

А.К. Баубекова^{1*}, С.А. Абиев¹, Р.З. Асилханова²¹Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан;²Астана медицина университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

*Хат-хабарға арналған автор: aizhan_22.02@inbox.ru

Бактериялық обырдың таза штамын алып ағаш тектестерге инфекциялық белсенділігін *in vitro* жағдайында зерттеу

Топырақты құнарландыратын, көп мөлшерде оттегі бөліп шығаратын қалың және әртүрлі ну ормандардың болуы мемлекетке пайдалы. ҚР Тұңғыш Президенті Н. Назарбаев Нұр-Сұлтан қаласын және маңайындағы аймақтарды абаттандыру жөнінде бастама көтерген болатын. «Жасыл белдеу» жобасының мақсаты – қалада және маңайындағы аудандарда жасыл желекті қалыптастыру және оны сақтау. Жасыл белдеуді дамыту бағыты бойынша көптеген жұмыстар жүргізілді. Нұр-Сұлтан қаласын жасыл белдеуге айналдыру үшін қала айналасына түгелдей орман ағаштары егілген. Оның ауданы — 100 мың гектарды қамтиды. Жасыл белдеуде дұрыс егілген ағаштектес өсімдіктер ауаны оттегімен байытудан, декоративті безендірілген пейзаждардан басқа, аймақтарды желдетуге, ластанған ауаны тұрғын үй мен өндірістік аймақтардан бұруға, тік ауа тоғының пайда болуына және ластанған ауаның атмосфераның неғұрлым жоғары қабаттарында шашырауына, сондай-ақ ауаны әр түрлі аэрозольдерден, шаңнан, күйе мен ыстардан тазартуға жәрдемдесуге тиіс. Осы жасыл желектердің өзі ерекше күтімді қажет етеді. Алайда, бұл табиғи байлықтың барлығына кеңінен таралған, бірақ аз зерттелген ауру — ағаш тұқымдарының бактериялық обырының таралуы үлкен қатер тудыруда. Қазіргі таңда мұндай ауру Башқұртстан, Балтық елдері, Татарстан, Адыгей Республикаларында және Ресейдің еуропалық бөлігінде, сонымен қатар Брянск және оған іргелес аймақтарда байқалуда. Аталған елдерде ағаш тұқымдарының осы ауруға ұшырауы ұлғайып келеді, бұл ағаш діндерінің кебуіне нақты қауіп тудыруда. Қазақстанда да ағаш тұқымдарының бактериялық обыры кездеседі. Осыған байланысты, бұл ауруды зерттеу өте өзекті, өйткені ағаштардың зақымдалу ерекшелігі, аурудың диагностикасы, орманды өсіру-тақсациялық және ландшафттық жағдайларға байланысты оның таралуы толықтай зерттелмеген. Мақаланың мақсаты — Нұр-Сұлтан қаласын қоршай отырызылған Жасыл белдеу орман шаруашылықтарында өсетін, бактериялық обыр (водянка) белгілері бар сүйелді қайыңның (*Betula pendula* Roth.) діңінен өзек үлгілерін алып, олардан бөлініп алынған бактерия өсімдіктерін қоректік орталарда өсіріп, ауру қоздырғышының таза штамдарын алып, рибосомдық РНҚ 16S нуклеотидтік тізбегінің молекулалық идентификациясын жасау. Сонымен қатар, алынған бактерия штамдарының молекулалық сипаттамаларын Халықаралық Gene Bank базасындағы типтік *Dickeya dadantii* түріне сәйкес келуін анықтау. Зерттеу барысында осы бактерия штамының басқа да ағаш тектестерге инфекциялық белсенділігі *in vitro* жағдайында зерттелді. Бактериялық обырға ұшырамаған қайың ағаштарының жапырақтары мен сырғаларын *in vitro* жағдайында өзіміз бөліп алған *Dickeya dadantii* штамдарымен инокуляциялау патогеннің тәжірибеге алынған қайың популяциясына толықтай вируленттігін, яғни инфекциялық белсенділігі көрсетілген.

Кілт сөздер: бактерия, бактериоз, бактериялық обыр, жара ошағы, өзек үлгісі, штамм, ДНҚ.

Кіріспе

Бактериялық обыр — орман отырғызылымдарының арасында кең тараған жүйелі бактериоз. Бұл фитоауру өсімдіктің тек бір ғана бөлігін зақымдамайды, ол өсімдіктің онтогенез барысында дамитын бүкіл организмнің ауруы, бактериялық обыр барлық өсімдік ұлпаларын, яғни флоэма, ксилема, камбий, ағаштың діңін, бұтасын, тамырын, өсімдіктің генеративті мүшелерін толықтай зақымдайды [1]. Саңырауқұлақтар инфекциясы ағаш өзегінің жасуша қабырғасын толық жойып немесе жартылай зақымдайды, бактериямен зақымдалған ағаш өзегінің жасуша қабырғасы өзгеріссіз қалпында сақталады. Алайда клетка аралық байланыс үзіліп, клеткалар бір-бірінен ажырайды, себебі бактериялық обыр патогены жасушадан тыс фермент бөледі, ол орталық пластинаның деградациялануына әкеледі. Орталық пластинаның зақымдалуы өсімдік ұлпасының мацерациялануына, қатпарлануына әкеледі, ағаш дымқыл жұмсақтанып микроорганизмдер үшін қолайлы ортаға айналады, микроорганизмдер клетка қабырғасындағы лигнин мен целлюлозаны ыдыратып, зақымдау үдерісін аяқтайды [2].

Аурудың сыртқы белілеріне келетін болсақ, ағаш діңінде және бұталарында болатын шырышты сұйықтық аққан некротикалық дымқыл жаралар мен ажырақтар. Сұйықтық газдалып,

көпіршіктенген, ашыған қышқыл иісті болады. Ауруға шалдыққан ағаштардың жапырақтары мен инелері түстері қоңырқай түске өзгереді. Бактериялық күйік аурумен салыстырғанда, бактериялық обырмен ағаштардың төменгі бөлігі басым зақымданады.

