

С.А. Абиев<sup>1\*</sup>, А.К. Баубекова<sup>1</sup>, Р.З. Асилханова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан;

<sup>2</sup>С. Сейфуллин атындағы агротехникалық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

\*Хат-хабарларға арналған автор: [abiyeв\\_sa@enu.kz](mailto:abiyeв_sa@enu.kz)

### Сүйелді қайың (*Betula Pendula*) ағашын зақымдайтын фитопатогенді бактерияларды молекулалық идентификация тәсілі арқылы анықтап оның филогенетикалық шежіресін құру

Мақалада Нұр-Сұлтан қаласын қоршай отырғызылған жасанды «жасыл белдеу» орман шаруашылықтарында өсетін сүйелді қайың ағаштарының (*Betula pendula* Roth.) бактериялық обырмен зақымдалуына байланысты морфологиялық өзгерістері қарастырылып, ауру ағаш діндерінен керн үлгілері алынып, бөлініп алынған бактерия культуралары қоректік орталарда өсіріліп, оларға культуралық-морфологиялық сипаттамалар берілді. Ауруға шалдыққан сүйелді қайың ағашы дінінен керндер алу, олардан ауру қоздырғыштың таза штамдарын бөліп алу, рибосомдық РНҚ 16S нуклеотидтік тізбегінің молекулалық идентификациясы және осы нәтижелерді халықаралық *Gene Bank* базасындағы тиісті мәліметтермен салыстыра зерделеу жұмыстары бактериология және ботаника салаларында қолданыстағы заманауи тәсілдер арқылы жүргізілді. Бөлініп алынған бактерия штамдарының молекулалық сипаттамалары халықаралық *Gene Bank* базасындағы типтік *Dickeya dadantii* штамына 96,72 %-ға сәйкес келді.

*Кілт сөздер:* бактериялық обыр, культура, штамм, бактерия, ДНК, керн, бұрғылау, идентификация, бактериоз.

#### *Kipicne*

Қайың ағаштарының бактериялық обыры — бұл туыстың өте зиянды өзекті — паренхиматозды ауруы болып табылады. Аурудың басты белгілері ағаш дінінің әр жерінде, кейде бұтақтарында, перидерма бетінде сарғыш-қызғылт түсті дақтардың пайда болуынан басталады. Бірте-бірте мұндай дақтардың орны ісініп, үлкейіп, сонан соң жарылады. Жарықшақтардан ақшыл-қоңыр, жағымсыз иісті сұйық сыртқа аға бастайды. Сыртқа шығып төмен қарай қабық бетіне жайылған сұйық тез кебеді, алыстан көзге түсетін көлемді сарғыш-қоңыр даққа айналады. Оның жоғарғы жағындағы жара жазылмайтын қатпаршақ кебу жараға айналады. Уақыт өте келе мұндай жараның орны үлкейіп, қасаңданып, сыртқы қабығы түсіп қалады. Ауру ағаш дініне тереңдей еніп өзекті қамтиды, өткізгіш ұлпалар бұзылады, бітеледі, жапырақтар солғын тартып, түсе бастайды. Кейбір бұтақтары қурап қалады. Ағаш сұлбасы селдіреп, ақыр соңында ағаш өледі.

Ағаш тектестердегі бактериялық обырды зерттеулер 1945 жылы жарияланған *J.C. Carter* еңбегінен [1] бастау алады. Ол қарағашта кездесетін сулы бактериозды «*wetwood*» (дымқыл дің) деп, қоздырғышын — *Erwinia nimipressuralis* деп анықтап, оған алғаш сипаттама берген ғалым.

1963 жылы А.Л. Щербин-Парфененко [2] 22 түрге жататын қылқан жапырақтылардан бактериялық обырды анықтап, қоздырғыштарына грамтеріс, спора түзбейтін *Erwinia multivora* деп сипаттама берді. Өткен ғасырдың 70-ші жылдары жүргізілген зерттеулер [3] Зауралья, Оңтүстік Батыс Сібір және Солтүстік Қазақстан ормандарында қайың ағаштарында бактериялық обырдың

карқынды тарала бастағанын көрсетті. Қазақстанда бұл аурудың таралу аймақтарына Қостанай, Солтүстік Қазақстан, Павлодар облыстары кірді. 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 carotovorum* және *Dickeya dadantii* сынды бактериялар анықталғандығы келтірілген [4].

