovorum*; *Bacillus pumilus*.

Введение

Фитопатогенные виды пектолитических бактерий родов *Pectobacterium* и *Dickeya* (ранее известные как виды *Erwinia*) являются возбудителями широко распространенных бактериозов овощных культур и декоративных растений в различных климатических регионах. Бактериозы также поражают хранящуюся овощную продукцию, причиняя значительный экономический ущерб.

В догеномный период изучения пектолитических бактерий в качестве основных критериев выделения видов и подвидов использовали морфологические, физиолого-биохимические и фитопатологические характеристики. В 1945 г. Э. Л. Уолди предложил видовое название *Pectobacterium* для пектолитических видов *Erwinia* [1]. Но уже в 1968 г. Д. В. Дай на основании масштабного изучения биохимических признаков коллекционных штаммов *Erwinia* вернулся к родовому термину *Erwinia*, но внутри рода выделил четыре группы бактерий (роду *Pectobacterium* соответствует группа *carotovora*) [2]. И наконец, в геномную эру М. Адеолу и соавторы в 2016 г. выделили отдельное семейство Pectobacteriaceae (включает роды *Pectobacterium*, *Dickeya*) [3]. Наиболее распространенный патоген *Pectobacterium carotovorum*, являющийся возбудителем мягких гнилей, при более детальном генетическом изучении был отнесен к нескольким подвидам – *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, *P. carotovorum* ssp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* ssp. *wasabiae* и *P. carotovorum* ssp. *odorifera* [4]. Выделение новых видов пектобактерий в настоящее время производится по данным геномного анализа. Геномные исследования позволили выделить такие новые виды рода *Pectobacterium*, как *P. aquaticum* [5], *P. aroidearum* [6], *P. atrosepticum* [7], *P. betavasculorum* [7], *P. cacticida* [8], *P. fontis* [9], *P. parmentieri* [10], *P. polaris* [11], *P. polonicum* [12], *P. punjabense* [13], *P. zantedeschiae* [14], *P. parvum* [15].

Большинство пектобактерий способны поражать широкий круг овощных культур и распространены в различных климатических зонах на разных континентах. Но некоторые пектобактерии имеют определенную специфичность и поражают ограниченный круг растений: *P. betavasculorum* – сахарную свеклу, *P. wasabiae* и *P. odorifera* – японскую горчицу и салат соответственно, *P. atrosepticum* – картофель (чаще встречается в зонах умеренного климата).

Бактерии родов *Pectobacterium* и *Dickeya* входят в число 10 наиболее экономически значимых патогенов растений [16]. Видовой состав пектобактерий, поражающих овощные культуры, интенсивно изучается во всем мире. Особенно пристальное внимание уделяется микрофлоре важнейших овощных

культур – картофеля, салата, кукурузы, лука. Аналогичные исследования проводятся и в Беларуси [17–19]. Доминирующими возбудителями мягких гнилей овощей и черной ножки картофеля в республике являются бактерии семейства *Pectobacteriaceae*. В последнее время отмечается широкое распространение фитопатогенных пектолитических бактерий *Bacillus pumilus* [19; 20]. Интенсивный обмен растительным материалом приводит к быстрому распространению фитопатогенной микрофлоры, поэтому необходим постоянный мониторинг фитопатогенов для подбора эффективной стратегии контроля их численности. Цель данного исследования – изучение многообразия бактерий семейства *Pectobacteriaceae*, поражающих картофель и другие овощные культуры в нашем регионе, а также оценка распространения других пектолитических бактерий.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования выступали штаммы фитопатогенных пектолитических бактерий, выделенные из образцов растений, которые были собраны на территории Беларуси в 2019–2020 гг. и имели выраженные симптомы мягких гнилей и черной ножки (табл. 1). Стебли картофеля, пораженные черной ножкой (всего 20 образцов), отбирали на посадках картофеля в июле, а клубни картофеля, корнеплоды моркови и репы, кочаны капусты, луковицы лука с признаками мягкой гнили (27, 19, 2, 5 и 2 образца соответственно) отбирали в хранилищах в зимний период. Порядковый номер штамма соответствует отдельному образцу растений.