Бактериялық обырдың ішкі симптомдарына келетін болсақ, діндегі дымқыл домалақ, жұлдызша тәрізді патологиялық ядро, бұталарды, тамырды да зақымдап, қатты күшпен жиналған газ арқылы діндегі жаралар мен ажырақтар арқылы сыртқа шығады. Қатты зақымданған ұлпаларда некротикалық мацерацияланған жұмсақ шырышты шірік қалыптасады [1]. Ағаштарда бактериялық обырдың белгілері көктемнің алғашқы айларында көріне бастайды, бұл мезгілде ағаш діңінен экссудатқа толы ісіктерді байқауымызға болады. Бактериоздардың қарқынды қозып даму уақыты көктем және күз айлары деп берілген, себебі осы мезгілдерде ағаш діңіндегі крахмал мен қант концентрациясы басым болады [3].

Бактериялық обыр және оның қоздырғышы *E. multivora*-ны алғаш рет КСРО-да қылқан жапырақты және жапырақты тұқымдарда Щербин-Парфененко 1963 жылы сипаттаған [4]. Шет елдерде ең алғаш болып Carter, 1945 қараағаш тұқымдарының бактериялық обыры мен оның қоздырғышына (*E. nimipressuralis*) сипаттама берді [5]. Украина орманында жалпақ жапырақтылардың, Орта Сібірде қылқан жапырақтылардың бактериялық обырын зерттеу барысында *E. nimipressuralis* оның патогені ретінде анықталды. Ылғалды ағаш (мокрая древесина) атты аурудың белгілеріне діндегі жарықтар, газ түзілуі және шырыштың ағып кетуі байқалды. Тіндердің ыдырауы және мацерациясы, қабығы мен тамырларының, тұқымдарының зақымдануы байқалмайды. Аталған ауру симптомдары бактериялық обырдың белгілерімен сай келмеуі, фитопатологтар арасында аурудың қоздырғыштары туралы біршама сұрақ туындатты.

Бактериялардың қасиеттерін салыстыра отырып, *E. multivora* бактериялық обыр патогенезінің барлық бес белгілерін тудыратынын (көмірсулардың ашуы, газ түзілуі, пектолитикалық ферменттер өндірісі), ал *E. nimipressuralis* — тек алғашқы екеуі (көмірсулардың ашығуы және газдың пайда болуы) тудыратыны дәлелденді. Пектиназа, протопектиназа және пектат лиазы ферменттерінің фитопатогенді бактериялардың синтездеуі кальций пектаттарынан тұратын ортаңғы тақтаның сұйылуына, жасушааралық қалқандардың бұзылуына әкеледі. Паренхиманың жасушаларын жабыстыратын пектиндік заттар шырышқа айналады, тіндердің мацерациясы пайда болады (тұқымдардың, жемістердің жұмсақ шіруі), жасуша паренхимасының талшықтарға ыдырауы (ағаш пен бастың сінуі), жасуша құрамының экссудаттармен, шырышпен және сұйықтық тамшыларымен бөлінуі. Бұл егу және биохимиялық сынақтармен бірнеше рет расталған *E. multivora* бактериясына тән қасиеттер. *E. nimipressuralis* пектолитикалық ферменттер түзбейді және тіндердің мацерациясын тудырмайды. Қоздырғыш ретіндегі түрлер ешқашан тамырлардан, топырақтан, көшеттерден, жемістерден, тұқымдардан, гүлдерден табылмаған. Шет елдер әдебиеттерінде *E. nimipressuralis* бактериясы жеке түрлер қатарында ұсынылған жоқ, оны атипикалық (*Erwinia* тектес үшін) «патогендік қасиеттері күмәнді түр» деп атады [6]. Түрдің идентификациясына, олардың патогендік қасиеттерін ескермей бактериялық обыр мен ылғалды ағаш ауруларының қоздырғыштары *E. nimipressuralis* деп көрсетілді, алайда түрлердің штамдары халықаралық генетикалық банктерде — ATCC 9912, ICMP 1577, LMG 10245 және NCPPB 2045 коллекцияларында ұсынылып, ДНҚ-ДНҚ мен ДНҚ-рРНҚ будандастыру (гибридизациялау), 16S rRNA, MLSA және т.б. молекулалық-генетикалық әдістерін қолдану түрдің қайта жіктелуіне әкелді, нәтиже бойынша *Erwinia nimipressuralis* — *Enterobacter nimipressuralis* түріне жатқызды. *Enterobacter* түрінің пектолитикалық ферменттер өндірмеуіне байланысты, *E. nimipressuralis* — *Enterobacter nimipressuralis* түріне жатқызылуы бактериялық обыр этиологиясында ешқандай өзгеріс туындатпады. *E. nimipressuralis* патогенділігі басқа зерттеушілермен де расталмаған. Түр фенотиптік жағынан Ent. cloacae-ға жақын келеді [7]. Екі түрдің генетикалық қатынас деңгейі жоғары болды (от 52 до 67 % по ДНҚ-гибридизация), нәтижесінде *E. nimipressuralis* «*E. cloacae* complex» топтастырылды. Бұл түрлерді *Ent. cloacae* синонимі деп санауға негіз болды [8]. Тағы да бір фитопатологтардың қайта жіктеуінің нәтижесінде *E. nimipressuralis* *Enterobacter*-дан алынып, [5] *Lelliottia nimipressuralis* атауын халықаралық каталогтардан алды (JCM; LPSN және т.б.) [9]. Қазіргі таңда *Lelliottia nimipressuralis* бактериялық обыр мен ылғалды ағаш ауруларының қоздырғышы ретінде қарастырылмайды, зерттеулер барысында *L. nimipressuralis* шіріту патологиясына қатысы жоқ, сапрофитті фитоэндофит екендігі дәлелденді. КСРО кезінде жеміс ағаштарының бактериялық обырының қоздырғышы *E. carotovora* деп сипатталды [10], ал А.Ф. Гойчук емен діңінен *E. nimipressuralis* бөліп алды. *E. carotovora* алдыңғы зерттеулер барысында да бактериялық обырға қатысы бар екендігі қарастырылған, кейіннен