*Erwinia* туысы *Enterobacterales* қатарына жататын фитопатогенді бактериялар тобы. Көлемі 1–3×0,5–1 мкм грамтеріс таяқша тәрізді, факультативті анаэробтар. Бұл туысты Winslow et al. [5] 1917 жылы анықтап, оған америкалық патологанатом *Erwin F. Smith* есімін берді. 1945 жылы Waldee [6] *Erwinia* туысын *Pectobacterium* деп ауыстыруды ұсынды. 1968 жылы Dye [7] биохимиялық сипаттамаларын негізге ала отырып *Erwinia* туысын төрт түрге бөлді: *Erwinia amulavora* — алма ағашының және басқа да раушан тұқымдастарының (*Rosaceae* (*Spiraeoideae*)) патогені, жеміс дақылдарының бактериялық күйік ауруының қоздырғыштары; *Erwinia carotavora* — әртүрлі туыс өкілдерінің, оның ішінде картоптың, жер үсті бөліктерін, сондай-ақ жер асты 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 [8] *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. uredovorus*; *E. stewartii* және *E. carotovora* (var. *carotovora*, var. *atroseptica*, var. *rhapontici*, var. *chrysanthemi*, var. *cypripedii*). Осы жылы Dye-ның ұсынысы бойынша Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8-ші басылымында *Erwinia carotavora* түрі келесідей түрлер мен түр тармақтарына жіктелді: *Erwinia cypripedii*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* var. *carotovora* және *Erwinia chrysanthemi* [9].

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 [10]. Сондай-ақ оның көптеген тропиктік және субтропиктік аймақтардың өсімдіктерін зақымдайтыны белгілі. Өсімдіктің тамырын, түйнектерін, шырынды етженді мүшелерін бұзатын жұмсақ шірік ауруын қоздырады, тамыр қисилемасын отарлап, өсімдікті жүйелі түрде зақымдайды.

Dye [11] 1978 жылы *E. chrysanthemi*-дің патологиялық және биохимиялық қасиеттерін негізге ала отырып, оны бірнеше патоварианттарға жіктеді (*pv. zaeae*, *pv. dieffenbachiae*, *pv. parthenii* және *pv. dianthicola*). 1980 жылы Dickey және Victoria банан өсімдігінен анықталған жаңа патовариантты *pv. paradisiaca*-ны *E. chrysanthemi*-мен біріктірді. 1998 жылы 16S рДНК нуклеотидтік тізбегін негізге ала отырып Hauben et al. [12] *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 [12].

2005 жылы фенотиптік тест, ДНҚ-ДНҚ гибридизация, серология және 16S рДНК нуклеотидтік тізбегін талдау көмегімен Samson et al. *E. chrysanthemi*-ді *Erwinia* туысынан бөліп алып, оған белгілі микробиолог Dickey R.S. есімін беріп, жаңа статуска — *Dickeya* туысына көтерді [10]. 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. zaeae*.

Жалпы, *Dickeya Pectobacteriaceae* тұқымдасына кіретін, әр түрлі климаттық жағдайларда өсімдіктің көптеген түрлерін зақымдайтын, кең ауқымды бактерия туысы. Басқа бактериялардан айырмашылығына: жоғарғы температурада максималды агрессивтілігі, өсімдіктен өсімдікке насекомдар арқылы тасымалдануы, өсімдіктің өткізгіш жүйесі арқылы өсімдік денесіне тез таралуы, төменгі температурада латентті күйде сақталуы жатады. *Dickeya* мына өсімдіктердің патогені болып табылады: *D. dianthicola* — картоп, қызанақ, қалампыр, құртқашаш; *D. dieffenbachiae* — картоп, ананас, банан, жүгері, құртқашаш, батат және пеларгония; *D. solani* — картоп, қызанақ; *D. paradisiaca* — банан; *D. chrysanthemi* — қызанақ, картоп, темекі, сәбіз, хризантема; *D. zaeae* — жүгері, бидай, картоп, ананас, банан, темекі, күріш, қырыққабат, хризантема, қалампыр. Сонымен қатар, 2013 жылы *recA*, *dnaX*, *rpoD*, *gyrB* мультилокусты тізбектерінің талдауы және 16S рДНК; ПЦР геномдық дактилоскопия және биохимиялық тесттер нәтижесіне сүйене келе, жапондық ғалымдар *Dickeya* туысын 24 әр түрлі өсімдік түрлерінен бөліп алып, оларды 6 топқа топтастырды: I топ