Таблица 1

Происхождение изученных в работе пектолитических штаммов

Table 1

The origin of the pectolytic strains studied in the work

Вид, штамм	Источник выделения	Место выделения
<i>P. carotovorum</i> 002-1, 002-2	Репка	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 003-9, 004-4, <i>P. atrosepticum</i> 004-3	Морковь	Частное хозяйство (Минская область)
<i>Bacillus</i> sp. 005-6, 005-7	Лук	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. atrosepticum</i> 009-3	Капуста	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 029-1, 029-2, 034-4, 035-2, 036-3, 036-4, <i>Pseudomonas</i> sp. 030-2	Картофель (клубни)	Частное хозяйство (Минская область)
<i>Bacillus</i> sp. 037-3, 037-4	Морковь	Частное хозяйство (Минская область)
<i>B. pumilus</i> 038-1, <i>Pseudomonas</i> sp. 038-2	Капуста	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 039-1, <i>Bacillus</i> sp. 039-2	Морковь	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. atrosepticum</i> 044-1, <i>Pseudomonas</i> sp. 044-2	Капуста	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 045-1, 045-2, 047-1, 047-2, 052-1, 052-2, <i>Bacillus</i> sp. 046-1, 046-2, 048-1, 048-2, <i>Pseudomonas</i> sp. 050-1, 050-2, <i>B. pumilus</i> 051-1, <i>P. parmentieri</i> 051-2	Картофель (клубни)	Частное хозяйство (аг. Самохваловичи)
<i>Bacillus</i> sp. 054-1, 054-2, 055-2, 056-1, <i>B. pumilus</i> 055-1, 058-1, 058-2, <i>P. carotovorum</i> 056-2, 064-1, 064-2, 065-1, 065-2	Морковь	Частное хозяйство (аг. Самохваловичи)
<i>P. atrosepticum</i> 084, 086, 086-1, 087-1, <i>P. carotovorum</i> 087, 088-1, 088-2, 090-1, 090-2, 094, 095-2, 096, 097-1, 099-2, 102-1, 102-2, <i>P. brasiliense</i> 098-1, 098-2, 101-2, <i>B. pumilus</i> 100	Картофель (клубни)	Фермерское хозяйство (Брестская область)
<i>P. parmentieri</i> 104-2, 105-1, 105-2, 106-1, 106-2, 107-2, 108-1, 108-2, 111-2, 113-1, 113-2, 119-1, 119-2, 121-2, 123-1, 123-2, <i>P. atrosepticum</i> 110-1, 118-2, <i>P. carotovorum</i> 114-1, 124, 125, <i>Pseudomonas</i> sp. 118-1	Картофель (стебли)	Фермерское хозяйство (Минская область, Воложинский район)
<i>P. brasiliense</i> 126, 127, 129, 130, <i>P. carotovorum</i> 128	Картофель (стебли)	Фермерское хозяйство (Брестская область)

Бактерии выделяли на картофельно-пектатном агаре. Для его приготовления в расплавленный картофельный агар добавляли стерильный раствор хлористого кальция до концентрации 0,025 моль/л и разливали в чашки Петри. После застывания агара сверху наслаивали 3 мл 2 % полипектата натрия. Образцы пораженных бактериозами растений растирали в стерильной воде и высевали суспензию на картофельно-пектатную среду в чашках Петри. На 2–3-е сутки культивирования отбирали колонии бактерий, погруженные в пектатный гель. Определение фенотипических свойств исследуемых штаммов (грампринадлежность с использованием раствора КОН, тесты на утилизацию глюкозы, образование целлюлазы, лецитиназы, рост при разных температурах, способность утилизировать различные углеводы в качестве единственного источника углерода и энергии) осуществляли согласно стандартным методам, описанным в работе [2]. Для идентификации бактерий вида *B. pumilus* проводили ПЦР с праймерами Bp-1f (5'-ТСАААТСААГТГГГСААС-3') и Bp-2r (5'-GAGGCATCCCАТАТАТТСГ-3') по изложенной в публикации [19] методике. Вид *P. atrosepticum* определяли в реакции с праймерами Y45 (5'-ТСАССГГАССГААСТГТГГCGT-3') и Y46 (5'-ТССААССГТТСAGCAGAАСАAGT-3') [20], вид *P. brasiliense* – в реакции с праймерами Br1f (5'-GCGTGCCGGGTTTATGACCT-3') и L1r (5'-САAGGCATCCACCGT-3') [21], вид *P. carotovorum* – в реакции с праймерами EXPCCR (5'-GCCGТААТТGCCTACCTGCTTAAAG-3') и EXPCCF (5'-GAACTTCGCACCCGCCGACCTTCTA-3') [21], а вид *P. parmentieri* – в реакции с праймерами Praf (5'-ТАТСГСТGGCTCAGGСААТТ-3') и Prar (5'-ТАСГСТGCGCATACTTGGAA-3') [22]. Для идентификации бактерий рода *Dickeya* применяли праймеры ADE1 (5'-GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT-3') и ADE2 (5'-СТGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCTGTC-3') [20]. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей АМ-буфер с MgCl₂, 0,2 ммоль/л дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,5 мкмоль/л праймера, 1 ед. Таq-полимеразы, 50 нг ДНК-матрицы, согласно оригинальным протоколам идентификации соответствующих бактерий. В работе использовали реактивы и праймеры компании *Праймтех* (Беларусь). В качестве контроля применяли ДНК коллекционных штаммов бактерий, в качестве маркеров молекулярного веса ДНК – GeneRuler 1 kb DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (*Fermentas*, Литва).