E. nimipressuralis мен *E. carotovora* бір түрге жатқызылды [11]. 1963 жылы А.Л. Щербин-Парфененко 22 түрге жататын қылқан жапырақтылардан бактериялық обырды анықтап, қоздырғыштарына грамтеріс, спора түзбейтін *Erwinia multivora* деп сипаттама берді. Өткен ғасырдың 70-ші жылдары жүргізілген зерттеулер Оңтүстік Батыс-Сібір және Солтүстік Қазақстан ормандарындағы қайың ағаштарында бактериялық обырдың қарқынды тарала бастағанын көрсетті [4]. Қазақстанда бұл аурудың таралу аймақтарына Қостанай, Солтүстік Қазақстан, Павлодар облыстары кіреді. Соңғы кездері жарияланған мәліметтерде Қазақстан жерінде қайың ағаштарындағы обыр қоздырғыштары жайлы алғашқы әдеби мәліметтерде келтірілген грамтеріс факультативті аэробты бактерия *Erwinia multivora* емес, басқа *Pseudomonas sp.*, *Enterobacteriaceae sp.*, *Pectobacterium caratovororum* және *Dickeya dadantii* сынды бактериялар анықталғандығы келтірілген [12].

Erwinia туысы *Enterobacterales* қатарына жататын фитопатогенді бактериялар тобы. Көлемі 1–3×0,5 мкм грамтеріс таяқша тәрізді, факультативті анаэробтар. Бұл туысты Winslow et al. [13] 1917 жылы анықтап, оған америкалық патологанагом Erwin F. Smith есімін берді. 1945 жылы Waldee [6] *Erwinia* туысын *Pectobacterium* деп ауыстыруды ұсынды. 1968 жылы Dye [14] биохимиялық сипаттамаларын негізге ала отырып, *Erwinia* туысын төрт түрге бөлді: *Erwinia amulavora* — алма ағашының және басқа да раушан тұқымдастарының — *Rosaceae (Spiraeoideae)* патогені, жеміс өсімділерінің бактериялық күйік ауруының қоздырғыштары; *Erwinia carotovora* — әртүрлі туыс өкілдерінің, оның ішінде картоптың, жерүсті бөліктерін, сондай-ақ жерасты бөліктерін де, оның ішінде түйнектерін зақымдап, ұлпаларының қараюы мен шіруін, жапырақтардың ширатылуы мен сарғаюын туындатады; *Erwinia herbicola* астық тұқымдастарының бактериозының қоздырғышы. Соңғы төртінші топқа түрлік атау берілмей оны «ерекше *Erwinia*» тобы деп топтастырды. Келесі жылы (1969) сол Dye [15] *Erwinia* туысын беске бөлді: *E. amylovora* (var. *amylovora*, var. *salicis*, var. *traceiphila*, var. *quercina*, var. *nigrifluens*, var. *rubrifaciens*); *E. herbicola* (var. *herbicola*, var. *ananas*); *E. uredoovororum*; *E. stewartii* және *E. carotovora* (var. *carotovora*, var. *atroseptica*, var. *rhapontici*, var. *chrysanthemi*, var. *cyripedii*). Осы жылы Dye-ның ұсынысы бойынша Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8-ші басылымында *Erwinia carotovora* түрі келесідей түрлер мен түр тармақтарына жіктелді: *Erwinia cyripedii*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* var. *carotovora* және *Erwinia chrysanthemi* [16].

Аталған түр тармақтарының ішінде *E. chrysanthemi* ең патогенді бактериялардың бірі болып танылды. Кейінгі зерттеулер барысында оның 16 қосжарнақты және 10 даражарнақты өсімдік тұқымдастарында бактериоз ауруын қоздыратыны анықталған [17]. Сондай-ақ оның көптеген тропиктік және субтропиктік аймақтардың өсімдіктерін зақымдайтыны белгілі. Өсімдіктің тамырын, түйнектерін, шырынды етжеңді мүшелерін бұзатын жұмсақ шірік ауруын қоздырады, тамыр ксилемасын отарлап, өсімдікті жүйелі түрде зақымдайды.

Dye [18] 1978 жылы *E. chrysanthemi*-дің патологиялық және биохимиялық қасиеттерін негізге ала отырып, оны бірнеше патоварианттарға жіктеді (pv. *zeae*, pv. *dieffenbachiae*, pv. *parthenii* және pv. *dianthicola*). 1980 жылы Dickey және Victoria банан өсімдігінен анықталған жаңа патовариант pv. *paradisiaca*-ны *E. chrysanthemi*-мен біріктірді. 1998 жылы 16S рДНК нуклеотидтік тізбегін негізге ала отырып, Hauben et al. [19] *E. chrysanthemi*-ді жаңа атау алған *Pectobacterium* туысына кіргізіп *P. chrysanthemi* деп атауды ұсынды. Кейіннен *E. chrysanthemi* pv. *paradisiaca*-ны *Brenneria paradisiaca* деп атап жаңа таксондық статус берді және түр деңгейіне көтерді [19]. 2005 жылы фенотиптік тест, днк-днк гибридизация, серология және 16S рДНК нуклеотидтік тізбегін талдау көмегімен Samson et al. *E. chrysanthemi*-ді *Erwinia* туысынан бөліп алып, оған белгілі микробиолог R.S. Dickey есімін беріп, жаңа статусқа *Dickeya* туысына көтерді [17]. Сонан соң, осы туысқа *Pectobacterium chrysanthemi* мен *Brenneria paradisiaca*-ны кіргізді. Сонымен, ол *Dickeya* туысына 6 түрді жатқызуды ұсынды: *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca* және *D. zeae*.

