

УДК: 577.216.3; 577.217; 577.218

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ *ERWINIA AMYLOVORA* НА ДИКОРАСТУЩИХ И КУЛЬТУРНЫХ ЯБЛОНЕВЫХ ДЕРЕВЬЯХ РОДА *MALUS* SPP. НА ПЕРИОД 2021 ГОДА

Малахова Н.П.<sup>1</sup>, Скиба Ю.А.<sup>1,2\*</sup>, Тезекбаева Б.К.<sup>1</sup>, Хасейн А.<sup>1</sup>, Дмитриева К.Д.<sup>1</sup>, Ромашкин В.Н.<sup>1</sup>, Жармухамедова Г.А.<sup>1</sup>, Джуманова Ж.К.<sup>1</sup>, Мальцева Э.Р.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, ул. Досмухамедова, д. 86, г. Алматы, 050012, Казахстан

<sup>2</sup> Филиал Национального центра биотехнологии в г. Алматы, ул. Жахангер, д. 14, г. Алматы, 050054, Казахстан

<sup>3</sup> Общественное объединение «Тетис», 9 м-н, д. 1, оф. 72, г. Алматы, 050063, Казахстан

Автор-корреспондент: \*yuriy.skiba@gmail.com

### АБСТРАКТ

Бактериальный ожог плодовых культур, вызываемый грамотрицательной бактерией *Erwinia amylovora* - опасное карантинное заболевание плодовых и декоративных культур семейства *Rosaceae*. Для изучения ситуации по распространению бактериального ожога и своевременному выявлению угрозы заражения эндемичных видов яблони *Malus sieversii* проведено фитопатологическое обследование дикоплодовых лесов и культурных посадок яблони *Malus* spp. в Алматинской области. Собрано 263 образца с дикорастущих растений без видимых симптомов и с культурных растений, имеющих симптомы бактериального ожога – побуревшие и некротизированные молодые побеги, имеющие характерную форму «пастушьего посоха», почерневшие листья и завязи, оставшиеся на пораженных побегах, а также взяты образцы с деревьев, на которых ранее было отмечено проявление заболевания. На основе ПЦР анализа проведен скрининг всех полученных образцов, который выявил 23 положительных результата.

Фитопатологическое обследование и результаты ПЦР-тестов, позволили с высокой точностью выявить источники заражения и распространения инфекции, а также оценить актуальное состояние обследованных участков дикоплодовых лесов и находящихся поблизости яблоневых садов Алматинской области.

**Ключевые слова:** бактериальный ожог, *Erwinia amylovora*, фитопатологическое обследование, мониторинг, яблоня *Malus* spp.

### ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный ожог плодовых деревьев, является одним из наиболее опасных карантинных бактериозов плодовых и декоративных культур семейства *Rosaceae*. Заболевание вызывается грамотрицательной бактерией семейства *Enterobacteriaceae* - *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Источником инфекции являются больные растения, от которых патоген переносится на большие расстояния с каплями дождя, насекомыми, птицами и человеком. Наиболее оптимальные условия для распространения болезни возникают в весенний и осенний периоды, когда повышенная, в следствии дождей, влажность воздуха сочетается с повышенной температурой. На больных растениях усыхают и чернеют цветы, завязи, листья и побеги, выделяется бактериальный экссудат и происходит характерное скручивание побегов в виде «пастушьего посоха». Бактериальным ожогом могут поражаться все органы растения от корневой системы до плодов. Тяжелая форма заболевания может быстро привести к полной гибели растения [1].

Это заболевание, изначально выявленное на яблонях в Северной Америке, в начале прошлого века было обнаружено в Новой Зеландии, после чего достаточно быстро распространилось практически на все страны Европы. За последние 20 лет бактериальный ожог был обнаружен в 13 регионах Российской Федерации [2], на территории Кавказского региона [3] и в Центральной Азии на территориях Казахстана и Кыргызстана [4, 5].

Бактериальный ожог поражает более 180 видов из 39 родов семейства *Rosaceae*, включая различные виды

и сорта яблонь и груш, а также ряд важных плодовых и косточковых культур, таких как айва, рябина, вишня и другие. В связи с этим *E. amylovora* представляет собой серьезную глобальную угрозу коммерческому производству этих культур во всем мире. На сегодняшний день это заболевание считается одним из наиболее опасных карантинных заболеваний, которое в идеальных условиях может уничтожить молодой яблоневый или грушевый сад, или целый питомник за один сезон [6].

Наряду с культурными видами семечковых и косточковых плодовых деревьев возбудитель бактериального ожога *E. amylovora* может также поражать и некоторые виды дикорастущих представителей семейства *Rosaceae*, которые в этом случае могут являться резервуаром инфекции и звеном в ее дальнейшей передаче. Для Казахстана, где дикие яблони (*Malus* spp.) и груши (*Pyrus* spp.) являются доминирующими лесными видами в горных районах на средних высотах, данное бактериальное заболевание представляет особую опасность, так как может привести к критическому сокращению ареала произрастания наиболее ценной дикорастущей яблони Сиверса (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem). *M. sieversii* - особый вид дикой яблони, произрастающий на территории гор Средней Азии и Казахстана. Яблоня Сиверса является эндемиком и главным прародителем многих культурных сортов яблони во всем мире в связи с чем, сохранение ее ценного генофонда является важнейшей национальной задачей [7, 8, 9].

На территории Казахстана зараженные бактериальным ожогом деревья были впервые обнаружены в садах в 2010 году после массового импорта и посадки коммерческих

сортов из Европы и Северной Америки [4].

Для борьбы с этим заболеванием в развитых странах в настоящее время используют различные подходы: применяют различные фитосанитарные меры на основе комплексных программ обработки садов и окрестных территорий, проводят своевременную обработку соответствующими дозами химических и биологических средств лечения и защиты, используют новые, относительно устойчивые к заболеванию сорта. Однако, все эти меры не позволяют полностью предотвратить распространение инфекции [10].