В исследовании использовали штаммы *P. atrosepticum* 21А, *P. carotovorum* 14А, *Dickeya* (*Erwinia chrysanthemi* ENA49) из коллекции БГУ и штамм *P. parmentieri* В-94 из коллекции Института микробиологии НАН Беларуси. Бактерии выращивали при температуре 28 °С на картофельном агаре или полноценной питательной среде (LB).

Результаты и их обсуждение

После высева образцов растений на картофельно-пектатную среду и инкубирования при 28 °С на 2–3-е сутки культивирования отбирали колонии бактерий, погруженные в пектатный гель (рис. 1). При выделении из мягких гнилей бактерий рода *Pectobacterium* обычно используют пектатную среду с кристаллическим фиолетовым (СVP), которая подавляет рост грамположительных бактерий. В настоящем исследовании применяли картофельный агар с полипектатом натрия, чтобы изолировать как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии и оценить роль последних в повреждении растений.



Рис. 1. Колонии пектолитических бактерий на пектатной среде
Fig. 1. Pectolytic bacteria on pectate media

Всего было отобрано 27 штаммов пектолитических бактерий из стеблей картофеля и 41 штамм из клубней картофеля, 19 штаммов из образцов моркови, 2 штамма из образцов репы, 5 штаммов из образцов капусты, 2 штамма из образцов лука. Чистые культуры бактерий анализировали стандартными

физиолого-биохимическими и морфологическим методами, как описано ранее в работе [2]: проводили О/Ф-тест, определяли окраску по Граму, наличие спор, рост при температуре 37 °С, пектолитическую, целлюлазную и лецитиназную активность, способность сбраживать сахара и утилизировать различные источники углерода. Грамположительные спорообразующие бактерии были отнесены к роду *Bacillus*. Всего выделено 19 штаммов данного рода, из них 6 штаммов по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами идентифицированы как *B. pumilus*. Большинство штаммов бацилл – 10 штаммов, включая 3 штамма *B. pumilus*, – были выделены из моркови. Из клубней картофеля изолированы 6 штаммов бацилл, в том числе 2 штамма *B. pumilus*, из лука – 2 штамма бацилл, из капусты – 1 штамм бацилл, идентифицированный как *B. pumilus*. Из стеблей картофеля, пораженных черной ножкой, не было выделено ни одного штамма бацилл. Таким образом, бактерии рода *Bacillus* являлись доминирующими возбудителями мягких гнилей хранящихся корнеплодов моркови, лука и в значительной степени поражали клубни картофеля (из 41 штамма пектолитических бактерий, выделенных из клубней картофеля, 6 штаммов отнесены к бациллам). Грамотрицательные бактерии с окислительным типом метаболизма, обладающие каталазной и оксидазной активностью, идентифицированы как бактерии рода *Pseudomonas*. Всего выделено 6 штаммов данного рода: 3 штамма изолированы из клубней картофеля, 1 штамм – из стебля картофеля, 2 штамма – из образцов капусты. Большинство выделенных пектолитических штаммов по изученным свойствам относились к новому семейству *Pectobacteriaceae* (табл. 2).