Зерттеу әдістері мен нәтижелері

Зерттеу материалдары маршруттық бақылау барысында Нұр-Сұлтан қаласын қоршай отырғызылған жасанды Жасыл белдеу орман шаруашылықтарынан алынды. Жасыл белдеу шаруашылықтарында қайың ағаштары көптеп отырғызылған және олардың жас шамалары әрқалай (15–30 жыл). Осы орман шаруашылықтар аумағында ертеректе, XX ғасырдың 70-ші жылдары отырғызылған және олармен аралас өскен табиғи қайыңды шоқ ормандар да кездеседі. Жасанды жасыл белдеудегі екпе отырғызылымдардағы көптеген ауру түрлері, оның ішінде бактериялық обыр да, осы ескі шоқ ормандардан таралуы әбден ықтимал.

Зерттеу жұмыстары Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің биология және геномика кафедрасына қарасты зертханада және Ұлттық биотехнология орталығы базасында жүргізілді.

Аурудың белгісі бар, морфологиялық өзгеріске ұшыраған қайың ағаштарының діңінен арнайы бұрғы Haglof құралы (ұз. 100–500 мм, дм 4,3 мм) арқылы көлденең бағытта өзек үлгілері алынды (1-сурет). Алынған өзек үлгілері (3×12 см) сыртынан 90 %-дық этил спиртімен сүртіліп, стерильді шыны түтікке салынып, пайдаланғанға дейін тоңазытқышта 3–4 °С-та сақталды. Өзек үлгілерінен ауруға шалдыққан ағаш діңінің қабығынан (тоз, перидерма) бастап камбийдің, сүректің, ондағы трахеялық элементтердің (флоэма, ксилема), сүректік талшықтар (либриформа) мен паренхиманың және өзектің зақымдалатынын көруге болады. Бұл аурудың түтікті-паренхималы індет екенін дәлелдейді. Өзек үлгілерінен ауру қоздырғыштарды бөліп алып, олардың таза штамдарын алу үшін әртүрлі жасанды қоректік орталар пайдаланылды (стандартты агар, каропты агар, ет-пептонды агар, эндо). Стерильді жағдайда, ламинарлық бокс камерасында өзектердің ұзына бойының әр жерінің ішкі тұсынан көлемдері 0,8–1 мм болатындай бөлшектері кесіп алынып, Петри табақшаларындағы қоректік орталарға отырғызылды. Осылай инокуляцияланған қоректік орталар термостатта 26,5 °С-та инкубацияланды. Қоректік ортадағы бактерия колонияларын басқа микроорганизмдерден тазарту үшін қайта себу әдісі, өрмек тәрізді егу әдісі қолданылды (сурет 1).



Сурет 1. А — көлденең бағытта алынған керн; Б — қоректік ортадағы бактерия

Алынған бактериялар штамына Ұлттық биотехнология орталығы базасында ДНҚ бөлу, 16SrRNA гені фрагментінің амплификациясы сияқты жұмыстар ретімен атқарылды.

Гендік типтеу мақсатында бактерия өсінділерінен ДНҚ-ны бөліп алу үшін алдымен шыны түтіктегі өсінділерді пластикалық түтікке ауыстырып, өсінділердің 1 мл мөлшері пайдаланылды. Бұл үдеріс Kate Wilson [5] әдісімен іске асырылды. Алынған үлгі центрифугаға 10 минутқа 12000 мин/айналымға қойылды. Тұнбаға 500 мкл ТЕ буферін араластырып (суспензиялап), оған 20 мкл лизоцим қосып, 37 °С-та 1 сағат инкубацияладық. Сонан соң 30 мкл мөлшерде 10 % SDS және 3 мкл К протеиназа (20 мг/мл) қостық. Оған жасуша мембранасының фрагменттерін, полисахаридтер мен ақуыздардың қалдығын жою үшін 100 мкл 5М NaCl қосылды. Вортексте араластырылып, үстіне 80 мкл СТАВ (10 % СТАВ-та 0,7 М NaCl) ерітіндісі қосылды. Қайтадан вортексте араластырып 65 °С-та 10 минут инкубацияладық. Содан соң бөлініп алынған ДНҚ фенол/хлороформ әдісімен тазаланды. Ол үшін алынған суспензияға 700 мкл хлороформ/изоамил спиртін (24/1) қосып, шайқап 12000 мин/айналымда 10 минут центрифугаладық. Бөлінген су бөлігін жаңа шыны түтікке құйып

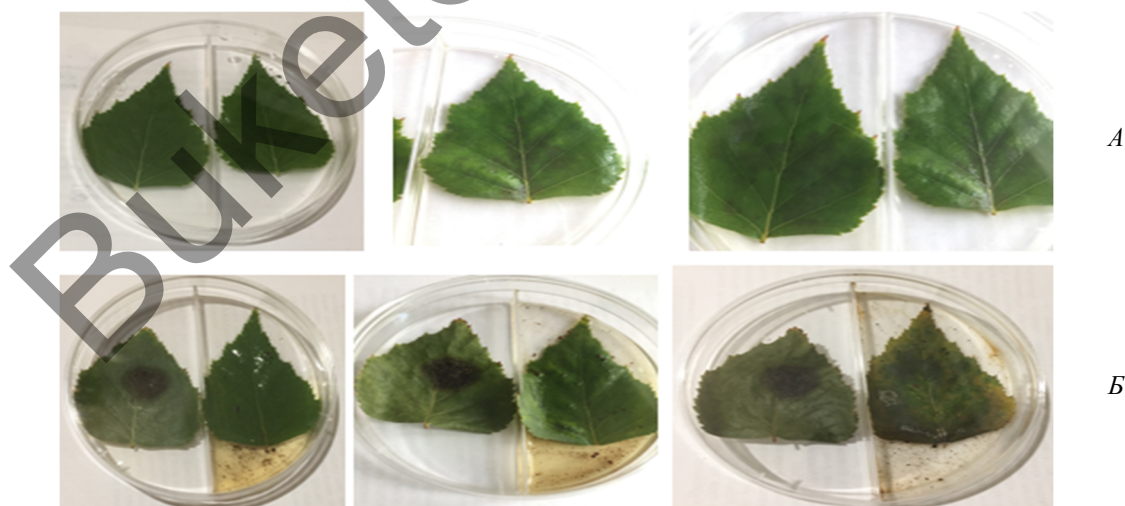
алып, тағы да фенол/хлороформ (1:1) қоспасын қосып, центрифугалап, өсіндінің бізге қажет емес басқа белок және клетка мембранасының қалдықтарынан тазаладық. Сонан соң оның жоғарғы сұйықтық бөлігін (1,5 мл) жаңа шыны түтікке құйып алып, оған 600 мкл изопропил спиртіні қосып ДНҚ-ны тұндырып алдық. Шыны түтіктің түбінде тұнған ДНҚ-ны 70 % этил спиртімен шайып алып, тазаланған ДНҚ үлгілеріне 100 мкл ТЕ буферін қосып — 20°C-қа мұздатқышқа салып қойдық. Бөлініп алынған ДНҚ үлгілерінің концентрациясын 260 нм толқын ұзындығында NanoDrop спектрометрдің көмегімен анықталды.