Для разработки новых методов сдерживания и контроля распространения бактериального ожога учеными разных стран проводятся интенсивные научные исследования в области филогении, геномного анализа, биологии и эпидемиологии возбудителя заболевания бактерии *E. amylovora* [11]. Кроме того, активно развиваются научные направления, связанные с ранним выявлением и мониторингом распространения патогенов в экосистемах [4], разработкой новых технологических подходов, направленных на снижение восприимчивости растений-хозяев к инфекции [12], поиском новых сочетаний различных химических средств защиты растений, в том числе медьсодержащих препаратов, биофунгицидов, иммуномодуляторов и антибиотиков для борьбы с *E. amylovora* [13, 14]. Особое место занимают исследования по выведению новых толерантных или устойчивых сортов на основе генетического картирования генов устойчивости к патогену [15].

На сегодняшний день наиболее эффективным подходом к контролю за распространением заболевания является использование диагностических тестов для выявления и мониторинга разнообразия штаммов *E. amylovora* [2, 16].

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *E. amylovora* предоставляет возможность оценить их генетическое разнообразие, выявить источник заражения, оценить пути их распространения.

В связи сокращением ареала распространения и генофонда *M. sieversii* на территории Тянь-Шаня, своевременное выявление и идентификация возбудителя бактериального ожога в дикоплодовых лесах Казахстана имеет особое важное научное и стратегическое значение [9].

Целью данного исследования являлось изучение фитопатологической ситуации по бактериальному ожогу в дикорастущих и культурных яблоневых садах Алмагинской области, а также подтверждение наличия возбудителя данного заболевания в собранном биоматериале методами на основе ПЦР.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мониторинг многолетних плодовых насаждений в хозяйствах Алмагинской области, а также дикоплодовых лесов яблони Сиверса проводили дважды - в июне и августе 2021г. путем обследования и установления распространения и степени развития болезни соответственно методическим указаниям [17, 18].

Фитопатологическая оценка деревьев на поражаемость бактериальным ожогом проводилась по двум диагоналям

сада с четырех сторон кроны. В каждом саду осматривали не менее 10 - 20 деревьев.

Учет поражаемости плодовых культур производился по 6 – балльной шкале, модифицированной нами с учетом особенностей бактериального ожога: 0 – здоровое дерево; 0,1 – еле заметные признаки болезни; 1 – начальная степень проявления болезни (заметны единичное увядание и почернение цветков, скручивание и побурение побегов и листьев); 2 – пораженных цветков, побегов и листьев более 10%; 3 – поражение коры ветвей, стволов, плодов (на пораженных участках выделяется бактериальный экссудат); 4 – более 75% кроны поражены ожогом, деревья стоят как после пожара; 5 – погибшее от болезни дерево.

Процент распространения (частота встречаемости) болезни рассчитывали по формуле (1).

$$P = (H \times 100) : N \quad (1)$$

где P – распространенность или частота встречаемости болезни, %; H – количество больных деревьев; N – количество обследованных деревьев.

Степень развития болезни определяется по формуле (2).

$$R = (\Sigma (a \times b) \times 100) : NK \quad (2)$$

где R – степень развития болезни, %;  $\Sigma$  – сумма произведений, а и б; а – число деревьев с одинаковыми признаками развития болезни; б – соответствующий этому признаку балл поражения; N – количество учетных деревьев; K – высший балл поражения шкалы.

При проведении обследований выявляли круг поражаемых ожогом растений семейства розоцветных – яблоня, боярышник, груша, барбарис, с целью установления специализации патогенов в естественных условиях.

Отбор образцов для лабораторного исследования. При обследовании для лабораторных анализов отбирали образцы с типичными для бактериального ожога симптомами с соблюдением всех требований антисептики. С каждого больного дерева отбирали по 3 - 4 пробы, содержащие пораженные ткани и органы растений, а также бессимптомные образцы согласно Диагностическому протоколу 13 (*E. amylovora*) Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН [19]. При отборе проб вырезали пораженные части растений с захватом здоровой ткани. Один образец состоял из различных частей растений, собранных с одного дерева. Каждый образец включал соцветия, завязь, листья, плоды, молодые побеги. Отбранные образцы помещали в пакеты из крафт-бумаги вместе с этикеткой, где указывались: регион, хозяйство, культура, сорт, возраст, площадь, дата отбора образца.

Для исключения ложноотрицательных результатов ПЦР и ПЦР в реальном времени проводили на образцах, обработанных и выделенных с обогащением, как рекомендовано в Диагностическом протоколе 13 (*E. amylovora*) Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН для бессимптомных образцов, а также для образцов с низкой концентрацией клеток *E. amylovora* [19].

Образцы тканей помещали в 100-мл колбы с 50 мл фосфатно-солевого буфера (NaCl - 8г; KCl - 0,2г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O - 2,9 г; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,2г; дистиллированная вода, 1 л) и смывали клетки бактерий интенсивным пере-

мешиванием в течение одного часа. Полученные смывы осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 1 мл и делили на две части, одну из которых смешивали с 30% глицерином и помещали на длительное хранение при  $-80^{\circ}\text{C}$ , другую же использовали для молекулярно-генетического анализа и получения чистых культур бактерий. Для обогащения культур 50 мкл. смыва помещали в 1 мл жидкой среды Кинга Б (на 1 литр среды: 20 г пептона; 10 мл глицерина; 1,5 г -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 г -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,0–7,2) на 48 часов при  $25^{\circ}\text{C}$  без встряхивания.

Получение чистых культур проводили посевом полученных смывов петлей на твердые питательные среды Кинга Б (на 1 литр среды: 20 г пептона; 10 мл глицерина; 1,5 г -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 г -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 15 г - агара; pH 7,0 – 7,2) и левановую (на 1 л среды: 2 г дрожжевого экстракта; 5 г пептона бактериологического; 5 г NaCl; 50 г сахарозы; 20 г агара; pH 7,0 – 7,2). Чашки инкубировали при  $25^{\circ}\text{C}$  в течение 72 часов.

Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью реагента PrepMan™ Ultra (ThermoFisher Scientific): к 50 мкл. культуры, обогащенной в жидкой среде Кинга, прибавляли 50 мкл. реагента, прогревали при  $+95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут, затем осаждали центрифугированием при  $5,000 \times g$  в течение 5 минут и отбирали 50 мкл надосадочной жидкости в новые пробирки для постановки полимеразной цепной реакции и дальнейшего хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Молекулярно-биологический анализ собранных проб проводили методом классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени по протоколу Stöger, A. at all. [20] и Piric M., Ravnikar M. at all. [21]. В качестве положительного контроля использовался образец ДНК стандартного штамма CFBR 3098, любезно предоставленный коллегами из Института Наук Природных Ресурсов, Цюрихский университет прикладных наук (Institute of Natural Resource Sciences, Zürich University of Applied Sciences).

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1x TAE-буфере (Трис, уксусная кислота, ЭДТА) (ThermoFisher Scientific) проводили в 1,5% агарозном геле, содержащем 0,2 мг/мл бромистого этидия (Sigma).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фитопатологическое обследование проводилось на востоке Алмагинской области в окрестностях города Сарканд и Жонгар-Алатауского государственного националь-

**Таблица 1.** Пораженность культурных и дикоплодовых растений бактериальным ожогом в Саркандском районе Алмагинской области

Наименование населенного пункта	Культура	Сорт	Площадь	Индекс болезни, %	
				P	R
г. Сарканд (сад при городской больнице)	Яблоня	Апорт	0,5 га	4,0	3,2
г. Сарканд (сад при училище)	Яблоня	Разные сорта	0,7 га	2,5	1,6
г. Сарканд	Яблоня	Апорт	2,5	3,7	1,5
г. Сарканд	Яблоня	Апорт	0,8	3,0	2,0

ного парка (июнь 2021 года) и в окрестностях города Алматы и Иле-Алатауского национального парка (август 2021 года). В обеих особо охраняемых природных территориях произрастают дикие леса яблони Сиверса, а также присутствуют культурные посадки яблони. Погодные условия Алмагинской области 2021 года, в целом, неблагоприятно сказались на вегетации и формировании урожая плодовых культур, а также на распространении и развитии болезней, в частности бактериального ожога. В отличие от средних многолетних показателей в начале весны 2021 г. погода была прохладной, наблюдались ночные заморозки. В апреле и мае установилась теплая погода с превышением средней температуры воздуха многолетней нормы на 2 -  $4^{\circ}\text{C}$ . Влажность воздуха в среднем составила в апреле 56%, в мае - 50%. Лето было сухим и жарким. Среднесуточная температура летних месяцев превышала средние многолетние значения на 2 -  $7^{\circ}\text{C}$ . Влажность воздуха составила в июле 41%, в августе - 40%. В сентябре также отмечались засушливые условия - сумма осадков составила 42 мм, а влажность воздуха - 43%.

При визуальном обследовании в Иле-Алатауском и Жонгарском Государственных национальных природных парках (ГНПП) симптомы бактериального ожога на деревьях дикой яблони, боярышнике, барбарисе не были обнаружены. Тем не менее, для дальнейшей идентификации патогена в лаборатории были отобраны бессимптомные образцы.

В Саркандском районе Алмагинской области были обследованы и отобраны образцы с деревьев культурных сортов яблони из хозяйств, частных садов и подворьев в поселке Екиаша и городе Сарканд на расстоянии 20-45 км от границ ГНПП Жонгар-Алатау и в самом ГНПП (кордон «Осиновое»). Также осматривались и отбирались образцы с культурных яблонь, яблони Сиверса и боярышника кровавого, растущих вдоль шоссе.

Признаки, не исключающие бактериальный ожог - побуревшие и некротизированные молодые побеги, имеющие характерную форму «пастушьего посоха», почерневшие листья и завязи, оставшиеся на пораженных побегах, были обнаружены на отдельных яблоневых деревьях в саду при городской больнице, при училище и в частных подворьях города Сарканд (таблица 1).

В поселке Екиаша (12 км от границ ГНПП) также были обнаружены единичные симптомы, похожие на симптомы бактериального ожога на яблоне и груше в приусадебных участках (таблица 1).

г. Сарканд (частное подворье)	Яблоня	неизвестен	0,2		
Пос. Екиаша (частное подворье)	Яблоня	неизвестен	0,1	0	0
Пос. Екиаша (частное подворье)	Груша	Талгарская красавица	0,2	0,7	0,5
Пос. Екиаша	Яблоня	неизвестен	0,3	0	0
Пос. Екиаша	Яблоня	Зимняя лимонка	0,2	0	0
Кордон «Осиновое» Высота н.у.м. 1230 м	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Кордон «Осиновое» Выс. н.у.м.1210 м	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Кордон «Осиновое» Высота н.у.м. 1180 м	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Кордон «Осиновое» Высота н.у.м. 1180 м	Боярышник	-	-	0	0
Кордон «Осиновое» Высота н.у.м. 1180 м	Боярышник	-	-	0	0
Кордон «Осиновое» Высота н.у.м. 1200 м	Боярышник	-	-	0	0

В юго-восточной части Алматинской области риск для заноса бактериального ожога в зону произрастания диких садов яблони Сиверса увеличен в связи с активной высадкой культурных промышленных садов, а также обилием посадок яблонь и груш, проводимой в частных подворьях. В связи с этим в 2021 году на территории Иле-Алатауского ГНПП были обследованы культурные яблоневые деревья и другие представители семейства *Rosaceae*. Образцы для исследования были также взяты из прилегающих к Иле-Алатаускому ГНПП хозяйств, частных садов и подворьев.

На обследованных яблонях Сиверса признаков бактериального ожога обнаружено не было. Однако признаки, идентичные бактериальному ожогу, были обнаружены на отдельных деревьях в частных подворьях/дачах вне пределов ГНПП (таблица 2).