Таблица 2

Фенотипические свойства видов рода *Pectobacterium*

Table 2

Phenotypic characters species of the genus *Pectobacterium*

Проводимые тесты	Показанные результаты			
	<i>P. atrosepticum</i> (n = 9)	<i>P. carotovorum</i> (n = 38)	<i>P. brasiliense</i> (n = 7)	<i>P. parmentieri</i> (n = 17)
О/Ф-тест	F	F	F	F
Рост при температуре 37 °С	–	+ (12)	+ (5)	+ (3)
Образование: лецитиназы целлюлазы	– + (9)	– + (31)	– + (7)	– + (15)
Утилизация:				
α-метилглюкозида	+ (3)	+ (5)	–	+ (3)
лактозы	+ (9)	+ (38)	+ (7)	+ (16)
мальтозы	+ (3)	+ (8)	–	+ (3)
арабинозы	+ (9)	+ (38)	+ (7)	+ (17)
рафинозы	+ (9)	+ (38)	+ (7)	+ (17)
ксилозы	+ (9)	+ (38)	+ (7)	+ (17)
сорбита	–	+ (9)	–	+ (6)
дульцита	–	+ (1)	–	+ (3)
маннита	+ (9)	+ (38)	+ (7)	+ (17)
маннозы	+ (9)	+ (38)	+ (7)	+ (17)
рамнозы	+ (9)	+ (38)	+ (7)	+ (17)

Примечание. О/Ф-тест – окисление (О) либо ферментация (F) глюкозы; знак «плюс» или знак «минус» означают наличие или отсутствие признака, в скобках приведено число позитивных штаммов.

Семейство *Pectobacteriaceae* включает роды *Pectobacterium* и *Dickeya*. Для идентификации бактерий рода *Dickeya* использовали ПЦР с праймерами ADE1 и ADE2 [20]. Среди выделенных пектобактерий по результатам ПЦР не было обнаружено ни одного штамма бактерий рода *Dickeya*. Анализ биохимических свойств грамотрицательных пектолитических бактерий также не выявил штаммы с признаками, характерными для бактерий рода *Dickeya* (см. табл. 2). Данный патоген широко распространен на посадках картофеля в России [23], Польше и других странах Западной Европы [24]. Ранее сообщалось о выявлении бактерий рода *Dickeya* в Беларуси [18]. Тот факт, что авторы не обнаружили данный патоген в проанализированных образцах, можно объяснить ограниченным распространением бактерий рода *Dickeya* в республике. Для видовой идентификации пектобактерий использовали ПЦР с видоспецифическими праймерами к *P. brasiliense*, *P. atrosepticum*, *P. parmentieri* и *P. carotovorum* (рис. 2).