*D. chrysanthemi*, II — *D. dadantii*, III — *D. dianthicola*, IV — *D. zaeae*, V және VI топтарға жаңадан анықталмақ түрлер жатқызылды [9].

Ағаштектестердің бактериялық обыры басқа өсімдіктер түріне қарағанда аз зерттелген. Ағаштектестердің ішінде бактериялық обырдың ең көп зақымдайтыны қайың ағаштары (*Betula pendula*) мен кедр қарағайы (*Pinus sibirica*). Бактериялық обырмен Оралдың еуропалық бөлігі аумағында, Батыс және Солтүстік Сібір, Таяу Шығыс, Беларусия, Солтүстік Қазақстан орман алқаптарының қайың ағаштары зақымдалған. 2007 жылы қайыңның бактериялық обыры Ресейдің 11 аймағынан 11,7 мың га, 2012 жылы Урал аймағында 3 мың га, Солтүстік Қазақстан жерінде 2013 жылы 5 мың га таралғаны анықталған. Сондай-ақ, бұл ауру Ресей жерінде *Betula* туысының барлық ареалына таралған [1]. Мұнда 2016 жылы 51 мың га аумақта кедр ағаштары зақымдалып, оның 5,7 мың га қурап, жойылған.

Бактериоз, басқа да ондаған ағаштектестерді залалдайды: самырсын, шырша, балқарағай, емен, шамшат, қарағаш, жөке, шаған, қайың, тал және т.б. Бұрынғы дерек көздерге сүйенсек, бактериялық обырдың қоздырғышы ретінде екі көзқарас қалыптасқан: бірі *Erwinia multivora* Scz.-Parf. [13], екіншісі *Erwinia nimipressuralis* Carter [1].

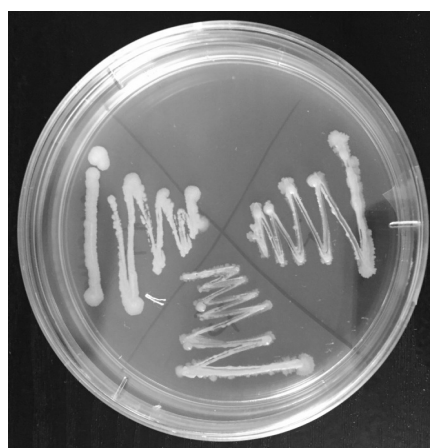
Соңғы мәліметтерде Қазақстанның солтүстік аудандарында бактериялық обырға шалдыққан қайың ағаштарынан *Enterobacteriaceae* тұқымдасына жататын *Dickeya dadantii*-ге сәйкес (93 %) келетін фитопатогенді бактерия штамдары анықталған [4]. Ал *Dickeya dadantii* иелік өсімдіктерінің құрамы жағынан кең спектрлі бактерия екені белгілі. Сонымен, Солтүстік Қазақстан аумағындағы қайың ағаштарында кездесетін бұл ауру қоздырғышты О.Н. Мироненко, С.А. Кабанова ж.б. [4] бір ғана бактерия түрі емес, олардың генерализацияланған тобы болуы мүмкін дейді [4]. Соңғы жылдары жүргізілген шет елдік ғалымдардың зерттеулерінде ағаштектестердің бактериялық обыры патологиясының себепкері ретінде бұрындары ешқашан ағаштектестерде анықталмаған бактериялар *Pectobacterium* (*Erwinia*) *carotovorum* және *Dickeya* spp. келтірілген [14]. Оның себепін ауру қоздырғыштарды идентификациялау кездері ағаш діңіндегі обыр жарадан аққан сұйыққа әр түрлі себептермен кейіннен келіп түскен аталмыш бактериялардың да есепке алынып кетуінен болар деп те жорамалдауға негіз бар.