**Таблица 2.** Пораженность культурных и дикоплодовых растений бактериальным ожогом в окрестностях Иле-Алатауского ГНПП

Наименование территории/ участка (если известно)	Культура	Сорт	Площадь	Индекс болезни, %	
				P	R
Аксайский филиал (высота 1376 м над уровнем моря – н.у.м.)	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Высота 1376 м н.у.м.	Боярышник	-	-	0	0
Высота 1376 м н.у.м.	Барбарис	-	-	0	0
Частное подворье, 1100 м н.у.м.	Груша	Талгарская красавица	0,02	3,4	0,9
Частное подворье, 1100 м н.у.м.	Яблоня	Семиренко	0,02	2,0	0,7
Медеевский филиал (высота 1553 м н.у.м.)	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Частное подворье, 1500 м н.у.м.	Яблоня	Апорт	0,01	1,0	0,3

Всего в ходе обследования собрано 263 образца растений: соцветия, побеги, ветви, листья, плоды с симптомами, либо бессимптомные образцы для лабораторного выявления *E. amylovora*. Часть биоматериала была собрана и проанализирована при поддержке проекта «Сохранение центрально-азиатских дикоплодовых лесных экосистем, разновидностей семечковых пород и гермоплазмы в связи с недавней эпифитотией, вызванной инвазивным бактериальным патогеном *E. amylovora* (бактериальный ожог)», выполняемого научным обществом «Тетис» в сотрудничестве с партнерами из Кыргызстана, Таджикистана и Швейцарии.

Из собранных образцов яблони Сиверса составила 55 образцов, культурная яблоня – 130 образцов, груша – 41, боярышник – 25, и барбарис составил 12 образцов соответственно.

Маловодненский филиал (высота н.у.м. – 1430 м)	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Высота 1300 м н.у.м.	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Высота 1300 м н.у.м.	Боярышник	Алматин- ский	-	0	0
Высота 1200 м н.у.м.	Яблоня Сиверса	-	-	0	0
Частное подворье (высота 1100 м н.у.м.)	Яблоня	Апорт	0,1	3,5	1,2
Талгарский филиал (Котыр-булак), высота над у.м. 1420 м	Яблоня Сиверса		0	0	0
Высота 1140 м н.у.м.	Яблоня	Апорт	0,5	1,2	0,8
Высота н.у.м. 1420 м	Боярышник		0	0	0
Высота н.у.м. 1420 м	Барбарис		0	0	0

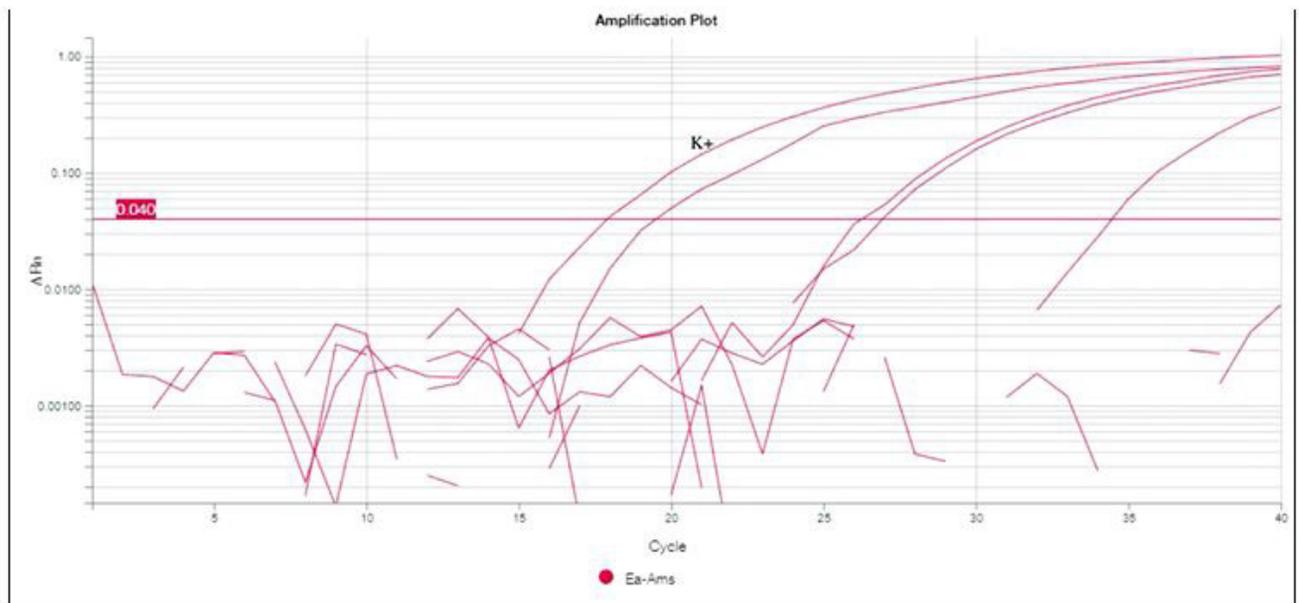


Рисунок 1. Пример результатов ПЦР в реальном времени с праймерами Ams116F/Ams141T [21]

Проведенный по стандартному международному протоколу ПЦР анализ в реальном времени с праймерами Ams116F/Ams141T [21] всех 263 образцов выявил 23 образца с различными пороговыми значениями (рисунок 1).

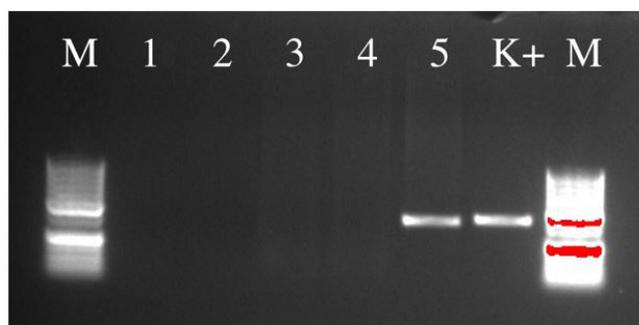
Параллельно с ПЦР в реальном времени образцы проверяли с помощью классической ПЦР с праймерами Reant1F/2R (рисунок 2) [20].

Данный анализ не подтвердил положительные образцы с пороговым значением больше 35 ( $Ct > 35$ ), которые были в результате признаны сомнительными, а также некоторые образцы с пороговым значением меньше 35 ( $Ct < 35$ ). Принимая во внимание, что последовательности-мишени для данных праймеров находятся в плазмиде pEA29 и в редких случаях данная плаزمид может отсутствовать у конкретного штамма *E. amylovora*. В связи с этим все образцы, показавшие положительный результат как минимум на одном из проведенных анализов, были использованы для получения чистых культур из соответ-

ствующих смывов (Рисунок 3).