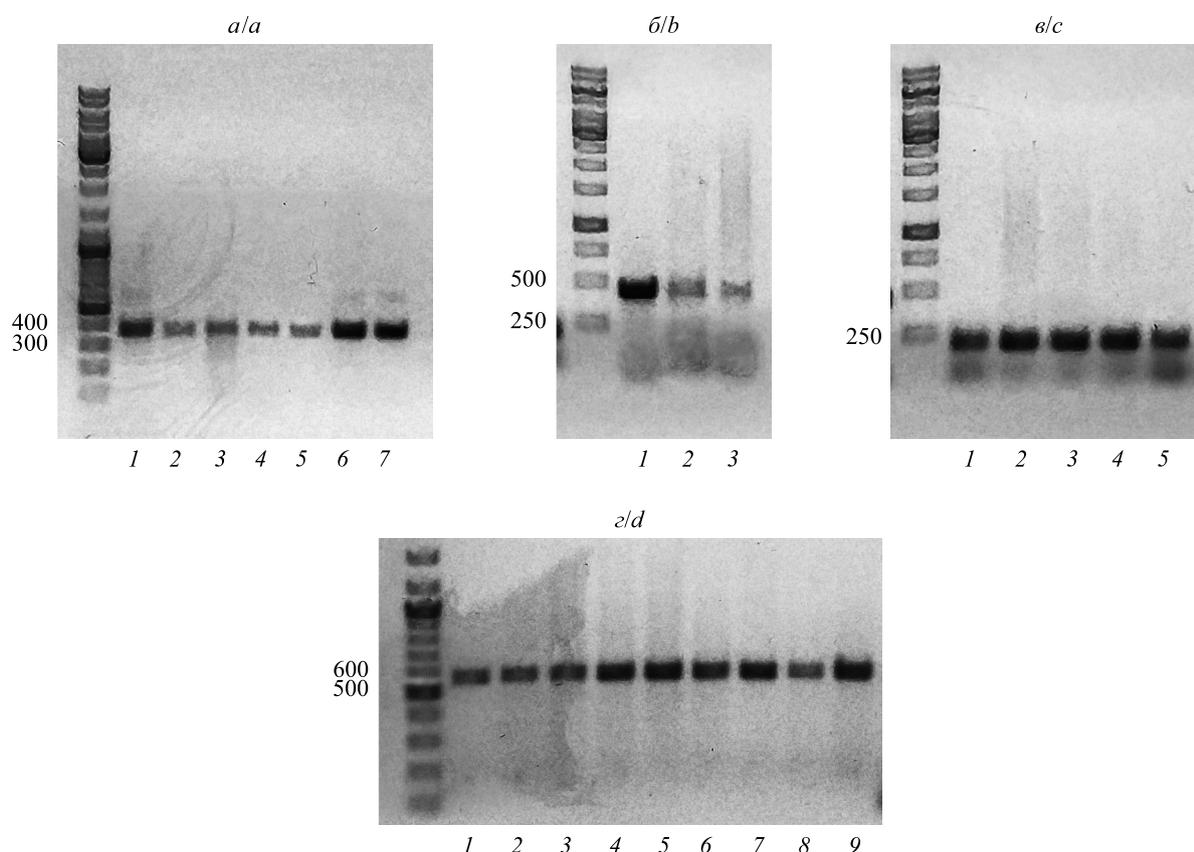


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации хромосомных ДНК пектобактерий с видоспецифическими праймерами:
a – Br1f и L1r (специфичны к виду *P. brasiliense*) (1 – штамм 098-1, 2 – штамм 098-2, 3 – штамм 101-2, 4 – штамм 126, 5 – штамм 127, 6 – штамм 129, 7 – штамм 130);
б – Y45 и Y46 (специфичны к виду *P. atrosepticum*) (1 – штамм 21A, 2 – штамм 084, 3 – штамм 118-2);
в – Praf и Ppar (специфичны к виду *P. parmentieri*) (1 – штамм B-94, 2 – штамм 111-2, 3 – штамм 119-2, 4 – штамм 121-2, 5 – штамм 123-1);
z – EXPCCR и EXPCCF (специфичны к виду *P. carotovorum*) (1 – штамм 14A, 2 – штамм 088-1, 3 – штамм 088-2, 4 – штамм 090-1, 5 – штамм 090-2, 6 – штамм 094, 7 – штамм 095-2, 8 – штамм 096, 9 – штамм 099-2)

Fig. 2. Electrophoregrams of products DNA amplification from *Pectobacterium* with species specific primers: *a* – Br1f and L1r (specific to *P. brasiliense*) (1 – strain 098-1, 2 – strain 098-2, 3 – strain 101-2, 4 – strain 126, 5 – strain 127, 6 – strain 129, 7 – strain 130);
b – Y45 and Y46 (specific to *P. atrosepticum*) (1 – strain 21A, 2 – strain 084, 3 – strain 118-2);
c – Praf and Ppar (specific to *P. parmentieri*) (1 – strain B-94, 2 – strain 111-2, 3 – strain 119-2, 4 – strain 121-2, 5 – strain 123-1);
d – EXPCCR and EXPCCF (specific to *P. carotovorum*) (1 – strain 14A, 2 – strain 088-1, 3 – strain 088-2, 4 – strain 090-1, 5 – strain 090-2, 6 – strain 094, 7 – strain 095-2, 8 – strain 096, 9 – strain 099-2)