16SrRNA гені фрагментінің амплификациясы, ПТР келесідей эмбебап праймерлермен жүргізілді: 8f 5'-agagtttgatcctggctcag-3 және 806R-5'ggactaccagggtatctaat. Пайдаланылған реакция қоспасының мөлшері 20 мкл-ға тең болды. ПТР қоспасы 150 нг ДНҚ, 1 бірлік Taq DNA Polymerase (Fermentas), әр біріне 0,2 mM дНУФ (дезоксинуклеозодоүшфосфат), бір реттік ПТР буфер (Fermentas) 2,5 mM MgCl₂, әр біріне 10 пмоль праймер қосылды. ПТР амплификациясының бағдарламасы бірінші 95 °C-та 7 минут аралығында денатурация, 30 циклмен кезектесетін — 30 секунд, 55 °C — 40 секунд, 72 °C — 1 минут, 7 минут 72 °C температурамен соңғы элонгациямен аяқталады.

Нуклеотидтік тізбекті анықтау. Байланыспаған праймерлерден ПТР өнімін тазалау үшін ферменттік әдіс Exonuclease I (Fermentas) пен сілтілік фосфатаза (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) пайдаланылды. Ал секвендеу реакциясы BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) өндірушінің қолдану ережесі бойынша 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) автоматты генетикалық анализаторда, нуклеотидтік тізбекті фрагменттерге ретімен бөлетін секвенаторды қолдану арқылы жүзеге асты.

Зерттелген штамның нуклеотидтік тізбегінің молекулалық идентификациясы мен Gene Bank мәліметтер базасының анализі барысында жоғарғы көрсеткішпен *Dickeya dadantii* бактерия түрін алып, оның қайың ағашының бактериозының қоздырғышы екенін анықтадық.

Дайын бактериялық обыр қоздырғышының штамын сау қайың ағаштарының жапырақтары мен сырғаларына инфекциялық белсенділігін *in vitro* жағдайында зерттеу мақсатында ауру белгілері жоқ қайың жапырақтары мен сырғалары стерильді контейнерлерге жинақталды. Аталмыш материалдар Жасыл белдеу орман шаруашылықтарынан жаз айларында жиналды. Жапырақтар сыртынан 90 %-дық этил спиртімен сүртіліп, артынан дистельденген сумен шайылды. Сонан соң олар бір реттік қолданыста болатын Петри табақшасына орналастырылды. Екі бөлікке бөлінген 3 табақшаға 6 жапырақ орналастырылды. 1-табақшаға 50 мл суға 5 мл бактерия штамы араластырылып құйылды, 2-табақшаның жарты бөлігіне 50 мл суға керненнен стерильді жағдайда алынған 5 мл эксудат араластырылып құйылды. 3-табақшаның екі бөлігіне де (құрғақ табақша) орналастырылған жапырақ алақанының бетіне бактерия штамы жағылды. Барлық табақшалар термостатқа 25 °C қойылды. Бақылау әр 2, 5, 7 күн сайын жүргізіліп отырды (сурет 2).



Сурет 2. А — 2, 5, 7 күн аралығындағы бақылау нәтижелері (50 мл су + 5 мл эксудат);
 Б — 2, 5, 7 күн аралығындағы бақылау нәтижелері (керненнен стерильді жағдайда алынған эксудат)

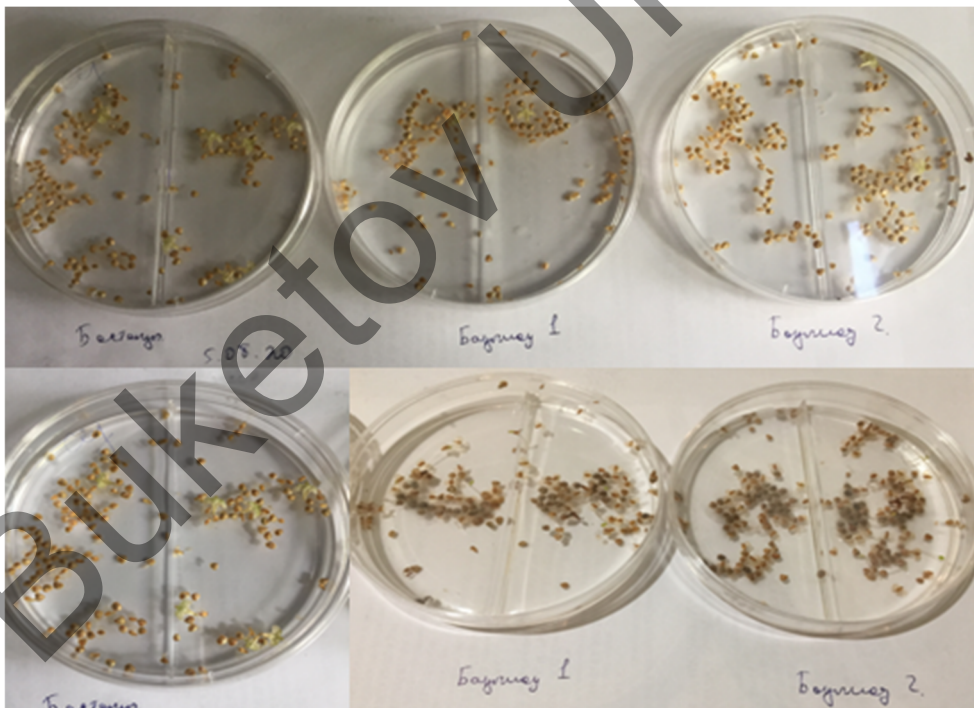
Бактериялық обыр қоздырғышының инкубациялық уақыты 5–7 күн аралығында өтті. 2-суретте А — қатары 50 мл су + 5 мл *Dickeya dadantii* штамы қосылған сұйықтықта, бақылаудың 2 күнінде,