Выделение чистых культур, отбор и проверка колоний на их принадлежность *E. amylovora* проводили основываясь на результатах, полученных несколькими методами одновременно, включая инокуляцию органов растений-хозяев возбудителя либо идентификацию на питательной среде в соответствии с требованиями согласно диагностическому протоколу для регулируемых вредных организмов [19]. Проведение идентификации несколькими методами необходимо для отделения других видов *Erwinia*, такие как *E. piriflorinigrans* [22], *E. pyrifoliae* [23], *E. uzenensis* [24], и другие *Erwinia spp.* [25 - 27], которые по своим морфологическим, серологическим и молекулярным характеристикам сходны с *E. amylovora* и также проявляются аналогичными симптомами у восприимчивых растений.

В ходе данного исследования были получены результаты фитопатологического обследования на наличие забо-



Обозначения: М – маркер молекулярного веса с шагом 50 пн (Thermo Scientific, SM0371), К+ - положительный контроль (соответствует 391 пн), 1-4 – пример отрицательного результата ПЦР, 5 – пример положительного результата ПЦР анализа полевого образца.

**Рисунок 2.** Пример электрофоретического анализа в агарозном геле продуктов классической ПЦР с праймерами Peant1F/2R [20]

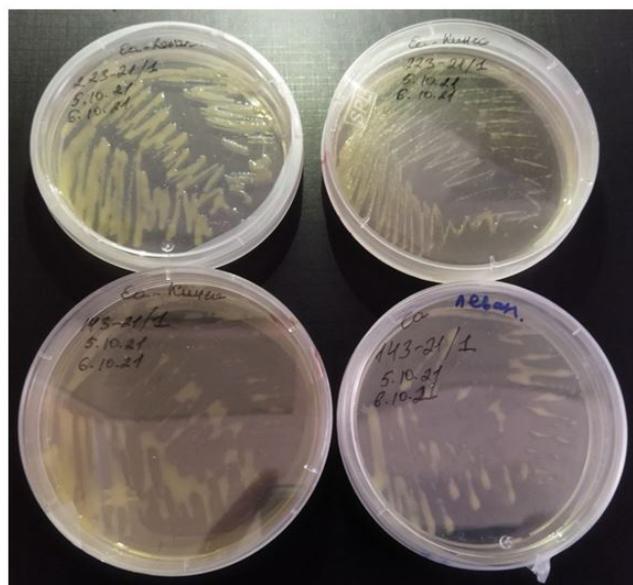
левания бактериального ожога у дикорастущих и культурных яблонь, а также других представителей розоцветных – груша, боярышник, барбарис, представленных в Алмагинской области. На основе полученных результатов установлено, что на обследованных территориях у дикорастущих представителей *M. sieversii* и других семейств розоцветных бактериальный ожог отсутствует, что также подтверждается результатами, полученными в ходе ПЦР анализа. При этом, все положительные данные по фитопатологическим тестам и ПЦР - идентификации возбудителя бактериального ожога – 23 положительных образца, были получены только для деревьев культурных сортов яблони.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе проведенных исследований осуществлено фитопатологическое обследование дикорастущих лесов *M. sieversii* и культурных посадок яблони *Malus spp.*, а также других соседствующих представителей семейства *Rosaceae* в Алмагинской области. Всего проанализировано 263 растительных образца с симптомами и без явных симптомов бактериального ожога, взятых от культурных и дикорастущих розоцветных, включая деревья *M. sieversii*. Проведен бактериологический и ПЦР анализ всех представленных образцов, из которых только 23 оказались положительными в обоих видах исследования. Все позитивные образцы принадлежат культурным сортам яблонь и груш, взятых с территорий, соседствующих с дикоплодовыми лесами *M. sieversii*.

Исходя из полученных в исследовании результатов, установлено, что на данный момент бактериальный ожог на обследованных участках дикоплодовых лесов Алмагинской области не выявлен, тогда как соседствующие с ними культурные посадки яблонь и груш могут служить источником для быстрого распространения инфекции и требуют срочного принятия санитарных мер с учетом климатических и метеорологических условий региона.

На основе полученных данных в дальнейшем будут разработаны практические рекомендации и карты рисков для уменьшения угрозы заражения и предотвращения распространения бактериального ожога среди деревьев *M. sieversii* и других эндемичных растений семейства *Rosaceae*, произрастающих в опасной близости к выявленным очагам ин-



**Рисунок 3.** Получение чистых культур из смывов плодовых деревьев, показавших положительный результат с применением реал-тайм ПЦР.

фекции.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проводились в рамках программы ИРН OR11465447 «Разработка высокочувствительных молекулярно-биологических, биохимических тестов детекции патогенов, влияющих на потребительские качества конечного продукта, на основе мониторинга возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур» по программно-целевому финансированию МОН РК на 2021- 2022 гг. по заданию «Мониторинг штаммов *Erwinia amylovora*, распространенных на дикорастущих и культурных яблоневых деревьях рода *Malus spp.*, и разработка практических рекомендаций для предотвращения распространения бактериального ожога среди эндемичных растений семейства *Rosacea* (розоцветные)».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bulletin OEPP/EPP Bulletin – 2013. – Vol. 43. №1. - P. 21-45.
2. Drenova, N.V., Kharchenko, A.A., Kuznetsova, A.A., Balandina, M.B., Erohova, M.D., Kulakova, J.Y., Kvashnina, N.A., Shneider, E.Y., Koniajeva, O.N. // Distribution, characteristics and diagnostic methods for Fire Blight (*Erwinia amylovora*) in the Russian Federation // J. Acta Hort. – 2014. - №1056. - P. 65-70. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.7.
3. Gaganidze, D., Sadunishvili, T., Aznarashvili, M., Abashidze, E., Gurielidze, M., Carnal, S., et al. // Fire blight distribution in Georgia and characterization of selected *Erwinia amylovora* isolates // J. Plant Pathology. - 2021. - №103(S1). - P. 121-30. DOI: 10.1007/s42161-020-00700-5.
4. Djaimurzina, A., Umiralieva, Z., Zharmukhamedova, G., Born, Y., Buhlmann, A., Rezzonico, F. // Detection of the Causative Agent of Fire Blight – *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. – in the Southeast of Kazakhstan // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.129-132. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.18.