Проведенная ПЦР с праймерами Br1f и L1r выявила характерный для *P. brasiliense* фрагмент размером 322 пары нуклеотидов (п. н.) у штаммов 098-1, 098-2, 101-2, 126, 127, 129, 130. Штаммы бактерий *P. brasiliense* впервые обнаружены в Беларуси и только в образцах картофеля из фермерского хозяйства в Брестской области. Сообщалось об идентификации данного вида бактерий в России [25]. С момента обнаружения *P. brasiliense* в 2004 г. в Бразилии патоген широко распространился по всему миру: он выявлен в Израиле, Канаде, США, Нидерландах, Швейцарии, ЮАР, Кении, Южной Корее, Китае [26]. Для идентификации *P. atrosepticum* использовали ПЦР с праймерами Y45 и Y46 [21]. Характерный ПЦР-фрагмент размером 439 п. н. обнаружен в ДНК штаммов 004-3, 009-3, 044-1, 084, 086, 086-1, 087-1, 110-1, 118-2 (см. рис. 2). Идентификация пектобактерий с праймерами Praf и Ppar позволила отнести к виду *P. parmentieri* штаммы 051-2, 104-2, 105-1, 105-2, 106-1, 106-2, 107-2, 108-1, 108-2, 111-2, 113-1, 113-2, 119-1, 119-2, 121-2, 123-1, 123-2. Бактерии *P. parmentieri* ранее не выделяли в Беларуси. Большинство штаммов *P. parmentieri* изолированы авторами из стеблей картофеля с симптомами черной ножки. Классическим возбудителем черной ножки картофеля считаются штаммы *P. atrosepticum*, но в настоящем исследовании из стеблей картофеля чаще выделяли бактерии *P. parmentieri*, *P. carotovorum*,

P. brasiliense. В Польше доминирующими видами на растениях картофеля также являлись *P. parmentieri*, *P. carotovorum* [24]. По результатам ПЦР с праймерами ЕХРСССР и ЕХРСССФ к *P. carotovorum* отнесены штаммы 002-1, 002-2, 003-9, 004-4, 029-1, 029-2, 034-4, 035-2, 036-3, 036-4, 039-1, 045-1, 045-2, 047-1, 047-2, 052-1, 052-2, 056-2, 064-1, 064-2, 065-1, 065-2, 087, 088-1, 088-2, 090-1, 090-2, 094, 095-2, 096, 097-1, 099-2, 102-1, 102-2, 114-1, 124, 125, 128. Большинство штаммов *P. carotovorum* выделены из гнилей клубней картофеля, корнеплодов моркови и репы, а также из стеблей картофеля, что свидетельствует об их широкой фитопатогенной специализации в отличие от других пектобактерий.

Изучение физиолого-биохимических свойств видов рода *Pectobacterium* не выявило критериев, подходящих для видовой идентификации (см. табл. 2). Неспособность к росту при температуре 37 °С характерна для *P. atrosepticum*, а рост при данной температуре может учитываться как признак *P. brasiliense*. Утилизация мальтозы и α -метилглюкозида в большей мере характерна для *P. atrosepticum*.

Заключение

Из 75 образцов растений, пораженных бактериозами, на пектатном агаре изолированы 96 штаммов пектолитических бактерий. Дифференциация выделенных пектолитических бактерий на основании морфологических и биохимических тестов выявила 19 штаммов рода *Bacillus*, 6 штаммов рода *Pseudomonas* и 71 штамм рода *Pectobacterium*. По результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами 6 штаммов бацилл отнесены к виду *B. pumilus*. Среди бактерий рода *Pectobacterium* по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами идентифицированы 4 вида – *P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliense* и *P. parmentieri*. Большинство выделенных пектобактерий относятся к виду *P. carotovorum*. Они были изолированы из мягких гнилей клубней картофеля, моркови, репы и стеблей картофеля. Бактерии *P. atrosepticum* обнаружены в образцах капусты, моркови, клубнях и стеблях картофеля. Значительная часть штаммов *P. brasiliense* и *P. parmentieri* выделены из стеблей картофеля, пораженных черной ножкой. Таким образом, наблюдается замена *P. atrosepticum* как основного возбудителя черной ножки новыми патогенами – *P. brasiliense* и *P. parmentieri*. Фитопатогенные бактерии *P. brasiliense* и *P. parmentieri* впервые выделены в Беларуси как возбудители черной ножки картофеля и мягких гнилей клубней картофеля.

Из образцов моркови и клубней картофеля, пораженных мягкими гнилями, выделено значительное количество штаммов пектолитических бактерий рода *Bacillus*, что свидетельствует об их большой роли в повреждении хранящейся продукции наряду с видами рода *Pectobacterium*.