бактериялық обырға шалдыққан қайың ағашы діңіндегі қатты, қоңыр түсті даққа ұқсас торала дақтар пайда болды. 5-ші бақылау күні аталмыш дақтар жапырақ алақанының ортаңғы бөлігін толықтай қамтыды. 7-ші күні жапырақтың үстіңгі және астыңғы бетіндегі, жасыл бағаналы және борпылдақ жасушалардың инокулум бактерия әсерінен зақымданғанын байқадық.

Б-қатары, Петри табақшасының бірінші құрғақ бөлігінде (жапырақ алақанына эксудат тамызылған) тамшы тамызылған жапырақ аймағының қарайғанын аңғардық, 5-ші күні ол шіріп ойық жара көзіне айналды. 7-ші бақылау күні тамшы аймағының толықтай шіріп кеткенін аңғардық (тамшы тимеген аймақ сау). Петри табақшасының екінші 50 мл эксудат құйылған бөлігінде 2-ші бақылау күні солғын дақтар пайда болды. 5 күні олар кара-қоңыр дақтарға айналды. 7 күні дақтардың көлемінің үлкейіп, жапырақ алақанының бағаналы және борпылдақ жасушаларының құрылысы бұзылды.

Қайың ағашының жапырақтарымен жүргізілген екі түрлі жұмыс барысындағы ұқсастық, ол пайда болған дақтар сипаттамалары мен инкубацияланған уақыты (5–7 күн). Ал, дистельденген сумен бактерия штамы араласқан Петри табақшасындағы жапырақтардың, ағаш діңінен алынған эксудатпен зақымдалу процесінен (үдерісі) айтарлықтай ерекшеліктері бар. Ол бірінші жасалынған жұмыста жапырақ тақтайшаларында пайда болған зақымдалу аймақтар әр түрлі көлемде, екіншіден таза эксудат жапырақ жасушаларын шіру деңгейіне дейін жеткізуі.

Келесі жасалынған жұмыс қайың ағашының сырғаларының бактерия штамының әсерінен өзгеріске ұшырауын қадағалау. Стерильді жағдайда жинақталған қайың сырғалары 7 күн ішінде кептірілді, үгітіліп алынған сырға дәндерін 90 %-дық этил спиртімен шайып, артынан дистельденген сумен жуылды (сурет 3). 2 сағат ішінде қайта кептіріліп, электронды таразымен өлшенді. Алдын-ала дайындалған екі бөлікке бөлінген 3 Петри табақшаларына 2 г кептірілген дәндер салынды. Біріншісі таза дистельденген су құйылып, бақылау деп белгіленді, қалған 4 бөлікке бактериялық обыр бактерия штамынан 5 мл + 50 мл дистельденген су қосып құйылды. Бақылау әр 2, 5, 7 күндері жүргізіліп отырды.



Сурет 3. А — 5-ші күн бақылау; Б — 7-ші күн бақылау

Қайың ағашының сырғасын *Dickeya dadantii* штамымен зақымдау барысында келесідей ерекшеліктерді байқадық: 2-ші бақылау күнінде ешқандай өзгерістер болмады, 5-ші бақылау күні екі бақылау Петри табақшаларындағы кейбір дәндердің кара-қоңыр түске айналғанын көрдік, 7-ші бақылау күні зақымдалған дәндердің саны көбейе түсті. Бастапқы таза суда орналастырылған дәндер өзгеріссіз қалды. Зақымдалған дәндердің түсі бактериялық обырға шалдыққан қайың ағашы діңіндегі

жара көздерінің түсімен сай келді. Бір ерекшелігі Петри табақшасындағы дәндер толықтай зақымдалған жоқ, соңғы бақылау күнгі нәтиже бойынша табақшадағы дәндері 35–40 пайызы ғана зақымдалды.

Қорытынды

Нұр-Сұлтан қаласын қоршай орналасқан Жасыл белдеуде өсіп тұрған қайың ағаштарында кездесетін бактериялық обырдан бөлініп алынған бактерия штамдарын молекулалық гендік зерттеулер нәтижесінде және халықаралық Генбанктегі сәйкес түрлермен салыстыра талдау негізінде *Pectobacteriaceae* тұқымдасының *Dickeya* туысына жататын түр — *D. dadantii* екенін анықтадық.

Бактериялық обырға ұшырамаған қайың ағаштарының жапырақтары мен сырғаларын *in vitro* жағдайында өзіміз бөліп алған *Dickeya dadantii* штамдарымен инокуляциялау патогеннің тәжірибеге алынған қайың популяциясына толықтай вируленттігін, яғни инфекциялық белсенділігін көрсетті. Сонымен, молекулалық гендік және *in vitro* жағдайында жасанды зарардау тәсілдерімен жүргізілген тәжірибе жұмыстары Нұр-Сұлтан қаласын қоршай орналасқан Жасыл белдеуде өсіп тұрған қайың ағаштарында анықталған бактериоз — бактериялық обыр, екінші атауы сулы бактериоз, ал оның қоздырғышы *D. dadantii* екені дәлелденді.