5. Doolotkeldieva, T., Bobushova, S., Carnal, S., Rezzonico, F. // Genetic characterization of *Erwinia amylovora* isolates detected in the wild walnut-fruit forest of South Kyrgyzstan // J. Plant Pathology. - 2021. - №103(S1). - P. 109-20. DOI: 10.1007/s421 61-021-00752-1.
6. Marin, F. C., Călinescu, M., Sumedrea, M., Chițu, E., Florea, A., Militaru, M., Sumedrea, D. // Behavior of some apple varieties grown under superintensive system to fire blight (*Erwinia amylovora*) attack // Fruit Growing Research. - 2018. - №34. - P. 94-105. DOI 10.33045/fgr.v34.2018.18.
7. Zhou, Z. Q., Li, Y. N. // The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple // Genet. Res. Crop. Evol. - 2000. - №47. - P.353-357. DOI: 10.1023/A:1008740819941.
8. YH, Oh SH, Lee SR. // Genetic Admixture in the Population of Wild Apple (*Malus Sieversii*) from the Tien Shan Mountains, Kazakhstan. Genes (Basel). 2021. - №12(1):104. Published 2021 Jan 15. doi:10.3390/genes12010104.
9. Алемсейтова, Ж. К., Куанышбаева, М. Г., Сапарова, Г.С., Полевик, В.В. // Распространение яблони Си-верса на территории государственного Национального природного парка «Тарбагатай» // Глобус. - 2021. - Том 7. - №7(64). - С. 3-9.
10. Smith, T.J. // Fire blight: barriers to control in the past and present/future control strategies // J. Acta Hort. - 2014. - №.1056. - P.29-38. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.1.
11. Kurz, M., Carnal, S., Dafny-Yelin, M., Mairesse, O., Gottsberger, R.A., Ivanović, M., Grahovac, M., Lagonenko, A.L., Drenova, N., Zharmukhamedova, G., Doolotkeldieva, T., Smits, T.H.M., Rezzonico, F. // Tracking the dissemination of *Erwinia amylovora* in the Eurasian continent using a PCR targeted on the duplication of a single CRISPR spacer // Phytopathology Research. - 2021. - № 3(18), DOI:10.1186/s42483-021-00096-9.
12. Schoofs, H., Deckers, T., Verjans, W., Bylemans, D. // Fire blight control strategy in Belgium // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.57-64, DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.6.
13. Stockwell, V.O. // Overview of concerns surrounding antibiotic use for control of Fire Blight // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.39-42, DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1056.2.
14. Svircev, A.M., Boyetchko, S.M., Castle, A.J. // The biopesticide innovation chain: a template for development of microbial agents from discovery to registration // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.43-46, DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1056.3.
15. Peil, A., Wöhner, T., Hanke, M.-V., Flachowsky, H., Richter, K., Wensing, A., Emeriewen, O., Malnoy, M., LeRoux, P.-M., Patocchi, A., Kilian, A. // Comparative mapping of fire blight resistance in malus // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.47-51, DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1056.4.
16. Malnoy, M., Martens, S., Norelli, J.L., Barny, M., Sundin, G.W., Smits, T.H.M., Duffy, B. // Fire Blight: Applied Genomic Insights of the Pathogen and Host // Annual Review of Phytopathology. - 2012. - Vol. 50. - Issue 1. - P. 475-494, DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172931.
17. Матвеева, Е.В., Семигонова, Е.С., Пехтерева, Э.Ш., Пивина, А.П. // Основные методы диагностики фитопатогенных бактерий // Методические указания. - 1990. - С. 50.
18. Бактериальный ожог плодовых культур *Erwinia amylovora* (Burrill.) Winslow et al. // Методы выявления и идентификации. - 2009. - С.35-42.
19. ДП13: *Erwinia amylovora* // МСФМ 27 Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. - 2018. - С. 32.
20. Stöger, A., Schaffer, J., Ruppitsch, W. // A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction // Journal of Phytopathology. - 2006. - Vol.154. - P. 469-473, DOI:10.1111/j.1439-0434.2006.01130.x.
21. Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J., Dreo, J. // Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA // Plant Pathology. - 2009. - Vol. 58. - P.872-881, DOI:10.1111/j.1365-3059.2009.02083.x.
22. López, M.M., Roselló, M.M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R., Gardan, L. // *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms // International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. - 2011. - Vol. 61. - P.561-567, DOI: 10.1099/ijs.0.020479-0.
23. Kim, W.S., Gardan, L., Rhim, S.L., Geider, K. // *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // International Journal of Systemic Bacteriology. - 1999. - Vol. 49. - P. 899-906, DOI: 10.1099/00207713-49-2-899.
24. Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K., Sawada, H. // *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.) // International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. - 2012. - Vol. 62. - Issue 8. - P. 1799-1803, DOI:10.1099/ijs.0.032011-0.
25. Kim, W.S., Hildebrand, M., Jock, S., Geider, K. // Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* // Microbiology. - 2001. - Vol. 147. - P. 2951-2959, DOI:10.1099/00221287-147-11-2951.
26. Kim, W.S., Jock, S., Rhim, S-L., Geider, K. // Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen // Plant Disease. - 2001. - Vol. 85. - P.1183-1188. DOI:10.1094/PDIS.2001.85.11.1183.
27. Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P., López, M.M. // *Erwinia* spp. from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and nonpathogenic species // Trees. - 2012. - Vol. 26. - P. 13-29, DOI: 10.1007/s00468-011-0644-9.