Библиографические ссылки

1. Waldee EL. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State College Journal of Science*. 1945; 19(4):435–484.
2. Dye DW. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science*. 1968;11(4): 590–607.
3. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the Enterobacteriales: proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
4. Portier P, Pédrón J, Taghouti G, Fischer-Le Saux M, Caullireau E, Bertrand C, et al. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(10):3207–3216. DOI: 10.1099/ijsem.0.003611.
5. Pédrón J, Bertrand C, Taghouti G, Portier P, Barny M-A. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(3):745–751. DOI: 10.1099/ijsem.0.003229.
6. Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63(7):2520–2525. DOI: 10.1099/ijsem.0.046011-0.
7. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(2):381–391. DOI: 10.1099/ijsem.0.02423-0.
8. Alcorn SM, Orum TV, Steigerwalt AG, Foster JLM, Fogleman JC, Brenner DJ. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacti-cida* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991;41(2):197–212. DOI: 10.1099/00207713-41-2-197.
9. Oulghazi S, Cigna J, Lau YY, Moumni M, Chan KG, Faure D. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(2):470–475. DOI: 10.1099/ijsem.0.003180.
10. Khayi S, Cigna J, Chong TM, Quéto-Laurent A, Chan KG, Hélias V, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016; 66(12):5379–5383. DOI: 10.1099/ijsem.0.001524.

11. Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017;67(12):5222–5229. DOI: 10.1099/ijsem.0.002448.
12. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Jonca J, Furmaniak M, Waleron K. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(6):1751–1759. DOI: 10.1099/ijsem.0.003387.
13. Sarfraz S, Riaz K, Oulghazi S, Cigna J, Sahi ST, Khan SH, et al. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(11):3551–3556. DOI: 10.1099/ijsem.0.003029.
14. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Franczuk M, Jońca J, Wielgomas B, et al. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Systematic and Applied Microbiology*. 2019;42(3):275–283. DOI: 10.1016/j.syapm.2018.08.004.
15. Pasanen M, Waleron M, Schott T, Cleenwerck I, Misztak A, Waleron K, et al. *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like type III secretion system and low virulence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(4):2440–2448. DOI: 10.1099/ijsem.0.004057.
16. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(6):614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
17. Евтушенков АН, Фомичев ЮК. Пектатлиазная активность бактерий рода *Erwinia*. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 1978;2:25–28.
18. Комар ЕИ, Шавель МИ, Песнякевич АГ. Идентификация грамотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий, вызывающих заболевания картофеля в Беларуси. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2014;2:54–60.
19. Горюков ЮН, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. ПЦР-диагностика бактерий *Vacillus rutilis*. *Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2014;9(часть 1):162–166.
20. Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, et al. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(7):2228–2235. DOI: 10.1128/aem.62.7.2228-2235.1996.
21. Duarte V, De Boer SH, Ward LJ, de Oliveira AMR. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96(3):535–545. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x.
22. Lukianova AA, Evseev PV, Stakheev AA, Kotova IB, Zavriev SK, Ignatov AN, et al. Quantitative real-time PCR assay for the detection of *Pectobacterium parmentieri*, a causal agent of potato soft rot. *Plants*. 2021;10(9):1880. DOI: 10.3390/plants10091880.
23. Ignatov AN, Khodykina MV, Dzhaliilov FS, Karlov AN, Karandashov VE, Shirshikov FV, et al. Emergence and spreading of *Dickeya solani* & *D. dianthicola* on potato in Russia, and search for control measures. In: *The 14th International symposium on biocontrol and biotechnology; 2016 November 6–9; Saint-Petersburg – Pushkin, Russia*. [S. l.]: [s. n.]; 2016. p. 31.
24. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;159(2):309–325. DOI: 10.1007/s10658-020-02163-x.
25. Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroschnikov KA, et al. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(2):364. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN.
26. Li Lei, Yuan Lifang, Shi Yanxia, Xie Xuewen, Chai Ali, Wang Qi, et al. Comparative genomic analysis of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* SX309 provides novel insights into its genetic and phenotypic features. *BMC Genomics*. 2019;20:486. DOI: 10.1186/s12864-019-5831-x.