Әдебиеттер тізімі

- 1 Рыбалко Т.Н. Бактериозы хвойных Сибири / Т.Н. Рыбалко, А.Б. Гукасян. — Новосибирск: Наука, 1986. — 84 с.
- 2 Попкова К.В. Общая фитопатология / К.В. Попкова. — М.: Дрофа, 2005. — 445 с.
- 3 Воробьев Г.И. Лесная энциклопедия / Н.А. Анучин. — М.: Сов. энцикл., 1985. — 563 с.
- 4 Щербин-Парфененко А.Л. Бактериальные заболевания лесных пород / А.Л. Щербин-Парфененко. — М.: Гослесбумиздат, 1963. — 148 с.
- 5 Carter J.C. Wetwood of elms / J.C. Carter. — Bull Illinois Nat Hist Surv, 1945. — P. 401–448.
- 6 Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8th ed. — Baltimore, 1974. — 1268 p.
- 7 Brenner D.J. III. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. / D.J. Brenner, A.C. McWhorter, A. Kai, A.G. Steigerwalt. J.J. Farmer // J. Clin. Microbiol. — 1986. — No. 23. — P. 1114–1120 p.
- 8 Hartman J. Bacterial wetwood and slime flux is different from winter pruning sap flow. Kentucky Pest News // Entomology Plant Pathology. — 2000. — No. 872. — Retrieved from <http://www.uky.edu/Agriculture/kpn/kpnhome.htm>
- 9 Bradbury J.F. Guide to the Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute / J.F. Bradbury. — Kew, UK, 1986. — 245 p.
- 10 Самусь Т.М. Бактериальные болезни плодовых деревьев в Краснодарском крае и биология их возбудителей: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т.М. Самусь. — Киев, 1973. — 22 с.
- 11 Martinec T. A taxonomic study of *Erwinia amylovora* (Burrill, 1882 — Winslow e.a., 1920) / T. Martinec, M. Kocur // Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. and Taxon. — 1964. — No. 14. — P. 5–14.
- 12 Мироненко О.Н. Бактериальное заболевание березняков в Казахстане / О.Н. Мироненко, С.А. Кабанова, О.Ю. Баранов, М.А. Данченко // Вестн. ПГТУ. — 2016. — № 6. — С. 90.
- 13 Winslow C-E.A. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types / C-E.A. Winslow, J. Broadhurst, R.E. Buchanan, C. Jr. Krumwiede, L.A. Rogers. G.H. Smith // J Bacteriol. — 1917. — P. 505–566.
- 14 Dye D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The, 'amylovora' group / D.W. Dye // New Zeal J Sci. — 1968. — Vol. 11. — P. 590–607.
- 15 Dye D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The 'carotovora' group / D.W. Dye // New Zeal J Sci. — 1969. — Vol. 12. — P. 81–97.
- 16 Suharjo R. Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR-RFLP / R. Suharjo, H. Sawada, Y. Takikawa // J Gen Plant Pathol. — 2014. — Vol. 80. — P. 237–254.
- 17 Лазерев А.М. Новый возбудитель бактериоза картофеля атакует российские поля / А.М. Лазерев // Защита и карантин растений. — 2013. — № 6. — С. 11.
- 18 Dye D.W. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria / D.W. Dye // New Zeal J Agric Res. — 1978. — Vol. 21. — P. 153–177.
- 19 Hauben L. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* / L. Hauben, E.R.B. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, J. Swings // Syst Appl Microbiol. — 1998. — P. 384–397.

А.К. Баубекова, С.А. Абиев, Р.З. Асилханова

Получение чистого штамма возбудителя бактериального рака и изучение его инфекционной активности у древесных пород в условиях *in vitro*

Наличие густых и разнообразных девственных лесов, которые питают почву, выделяют большое количество кислорода, является мечтой каждого государства. Поэтому первый Президент страны Н. Назарбаев распорядился сделать вокруг Нур-Султана большую зеленую зону. Можно с уверенностью утверждать, что данный проект с каждым годом совершенствуется, облагораживается, а зеленый лес окружает все вокруг нашей молодой столицы. Данный проект призван превратить столицу Казахстана — город Нур-Султан — в зеленый пояс, вокруг города полностью засеять лесные массивы, площадь которых составляет 100 тысяч гектаров. Правильно привитые древесные растения в зеленой полосе, кроме обогащения воздуха кислородом, декоративно оформленных ландшафтов, должны способствовать проветриванию зон, отводу загрязненного воздуха от жилых и производственных зон, образованию вертикальных воздушных потоков и рассеиванию загрязненного воздуха в более высоких слоях атмосферы, а также очищению воздуха от различных аэрозолей, пыли, сажи и жары. Тем не менее, все эти природные богатства находятся под большой угрозой из-за распространенности широко известного, но малоизученного заболевания — бактериального рака древесных пород. В настоящее время такая болезнь наблюдается в Башкортостане, странах Балтии, Татарстане, Республике Адыгее, европейской части России, а также в Брянске и прилегающих регионах. В этих странах увеличивается охват пород деревьев этим заболеванием, что создает реальную угрозу усыханию стволов деревьев. В Казахстане также встречается бактериальный рак древесных пород. В связи с этим изучение данного заболевания является весьма актуальным, так как, в силу особенностей поражения деревьев, диагностики заболевания, лесорастительно-таксационных и ландшафтных условий, его распространение изучено не до конца. Целью нашей работы является взятие образцов керна из березы (*Betula pendula* Roth.), которая произрастает в лесных хозяйствах Зеленого пояса, окружающих город Нур-Султан, с признаками бактериального рака (водянка); получение образцов керна из ствола; культивирование выделенных из них культур бактерий на питательных средах; сбор чистых штаммов возбудителя болезни; молекулярная идентификация нуклеотидной цепи рибосомной РНК 16S. Кроме того, определение молекулярных характеристик полученных штаммов бактерий в соответствии с типичным типом *Dickeya dadantii* в Международной базе GenBank. В ходе исследования была изучена инфекционная активность этого штамма бактерий на другие древесные аналоги в условиях *in vitro*. Инокуляция листьев и сережек берез, не подвергшихся бактериальному раку, штаммами *Dickeya dadantii*, выделенными нами в условиях *in vitro*, показала полную вирулентность возбудителя к экспериментальной популяции березы, т.е. инфекционную активность.