#### Зерттеу әдістері мен нәтижелері

Зерттеу материалдары жаз және күз айларында Нұр-Сұлтан қаласын қоршай отырғызылған жасанды жасыл белдеу орман шаруашылықтарынан (Қызылжар о/ш, Вячеславка о/ш, Аршалы о/ш,) алынды. Аталмыш шаруашылықтардың таңдалып алыну себебі, мұнда қайың ағаштарының көптеп отырғызылуында және олардың жас шамаларының әрқалай (15–30 жыл) болуы. Осы орман шаруашылықтары аумағында ертеректе, өткен ғасырдың 70-ші жылдары отырғызылған және олармен аралас өскен табиғи қайыңды шоқ ормандар да кездеседі. Жасанды жасыл белдемдегі екпе отырғызылымдардағы көптеген ауру түрлері, оның ішінде бактериялық обыр да, осы ескі шоқ ормандардан таралуы әбден ықтимал.



А



Б

А — Haglof бұрғысы арқылы көлденең бағытта керндер алу; Б — өрмек тәрізді себу

1-сурет.

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

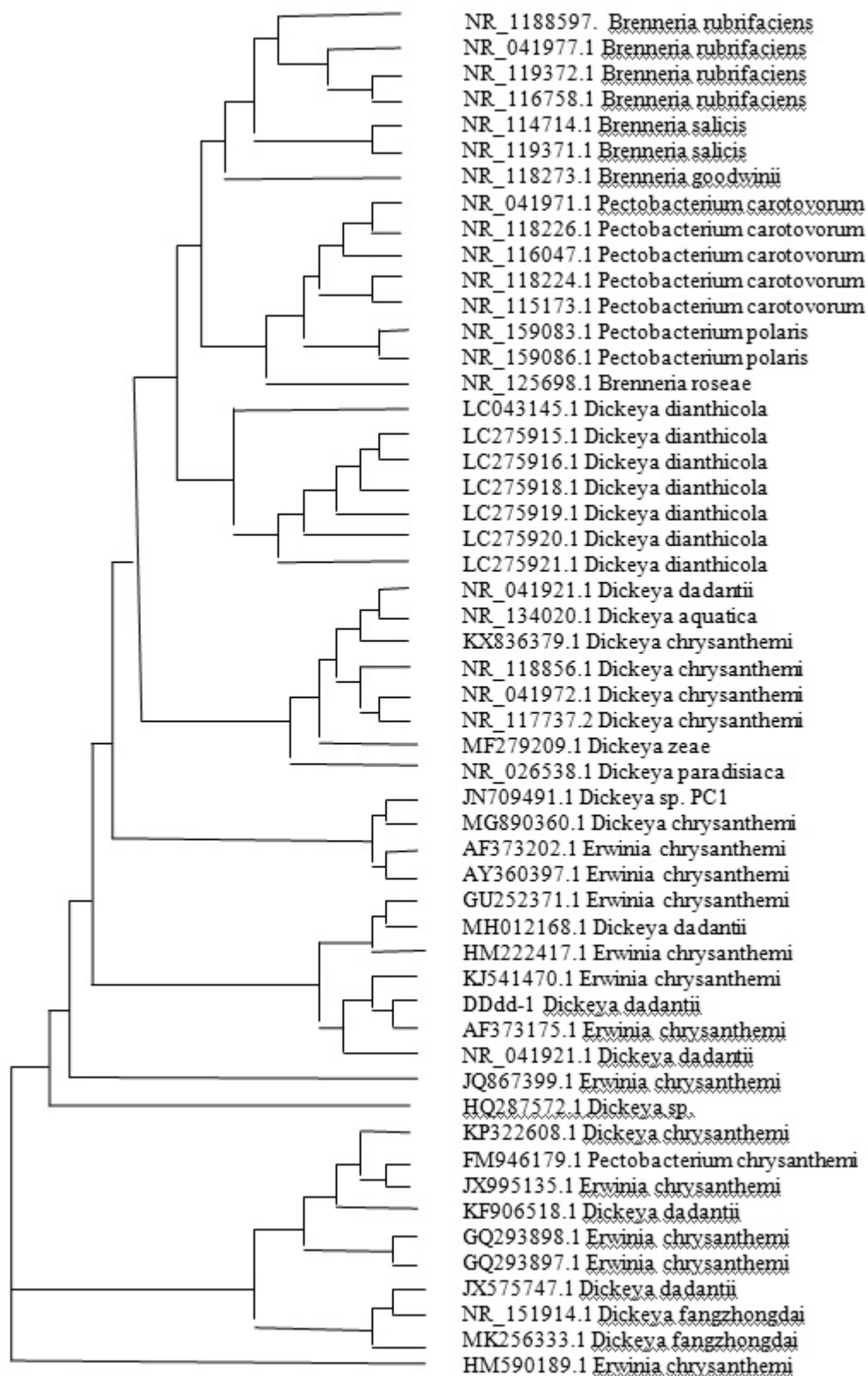
Аурудың белгісі бар, морфологиялық өзгеріске ұшыраған қайың ағаштарының діңінен арнайы Naglof бұрғысы (ұз. 100–500 мм, дм 4,3 мм) арқылы көлденең бағытта керндер алынды (1-сурет). Алынған керндер (3–12 см) сыртынан 90 %-дық этил спиртімен сүртіліп, стирильді пробиркаларға салынып, пайдаланғанға дейін тоңазытқышта 3–4 °С-та сақталды. Керндерден 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. Керндерден ауру қоздырғыштарды бөліп алып, олардың таза штамдарын алу үшін әртүрлі жасанды қоректік орталар пайдаланылды (стандартты агар, картопты агар, ет-пептонды агар, эндо). Стирильді жағдайда, ламинарлық бокс камерасында керндердің 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. Пайда болып өсе бастаған екпе колониялар күн сайынғы бақылауға алынып, сипаттамалары (колониялар бітімі мен пішіні, тығыздығы, түсі және өсу қарқындылығы) жасалды. Қоректік ортадағы бактерия колонияларын басқа микроорганизмдерден тазарту үшін қайта өрмек тәрізді себу әдісі қолданылды (1-сурет).