## REFERENCES

1. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin – 2013. – Vol. 43. №1. - P. 21-45.
2. Drenova, N.V., Kharchenko, A.A., Kuznetsova, A.A., Balandina, M.B., Erohova, M.D., Kulakova, J.Y., Kvashnina, N.A., Shneider, E.Y., Konajeva, O.N. // Distribution,

- characteristics and diagnostic methods for Fire Blight (*Erwinia amylovora*) in the Russian Federation // J. Acta Hort. – 2014. - №1056. - P. 65-70. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.7.
3. Gaganidze, D., Sadunishvili, T., Aznarashvili, M., Abashidze, E., Gurielidze, M., Carnal, S., et al. // Fire blight distribution in Georgia and characterization of selected *Erwinia amylovora* isolates // J. Plant Pathology. - 2021. - №103(S1). - P. 121-30. DOI: 10.1007/s42161-020-00700-5.
  4. Djaimurzina, A., Umiraliyeva, Z., Zharmukhamedova, G., Born, Y., Buhlmann, A., Rezzonico, F. // Detection of the Causative Agent of Fire Blight – *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. – in the Southeast of Kazakhstan // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.129-132. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.18.
  5. Doolotkeldieva, T., Bobushova, S., Carnal, S., Rezzonico, F. // Genetic characterization of *Erwinia amylovora* isolates detected in the wild walnut-fruit forest of South Kyrgyzstan // J. Plant Pathology. - 2021. - №103(S1). - P. 109-20. DOI: 10.1007/s421 61-021-00752-1.
  6. Marin, F. C., Călinescu, M., Sumedrea, M., Chițu, E., Florea, A., Militaru, M., Sumedrea, D. // Behavior of some apple varieties grown under superintensive system to fire blight (*Erwinia amylovora*) attack // Fruit Growing Research. - 2018. - №34. - P. 94-105. DOI 10.33045/fgr.v34.2018.18.
  7. Zhou, Z. Q., Li, Y. N. // The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple // Genet. Res. Crop. Evol. - 2000. - №47. - P.353-357. DOI: 10.1023/A:1008740819941.
  8. YH, Oh SH, Lee SR. // Genetic Admixture in the Population of Wild Apple (*Malus Sieversii*) from the Tien Shan Mountains, Kazakhstan. Genes (Basel). 2021. - №12(1):104. Published 2021 Jan 15. doi:10.3390/genes12010104.
  9. Alemsejtova, Zh. K., Kuanyshbaeva, M. G., Saparova, G.S., Polevik, V.V. // Rasprostranenie jabloni Siversa na territorii gosudarstvennogo Nacional'nogo prirodnogo parka «Tarbagataj» // Globus [Distribution of the Sievers apple tree on the territory of the state natural park «Tarbagatai». Globus]. - 2021. - Tom 7. - №7(64). - S. 3-9.
  10. Smith, T.J. // Fire blight: barriers to control in the past and present/future control strategies // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.29-38. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.1.
  11. Kurz, M., Carnal, S., Dafny-Yelin, M., Mairesse, O., Gottsberger, R.A., Ivanović, M., Grahovac, M., Lagonenko, A.L., Drenova, N., Zharmukhamedova, G., Doolotkeldieva, T., Smits, T.H.M., Rezzonico, F. // Tracking the dissemination of *Erwinia amylovora* in the Eurasian continent using a PCR targeted on the duplication of a single CRISPR spacer // Phytopathology Research. - 2021. - № 3(18), DOI:10.1186/s42483-021-00096-9.
  12. Schoofs, H., Deckers, T., Verjans, W., Bylemans, D. // Fire blight control strategy in Belgium // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.57-64, DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.6.
  13. Stockwell, V.O. // Overview of concerns surrounding antibiotic use for control of Fire Blight // J. Acta Hort. – 2014. - №1056. - P.39-42, DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1056.2.
  14. Svircev, A.M., Boyetchko, S.M., Castle, A.J. // The biopesticide innovation chain: a template for development of microbial agents from discovery to registration // J. Acta Hort. – 2014. - №1056. - P.43-46, DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1056.3.
  15. Peil, A., Wöhner, T., Hanke, M.-V., Flachowsky, H., Richter, K., Wensing, A., Emeriewen, O., Malnoy, M., LeRoux, P.-M., Patocchi, A., Kilian, A. // Comparative mapping of fire blight resistance in malus // J. Acta Hort. - 2014. - №1056. - P.47-51, DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1056.4.
  16. Malnoy, M., Martens, S., Norelli, J.L., Barny, M., Sundin, G.W., Smits, T.H.M., Duffy, B. // Fire Blight: Applied Genomic Insights of the Pathogen and Host // Annual Review of Phytopathology. – 2012. - Vol. 50. - Issue 1. - P. 475-494, DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172931.
  17. Matveeva, E.V., Semigonova, E.S., Pekhtereva, E.Sh., Pivina, A.P. // Osnovnye metody diagnostiki fitopatogennykh bakteriy // Metodycheskiye ukazaniya [Basic methods for diagnosing of phytopathogenic bacteria. Methodical instructions]. - Moscow. - 1990. - S. 50.
  18. Bacterialniy ozhog plodovyykh kultur *Erwinia amylovora* (Burrill.) Winslow et al. // Metody vyavleniya i identifikatsiy [Bacterial burn of fruit crops *Erwinia amylovora* (Burrill.) Winslow et al. Methods for detection and identification] - Moscow. - 2009. - S.35-42.
  19. DP13: *Erwinia amylovora* // MSFM 27 Diagnosticheskiye protokoly dlya reguliruemyykh vrednykh organizmov [International Standards for Phytosanitary Measures 27 Diagnostic protocols for regulated pests]. - 2018. - S. 32.
  20. Stöger, A., Schaffer, J., Ruppitsch, W. // A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction // Journal of Phytopathology. - 2006. - Vol.154. - P. 469-473, DOI:10.1111/j.1439-0434.2006.01130.x.
  21. Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J., Dreo, J. // Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA // Plant Pathology. - 2009. - Vol. 58. - P.872-881, DOI:10.1111/j.1365-3059.2009.02083.x.
  22. López, M.M., Roselló, M.M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R., Gardan, L. // *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms // International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. - 2011. - Vol. 61. - P.561-567, DOI: 10.1099/ij.s.0.020479-0.
  23. Kim, W.S., Gardan, L., Rhim, S.L., Geider, K. // *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // International Journal of Systemic Bacteriology. – 1999. - Vol. 49. - P. 899-906, DOI: 10.1099/00207713-49-2-899.
  24. Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K., Sawada, H. // *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.) // International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. - 2012. - Vol. 62. - Issue 8. - P. 1799-1803, DOI:10.1099/ij.s.0.032011-0.