Ключевые слова: бактерии, бактериоз, бактериальный рак, язва, ядро, чистая культура, штамм, ДНК.

А.К. Baubekova, S.A. Abiyev, R.Z. Asilkhanova

Obtaining a pure strain of bacterial cancer pathogen and studying its infectious activity in tree species under *in vitro* conditions

Dense and diverse primary forests, which nourish the soil, emit a large amount of oxygen, are the dream of every state. Therefore, the first President of Kazakhstan N. Nazarbayev ordered to make a large green zone around Nur-Sultan, which is being improved and refined every year. This project is designed to turn the capital of Kazakhstan, the city of Nur-Sultan, into a green belt, completely sowing forests around the city, the area of which is 100 thousand hectares. Properly grafted woody plants in the green belt, in addition to enriching the air with oxygen, decorating landscapes, should contribute to the ventilation of zones, the removal of polluted air from residential and industrial zones, the formation of vertical air flows and the dispersion of polluted air in higher layers of the atmosphere, as well as air purification from various aerosols, dust, soot, and heat. Nevertheless, all these natural resources are under great threat due to the prevalence of a little-studied disease-bacterial cancer of tree species. Currently, such a disease is observed in Bashkortostan, the Baltic States, Tatarstan, the Republic of Adygea, the European part of Russia, as well as in Bryansk and adjacent regions. In these countries, the coverage of tree species with this disease is increasing, which creates a real threat of the tree trunks drying. Bacterial cancer of tree species is also found in Kazakhstan. In this regard, the study of this disease is relevant, since due to the characteristics of the lesion of trees, the diagnosis of the disease, forest-taxation and landscape conditions, its spread has not been fully studied. The purpose of our work is to take core samples from birch (*Betula pendula* Roth.), which grows in the forests of the Green Belt surrounded by the city of Nur-Sultan, with signs of bacterial cancer (dropsy); obtain core samples from the trunk, to cultivate isolated bacterial cultures on nutrient media; to obtain pure strains of the causative agent of the disease, molecular identification of the nucleotide chain of ribosomal RNA 16S. In addition, the determination of the molecular characteristics of the obtained bacterial strains in accordance with the typical

type of *Dickeya dadantii* on the international basis of Gene Bank. In the course of the study, the infectious activity of this strain of bacteria on other woody analogues was studied in vitro. Inoculation of birch leaves and catkins that have not undergone bacterial cancer with *Dickeya dadantii* strains isolated by us in vitro showed complete virulence of the pathogen to the experimental birch population, i.e. infectious activity.

Keywords: bacteria, bacteriosis, bacterial cancer, ulcer, core, pure culture, strain, DNA.

References

- 1 Rybalko, T.N., & Gukasian, A.B. (1986). *Bakteriozy khvoynykh Sibiri [Bacteriosis of conifers of Siberia]*. Novosibirsk: Nauka [in Russian].
- 2 Popkova, K.V. (2005). *Obshchaia fitopatologiia [General phytopathology]*. Moscow: Bustard [in Russian].
- 3 Vorobev, G.I., & Anuchin, N.A. (1985). *Lesnaia entsiklopediia [Forest encyclopedia]*. Moscow: Sovetskaiia entsiklopediia [in Russian].
- 4 Shcherbin-Parfenenko, A.L. (1963). *Bakterialnye zabolevaniia lesnykh porod [Bacterial diseases of forest species]*. Moscow: Goslesbumizdat [in Russian].
- 5 Carter, J.C. (1945). Wetwood of elms. *Bull Illinois Nat Hist Surv*; 401–448.
- 6 Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore.
- 7 Brenner, D.J., McWhorter, A.C., Kai, A., Steigerwalt, A.G., & Farmer J.J. (1986). III. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.*, 1114–1120.
- 8 Hartman, J. (2000). Bacterial wetwood and slime flux is different from winter pruning sap flow. *Kentucky Pest News*. <http://www.uky.edu/Agriculture/kpn/kpnhome.htm>
- 9 Bradbury, J.F. (1986). *Guide to the Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute. Kew, UK.
- 10 Samus, T.M. (1973). *Bakterialnye bolezni plodovykh derevev v Krasnodarskom krae i biologii ikh vzbuditelei [Bacterial diseases of fruit trees in the Krasnodar Territory and the biology of their pathogens]*. Kiev: Nauka [in Russian].
- 11 Martinec, T., & Kocur, M. (1964). A taxonomic study of *Erwinia*. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. and Taxon*, 14; 5–14.
- 12 Mironenko, O.N., Kabanova, S.A., Baranov, O.Yu., & Danchenko, M.A. (2016). Bakterialnoe zabolevanie berezniakov v Kazakhstane [Bacterial disease of birch forests in Kazakhstan]. *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta — Vestnik of Volga State University of Technology*, 6; 90 [in Russian].
- 13 Winslow, C-E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C. Jr., Rogers, L.A., & Smith, G.H. (1917). Smith The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol.*; 505–566.
- 14 Dye, D.W. (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The 'amylovora' group. *New Zeal J Sci.*, 11; 590–607.
- 15 Dye, D.W. (1969). A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The 'carotovora' group. *New Zeal J Sci.*, 12; 81–97.
- 16 Suharjo, R., Sawada, H., & Takikawa, Y. (2014). Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR–RFLP. *J Gen Plant Pathol.*, 80; 237–254.
- 17 Lazarev, A.M. (2013). Novyi vzbuditel bakterioza kartofelia atakuet rossiiskie polia [New pathogen of potato bacteriosis attacks Russian fields]. *Zashchita i karantin rastenii — Plant protection and quarantine*, 6; 11 [in Russian].
- 18 Dye, D.W. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zeal J Agric Res.*, 21; 153–177.
- 19 Hauben, L, Moore, E.R.B, Vauterin, L, Steenackers, M, Mergaert, J, Verdonck, L., & Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol.*; 384–397.