Қоректік ортада өсе бастаған 5 күндік бактерия колонияларының сипаттамасы келесідей: колониялар керн дискісін жиіктей орналасқан, жиіктері тарамдалмаған, біркелкі емес, толқын тәрізді, түсі ақ, керн дискілерінен 0,2–0,4 см шетке қарай тараған. Тазартылған 5 күндік екпе колониялардың пішіні дискі тәрізді домалақ, түсі ақ-жылтыр, ақшылтым, жиіктері тегіс, консистенциясы тығыз, қоймалжың, көлемдері 9×10 мм, 4×7 мм, 3×6 мм, 4×6 мм, 5×9 мм.

Гендік типтеу мақсатында бактерия культураларынан ДНҚ-ны бөліп алу үшін алдымен шыны пробиркадағы культураларды пластикалық пробиркаға ауыстырып, культураның 1 мл мөлшері пайдаланылды. Бұл үдеріс Kate Wilson [15] 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 араластырып, үстіне 80 мкл СТАВ (10 % СТАВ-та 07 М NaCl) ерітіндісі қосылды. Қайтадан вортексте араластырып 65 °С-та 10 минут инкубацияладық. Содан соң бөлініп алынған ДНҚ-ны фенол/хлороформ әдісімен тазаладық. Ол үшін алынған суспензияға 700 мкл хлороформ/изоамил спирті (24/1) қосып, шайқап, 12000 мин/айналымда 10 минут центрифугаладық. Бөлінген су бөлігін жаңа пробиркаға құйып алып, тағы да фенол/хлороформ (1:1) қоспасын қосып, центрифугалап, культураның қажет емес басқа белок және клетка мембранасының қалдықтарынан тазаладық. Сонан соң, оның жоғарғы сұйықтық бөлігін (1,5 мл) жаңа пробиркаға құйып алып, оған 600 мкл изопропил спирті қосып, ДНҚ-ны тұндырып алдық. Пробирканың түбінде тұнған ДНҚ-ны 70 % этил спиртімен шайып алып, тазаланған ДНҚ үлгілеріне 100 мкл ТЕ буферін қосып –20 °С-қа мұздатқышқа салып қойдық. Бөлініп алынған ДНҚ үлгілерінің концентрациясы 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, жалпы мөлшері 20 мкл. ПТР қоспасында 150 нг ДНҚ, 1 бірлік MaximaHotStartTaqDNA Polymerase (Fermentas), әр біріне 0,2 mM дНУФ (дезоксинуклеозодоушфосфат), бір реттік ПТР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, әр бірінде 10 п/моль праймер бар. ПТР амплификациясының бағдарламасы бойынша алғашқыда 95 °С-та денатурация жасалады, сонан соң кезектесе жүретін 30 цикл: 95 °С-та 30 секунд, 55 °С — 40 секунд, 72 °С — 1 минут, соңғы элонгация 72 °С-та 7 минут бойы жүріп аяқталады.