25. Kim, W.S., Hildebrand, M., Jock, S., Geider, K. // Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* // *Microbiology*. - 2001. - Vol. 147. - P. 2951-2959, DOI:10.1099/00221287-147-11-2951.
26. Kim, W.S., Jock, S., Rhim, S-L., Geider, K. // Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen // *Plant Disease*. - 2001. - Vol. 85. - P.1183-1188. DOI:10.1094/PDIS.2001.85.11.1183.
27. Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P., López, M.M. // *Erwinia spp.* from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and nonpathogenic species // *Trees*. - 2012. - Vol. 26. - P. 13-29, DOI: 10.1007/s00468-011-0644-9.

2021 ЖЫЛҒЫ КЕЗЕҢДЕГІ *MALUS* SPP. ТҰҚЫМДАСЫНЫҢ ЖАБАЙЫ ЖӘНЕ МӘДЕНИ АЛМА АҒАШТАРЫНДА *ERWINIA AMYLOVORA*-НЫҢ ТАРАЛУЫ

Малахова Н.П.<sup>1</sup>, Скиба Ю.А.<sup>1,2\*</sup>, Тезекбаева Б.К.<sup>1</sup>, Хасейн А.<sup>1</sup>, Дмитриева К.Д.<sup>1</sup>, Ромашкин В.Н.<sup>1</sup>, Жармухамедова Г.А.<sup>1</sup>, Джуманова Ж.К.<sup>1</sup>, Мальцева Э.Р.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> М.А.Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Досмұхамедов көш., 86 үй, Алматы қ., 050012, Қазақстан

<sup>2</sup> Ұлттық Биотехнология Орталығы Алматы қ. Филиалы, Жахангер көш., 14 үй, Алматы қ., 050054, Қазақстан

<sup>3</sup> «Тетис» қоғамдық бірлестігі, 9 ықшамауданы, 1 үй, 72 офис, Алматы қ., 050063, Қазақстан

Корреспондент автор\*: yuriy.skiba@gmail.com

## ТҮЙІН

*Erwinia amylovora* бактериясы тудыратын жеміс дақылдарының бактериалды күйігі – Розагүлділер тұқымдасының жеміс-жидек және декоративті дақылдарының қауіпті карантиндік ауруы. Алматы облысында бактериялық күйіктің таралу жағдайын зерттеу және *Malus sieversii* алма ағашының эндемиялық түрлерінің жұқтыру қаупін уақтылы анықтау үшін жабайы жеміс ормандары мен *Malus spp.* алма ағашының мәдени екпелеріне фитопатологиялық сараптама жүргізілді. Көрінетін белгілері жоқ жабайы өсімдіктерден және бактериялық күйік белгілері бар мәдени өсімдіктерден – қоңыр және некрозға ұшыраған, «қойшы иірімдеріне» тән пішіні бар жас өркендерден, қара жапырақтар мен зақымдалған өркендерде қалған аналық бездерден 263 үлгілер алынды, сондай-ақ үлгілер бұрын аурудың көрінісі байқалған ағаштардан алынды. ПТР талдауы негізінде барлық алынған үлгілерге скрининг жүргізілді, оның нәтижесінде 23 оң нәтиже анықталды.

Фитопатологиялық зерттеу және ПТР зерттеулерінің нәтижелері инфекцияның жұғу және таралу көздерін жоғары дәлдікпен анықтауға, сондай-ақ Алматы облысының жабайы өсетін жеміс ормандары мен жақын маңдағы дақылды алма бақтарының зерттелген учаскелерінің бактериялық күйіктің болуына ағымдағы жай-күйін бағалауға мүмкіндік берді.

**Негізгі сөздер:** сөздер: бактериялық күйік, *Erwinia amylovora*, фитопатологиялық тексеру, бақылау, *Malus spp.* алма ағашы.

## DISTRIBUTION OF *ERWINIA AMYLOVORA* ON WILD AND CULTURALLY GROWN APPLE TREES *MALUS* SPP. FOR THE PERIOD OF 2021

Malakhova N.P.<sup>1</sup>, Skiba Y.A.<sup>1,2\*</sup>, Tezekbayeva B.K.<sup>1</sup>, Khasseyin A.<sup>1</sup>, Dmitriyeva K.A.<sup>1</sup>, Romashkin V.N.<sup>1</sup>, Zharmukhamedova G.A.<sup>1</sup>, Jumanova Zh. K.<sup>1</sup>, Maltseva E.R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Dosmukhamedov str. 86, Almaty, 050012, Kazakhstan

<sup>2</sup> Almaty Branch of National Center for Biotechnology, Zhahanger 14, Almaty, 050054, Kazakhstan

<sup>3</sup> Tethys Scientific Society, 9 m-n, 1, office 72, Almaty, 050063, Kazakhstan

Corresponding author \*: yuriy.skiba@gmail.com

## ABSTRACT

Fire blight of pome fruit cultures is a dangerous quarantine disease of pome and ornamental plants of Rosaceae, caused by a Gram-negative bacterium *Erwinia amylovora*. For the study of the fire blight distribution and timely establishment of the threat of endemic apple species *Malus sieversii* infection a phytopathological study of wild fruit forests and cultural plantations of apple (*Malus spp.*) was carried out in Almaty region. 263 samples were collected from wild plants without visible symptoms and cultivated plants with symptoms of a fire blight - brown and necrotic young shoots that have a characteristic «shepherd's crook» shape, blackened leaves and ovaries remaining on the affected shoots, and samples from trees with manifestations of the disease had previously been noted were collected as well. Screening of all received samples was carried out based on PCR analysis and revealed 23 positive results.

Phytopathological observations and the results of PCR analysis allowed identification of the infection's source and distribution, as well as assessment of the current state of the studied areas of wild fruit forests and adjacent cultural apple plantations in Almaty region for the presence of fire blight's infection agent.

**Key words:** Fire blight, *Erwinia amylovora*, phytopathological examination, monitoring *Malus spp.*