References

1. Waldee EL. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State College Journal of Science*. 1945;19(4):435–484.
2. Dye DW. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science*. 1968;11(4):590–607.
3. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the Enterobacteriales: proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
4. Portier P, Pédrón J, Taghouti G, Fischer-Le Saux M, Caullireau E, Bertrand C, et al. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(10):3207–3216. DOI: 10.1099/ijsem.0.003611.
5. Pédrón J, Bertrand C, Taghouti G, Portier P, Barny M-A. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(3):745–751. DOI: 10.1099/ijsem.0.003229.
6. Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63(7):2520–2525. DOI: 10.1099/ijsem.0.046011-0.
7. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(2):381–391. DOI: 10.1099/ijsem.0.02423-0.
8. Alcorn SM, Orum TV, Steigerwalt AG, Foster JLM, Fogleman JC, Brenner DJ. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacti-cida* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991;41(2):197–212. DOI: 10.1099/00207713-41-2-197.

9. Oulghazi S, Cigna J, Lau YY, Moumni M, Chan KG, Faure D. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(2):470–475. DOI: 10.1099/ijsem.0.003180.
10. Khayi S, Cigna J, Chong TM, Quêtu-Laurent A, Chan KG, Hélias V, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5379–5383. DOI: 10.1099/ijsem.0.001524.
11. Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017;67(12):5222–5229. DOI: 10.1099/ijsem.0.002448.
12. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Jonca J, Furmaniak M, Waleron K. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(6):1751–1759. DOI: 10.1099/ijsem.0.003387.
13. Sarfraz S, Riaz K, Oulghazi S, Cigna J, Sahi ST, Khan SH, et al. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(11):3551–3556. DOI: 10.1099/ijsem.0.003029.
14. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Franczuk M, Jońca J, Wielgomas B, et al. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Systematic and Applied Microbiology*. 2019;42(3):275–283. DOI: 10.1016/j.syapm.2018.08.004.
15. Pasanen M, Waleron M, Schott T, Cleenwerck I, Misztak A, Waleron K, et al. *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like type III secretion system and low virulence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(4):2440–2448. DOI: 10.1099/ijsem.0.004057.
16. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(6):614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
17. Evtushenkov AN, Fomichev YuK. [Pectatylase activity of the bacteria of the genus *Erwinia*]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 1978;2:25–28. Russian.
18. Komar EI, Shavel' MI, Pesnyakevich AG. [Identification of the gramnegative pectolytic phytopathogenic bacteria provoking potato diseases in Belarus]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2014;2:54–60. Russian.
19. Gorovik YuN, Lagonenko AL, Evtushenkov AN. [PCR detection of the bacteria *Bacillus pumilus*]. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funkcionirovaniya biosistem*. 2014;9(part 1):162–166. Russian.
20. Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, et al. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(7):2228–2235. DOI: 10.1128/aem.62.7.2228-2235.1996.
21. Duarte V, De Boer SH, Ward LJ, de Oliveira AMR. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96(3):535–545. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x.
22. Lukianova AA, Evseev PV, Stakheev AA, Kotova IB, Zavriev SK, Ignatov AN, et al. Quantitative real-time PCR assay for the detection of *Pectobacterium parmentieri*, a causal agent of potato soft rot. *Plants*. 2021;10(9):1880. DOI: 10.3390/plants10091880.
23. Ignatov AN, Khodykina MV, Dzhililov FS, Karlov AN, Karandashov VE, Shirshikov FV, et al. Emergence and spreading of *Dickeya solani* & *D. dianthicola* on potato in Russia, and search for control measures. In: *The 14th International symposium on biocontrol and biotechnology: 2016 November 6–9; Saint-Petersburg – Pushkin, Russia*. [S. l.]: [s. n.]; 2016. p. 31.
24. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;159(2):309–325. DOI: 10.1007/s10658-020-02163-x.
25. Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroshnikov KA, et al. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(2):364. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN.
26. Li Lei, Yuan Lifang, Shi Yanxia, Xie Xuewen, Chai Ali, Wang Qi, et al. Comparative genomic analysis of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* SX309 provides novel insights into its genetic and phenotypic features. *BMC Genomics*. 2019;20:486. DOI: 10.1186/s12864-019-5831-x.

Получена 20.01.2022 / исправлена 10.06.2022 / принята 01.07.2022.
Received 20.01.2022 / revised 10.06.2022 / accepted 01.07.2022.