*Нуклеотидтік тізбекті анықтау.* Байланыспаған праймерлерден ПТР өнімін тазалау үшін ферменттік әдіс Exonuclease I (Fermentas) мен 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. ПЦР бағдарламасы BioRad T100 (BioRad) амплификаторын қолдану арқылы орындалды.



2-сурет. Зерттелген үлгінің филогенетикалық шежіресі (древа)

Жоғарыда баяндалғандай ауру ағаш діндерінен (көрнеулерінен) бөлініп алынған таза культуралық штамдарды секвендеу негізінде олардың *16SrRNA*-дың 8f және 806R нуклеотидтік тізбегінің реттіктері анықталды. Алынған тізбек SeqMan (Applied Biosystems) бағдарламасына енгізілді. Сонан соң, олардың ұштық фрагменттері (сапасы төмен праймерлері мен фрагменттердің нуклеотидті көрсететін реттері) алып тасталды. Алынған тізбек GeneBank мәліметтер базасындағы BLAST —

(Basic Local Alignment Search Tool) пайдалана отырып, оған туыс келетін түрлер және олардың ара қатынастарын (сәйкестіктері) көрсететін филогенетикалық шежіресі құрылды (2-сурет). Алынған нәтижелерді есептеу секвенделген *16SrRNA* тізбегінің 650 сайттары бойынша жүргізілді. Филогенетикалық шежірені құру Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI компьютерлік бағдарламасы пакетіндегі ақиқатқа барынша жақындау әдісі арқылы іске асырылды.

Нәтижесінде зерттелген бактериялық обыр штамдарының нуклеотидтік тізбегінің реттік тәртібі, бактериялардың GeneBank-тегі *16SrRNA* нуклеотидтік тізбектерінің *Dickeya dadantii subsp-ke* 96,72 %-ға ұқсастығын (гомологтылығын) көрсетті. Аталған штамның нуклеотидтік тізбегінің реті негізінде оның басқа түрлер арасындағы филогенетикалық туыстық қарым-қатынастары анықталды (2-ші суретте). Дендрограммада DDdd-1 *Dickeya dadantii* штамы (біздің штамм) Генбанктегі іріктеліп алынған *Erwinia chrysanthemi* штамдар тобына сәйкес келді. Сондықтан DDdd-1 штамы екі жақын туысты (*Dickeya dadantii* және *Erwinia chrysanthemi*) біріктіретін кладка сәйкес келді.

Зерттелген үлгінің филогенетикалық шежіресінде (древа) біздің штамм DDdd-1 *16SrRNA* нуклеотидтік тізбектері бойынша GeneBank-тегі NR041921.1 *Dickeya dadantii*, KJ541470.1 *Erwinia chrysanthemi*, AF373175.1 *Erwinia chrysanthemi* бактерияларымен жақын туыстық қарым-қатынасты көрсетті. Жалпы, *Dickeya dadantii* өсімдіктің көптеген түрлерін зақымдайтын бактерия түрі. Мысалыға: картоп, бұрыш, темекі, күріш, спаржа, пияз, сельдерей, ананас, сәндік өсімдіктерден: орхидеялар, қызғалдақтар, циклорий, драценалар, амариллис, бегония, хризантема, каланхоэ, соңғы жылдары ағаштекес өсімдіктерден де анықталған. Ол су, жел және насекомдар арқылы таралып, жоғары ылғалдылық пен температурада (71 °-тан 93°) тіршілігін жалғастыратын патоген. Ал, *Erwinia chrysanthemi* қызанақ, картоп, темекі, сәбіз, хризантема өсімдіктерінде дымқыл қоңыр немесе қара түсті жаралар тудырады. Аталмыш екі түрдің таралуы мен өсімдіктердің түрлерін зақымдау барысында біршама айырмашылық болғанымен, *16SrRNA* нуклеотидтік тізбектерінде үлкен ұқсастық бар. Кейіннен осы ұқсастықтарды ескере отырып және де 16S рДНК нуклеотидтік тізбегін талдау арқылы Samson et al. *E. chrysanthemi*-ді *Erwinia* туысынан бөліп алып, оған белгілі микробиолог 2005 жылы Dickey R.S. есімін беріп, жаңа статусқа — *Dickeya* туысына көтергені жайлы жоғарыда айтылды.

#### Қорытынды

Сонымен, Нұр-Сұлтан қаласын қоршай орналасқан жасыл белдемде өсіп тұрған қайың ағаштарында кездесетін бактериялық обырдан бөлініп алынған бактерия штамдарын культуралық-морфологиялық және молекулалық-гендік зерттеулер нәтижесінде және халықаралық Генбанктегі сәйкес түрлермен салыстыра талдау негізінде *Pectobacteriaceae* тұқымдасының *Dickeya* туысына жататын түр — *D. dadantii pv. Betulae* деп санаймыз. Оның дәлелін 2-суретте келтірілген туыстық қатынастары жақын түрлердің филогенездік шежіресінен көруге болады. Біздің түрмен (DDdd-1 *Dickeya dadantii*) бір кладтағы түрлерді (индекстік номерлері әр түрлі *Erwinia chrysanthemi*) *Dickeya dadantii*-дің синонимдері деп қарастыруға негіз жеткілікті. Себебі жоғарыда келтірілген шолудан байқасақ, иелік өсімдіктерге сәйкестенуі өте кең ауқымды бұл патогенді (*Erwinia chrysanthemi*) әр зерттеуші кезінде әр түрліше атаған. Жалпы, *Dickeya* туысы түрлер құрамы жағынан, олардың бір-бірімен туыстық жақын-алшақтықтары тұрғысында және иелік өсімдіктерінің құрамдары жағынан әлі де көп зерттеулерді қажет ететін күрделі таксон.

#### Әдебиеттер тізімі

- 1 Carter J.C. Wetwood of elms / J.C. Carter // Bull. Illinois Nat. Hist. Surv. — 1945. — P. 401–448.
- 2 Черпаков В.В. Бактериальный ожог лесных пород / В.В. Черпаков // Тез. докл. III Всесоюз. конф. по бактериальным болезням растений. — Тбилиси, 1976. — С. 195–197.
- 3 Щербин-Парфененко А.Л. Бактериальные заболевания лесных пород / А.Л. Щербин-Парфененко. — М.: Гослесбумиздат, 1963. — 148 с.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 Waldee E.L. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria / E. L. Waldee // Iowa State J. Sci. — 1945. — Vol. 19. — P. 435–484.
- 7 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.

- 8 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.
- 9 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.
- 10 Лазарев А.М. Новый возбудитель бактериоза картофеля атакует российские поля / А.М. Лазарев // Защита и карантин растений. — 2013. — № 6. — С. 11.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 Шелуха В.П. Бактериальная водянка березы и эффективность мероприятий по борьбе с ней в насаждениях зон смешанных и широколиственных лесов / В.П. Шелуха, В.А. Сидоров. — Брянск: БГИТА, 2009. — 117 с.
- 14 Черпаков В.В. Этиология бактериальной водянки древесных растений / В.В. Черпаков // Изв. СПб. лесотехн. акад. — 2017. — Вып. 220. — С. 125–139.
- 15 Collins M.D. Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. / D.M. Collins, A.B. Phillips, P. Zanoni // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1989. — Vol. 39, Iss. 4. — P. 105–108.

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

### Определение фитопатогенных бактерий, поражающих древесину березы повислой (*Betula pendula*), методом молекулярной идентификации и создание филогенетической генеалогии

В статье рассмотрены морфологические изменения березы повислой (*Betula pendula* Roth.), произрастающей в искусственных лесах «зеленого пояса», окружающих город Нур-Султан; изучены морфологические изменения, связанные с поражением бактериальным раком; получены образцы зерна из стволов больных деревьев; выращены выделенные бактериальные культуры в питательных средах; приведены их культурально-морфологические характеристики. Работа по получению зерен из ствола березы, выделению из них чистых штаммов возбудителя болезни, молекулярной идентификации нуклеотидной цепи рибосомной РНК *16S* и сопоставлению этих результатов с соответствующими данными на международной базе *Gene Bank* была проведена современными методами в области бактериологии и ботаники. Молекулярные характеристики выделенных бактериальных штаммов соответствовали 96,72 % типичного штамма *Dickeya dadantii* по данным Международного банка генов.

*Ключевые слова:* бактериальный рак, культура, штамм, бактерия, ДНК, зерно, бур, идентификация, бактериоз.

S.A. Abiyev, A.K. Baubekova, R.Z. Asilkhanova

### Detection of phytopathogenic bacteria damaging weeping birch (*Betula Pendula*) by molecular identification method and creation of phylogenetic genealogy

The article discusses the morphological changes of birch trees (*Betula pendula* Roth.) due to bacterial cancer that grow in the artificial forest «Green Belt» surrounding the city of Nur — Sultan. Kernel samples were taken from diseased tree trunks, isolated bacterial cultures were grown in nutrient medium and given cultural and morphological characteristics. Extraction of cores from diseased birch trunks, isolation of pure strains of the pathogen, molecular identification of ribosomal RNA *16S* nucleotide chains and comparison of these results with relevant data from the international database *Gene Bank* are carried out using modern methods in the field of bacteriology and botany. The molecular characteristics of the isolated bacterial strains corresponded to 96.72 % of the typical strain *Dickeya dadantii* based on the international *Gene Bank*.

*Key words:* bacterial cancer, medium, strain, bacteria, DNA, core, drill, identification, bacteriosis.

#### References

- 1 Carter, J.C. (1945). Wetwood of elms. *Bull. Illinois Nat. Hist. Surv.*, 401–448.
- 2 Cherpakov, V.V. (1976). Bakterialnyi ozhoh lesnykh porod [Bacterial forest burn]. Abstracts. *III Vsesoiuznaia konferentsiia po bakterialnym bolezniam rastenii — III All-Union Conference on Bacterial Plant Diseases*. (p. 195–197). Tbilisi [in Russian].

- 3 Shcherbin-Parfenenko, A.L. (1963). *Bakterialnye zabolevaniia lesnykh porod* [Bacterial diseases of forest species]. Moscow: Hoslesbumizdat [in Russian].
- 4 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 PHTU — PSTU Bulletin*, 6, 90 [in Russian].
- 5 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.
- 6 Waldee, E.L. (1945). Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State J. Sci.*, 19, 435–484.
- 7 Dye, D.W (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The, “amylovora” group. *New Zeal. J. Sci.*, 11, 590–607.
- 8 Dye, D.W. (1969). A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The “carotovora” group. *New Zeal. J. Sci.*, 12, 81–97.
- 9 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.
- 10 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].
- 11 Dye, D.W. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zeal. J. Agric Res.*, 21, 153–177.
- 12 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.
- 13 Shelukho, V.P., & Sidorov, V.A. (2009). *Bakterialnaia vodiianka berezy i effektivnost meropriiatii po borbe s nei v nasazhdeniakh zon smeshannykh i shirokolistvennykh lesov* [Birch Bacterial dropsy and the effectiveness of measures to combat it in plantations of mixed and deciduous forests]. Bryansk: BGITA [in Russian].
- 14 Cherpakov, V.V. (2017). Etiologhiia bakterialnoi vodiianki drevesnykh rastenii [Etiology of bacterial dropsy of woody plants]. *Izvestiia Sankt-Peterburhskoi lesotekhnicheskoi akademii — Bulletin of the St. Petersburg Forestry Technical Academy*, 220, 125–139 [in Russian].
- 15 Collins, M.D., Phillips, B.A., & Zanoni, P. (1989). Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 4, 105–108.