

ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ И СПОСОБНОСТИ К НУКЛЕАЦИИ ЛЬДА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE*

В. Ю. ЛАГОНЕНКО, М. С. КАСТРИЦКАЯ

РУП «Институт плодоводства»,
аг. Самохваловичи, Республика Беларусь, 223013; e-mail: lagonenkoval@gmail.com;

А. Л. ЛАГОНЕНКО

ООО «Альгимед Техно»,
г. Минск, Республика Беларусь, 223000

Н. П. МАКСИМОВА

Белорусский государственный университет,
г. Минск, Республика Беларусь, 223000

(Поступила в редакцию 25.03.2022)

Болезни, вызванные фитопатогенными бактериями, наносят значительный ущерб сельскому хозяйству по всему миру, приводя к большим потерям урожая и гибели растений. Серьезную опасность для плодовых культур представляет бактериальный рак. Это заболевание ограничивает срок жизни плодовых деревьев, а также существенно снижает урожайность плодов и качество древесины. В молодых садах ежегодные потери урожая могут достигать 10–20 %, а при благоприятных для инфицирования погодных условиях – до 80 %.

Изучение фитопатогенных свойств возбудителя бактериального рака, его комплексная характеристика, позволяет правильно организовать защитные мероприятия и способы контроля заболевания. Так как ранее в Беларуси подобные исследования патогена *P.s. pv. syringae* не проводились, целью данной работы являлось определение вирулентности циркулирующих на территории Республики штаммов и их льдообразующей активности.

Для определения вирулентности циркулирующих на территории Республики Беларусь фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* проведено искусственное заражение подвоев груши OHF-87 в условиях *ex vitro*. Некротические повреждения появились на 3 сутки после инокуляции, а динамика их развития (выраженная или слабая) сохранялась на протяжении всего эксперимента. Оценка интенсивности развития симптомов позволила выделить две группы штаммов по степени вирулентности – высоко- и умеренновирулентные. Способность индуцировать образование кристаллов льда, как один из факторов вирулентности фитопатогенных *P.s. pv. syringae*, обнаружена у всех исследованных в работе штаммов.

Ключевые слова: бактериальный рак, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, вирулентность, белки-нуклеаторы, INA.

Diseases caused by phytopathogenic bacteria cause significant damage to agriculture around the world, leading to large crop losses and plant death. A serious danger to fruit crops is bacterial cancer. This disease limits the life of fruit trees, and also significantly reduces the yield of fruits and the quality of wood. In young orchards, annual crop losses can reach 10–20 %, and under favorable weather conditions for infection, up to 80 %.

The study of phytopathogenic properties of the causative agent of bacterial cancer, its complex characteristics, allows you to properly organize protective measures and ways to control the disease. Since earlier in Belarus similar studies of the pathogen *P.s. pv. syringae* were not carried out, the purpose of this work was to determine the virulence of strains circulating in the territory of the Republic and their ice-forming activity.

To determine the virulence of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* circulating in the territory of the Republic of Belarus, pear rootstocks were artificially infected with OHF-87 under *ex vitro* conditions. Necrotic lesions appeared on the 3rd day after inoculation, and the dynamics of their development (pronounced or weak) persisted throughout the experiment. An assessment of the intensity of the development of symptoms made it possible to distinguish two groups of strains according to the degree of virulence – highly and moderately virulent. The ability to induce the formation of ice crystals, as one of the virulence factors of phytopathogenic *P.s. pv. syringae* was found in all strains studied in the work.

Key words: bacterial cancer, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, virulence, nucleating proteins, INA.

Введение

Бактериальный рак – широко распространенное заболевание плодовых культур, вызываемое фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall. В отличие от других патогенов данного вида, pv. *syringae* обладает широким кругом растений-хозяев. Известно, что патоген, изначально выделенный из сирени (*Syringa vulgaris*), вызывает заболевания более чем у 80 видов растений, включая косточковые и семечковые плодовые деревья, овощные и декоративные культуры [1–3].

В Республике Беларусь среди плодовых культур бактериальным раком больше всего поражаются растения груши и черешни. Высоко восприимчивы к данному заболеванию также растения вишни, сливы, алычи гибридной, абрикоса [4]. Симптомы заболевания достаточно разнообразны и зависят от условий окружающей среды, плодовой культуры, возраста растения, а также поражаемого органа или

ткани. Это могут быть раковые язвы и наросты на стволах и скелетных ветвях, некроз почек, цветков, плодов, листьев, отмирание однолетних побегов, камедетечение и пр. [3, 5–7].

Степень развития заболевания и его интенсивность обусловлены большим количеством факторов, включая целый ряд детерминант вирулентности фитопатогенных *P.s. pv. syringae*, таких как фитотоксины, сидерофоры, подвижность, а также способность к образованию центров кристаллизации льда [8, 9].

Льдообразующей активностью (INA – ice nucleation activity) обладает подавляющее большинство штаммов *P.s. pv. syringae* (фенотип INA⁺). Благодаря поверхностным белкам-нуклеаторам, патоген на поверхности или внутри растительной ткани индуцирует формирование кристаллов льда из воды при температуре выше -5 °С, что является вероятной причиной расхождения между точкой переохлаждения растительных тканей и температурой, при которой возникают повреждения [10, 11]. Таким образом, даже при незначительных температурах могут наблюдаться характерные повреждения, степень которых зависит от количества бактерий. Повреждения, в свою очередь, приводят к высвобождению питательных веществ и успешной дальнейшей колонизации растений бактериями. Такое свойство фитопатогенных бактерий приводит к снижению холодоустойчивости и зимостойкости растений, усилению повреждений морозобоинами [10–12]. Показано, что при заражении растений суспензией INA⁺ бактерий (10³ КОЕ на грамм ткани) резко повышается пороговая температура нуклеации с последующим образованием внутриклеточного льда, летального для растительных клеток [11, 13]

Основная часть

Для получения бактериальной суспензии изоляты *P. s. pv. syringae* культивировали с аэрацией в жидкой среде LB-Lennox 24 ч при 28 °С и доводили стерильной дистиллированной водой до плотности 10⁸ КОЕ/мл (OD₆₀₀ = 0,3) [6].

Таблица 1. Список и происхождение бактериальных штаммов

Штамм <i>P.s. pv. syringae</i>	Место происхождения изолята (год выделения)	Растение-хозяин
11.9	Минский район, аг. Самохваловичи, (2014)	Вишня
11.11	Минский район, аг. Самохваловичи, (2014)	Груша
11.12	Минский район, аг. Самохваловичи, (2014)	Груша
12.6	г. Минск, (2014)	Вишня
14.5(1)	Витебская область, Браславский район, д.Марьянполье, (2015)	Слива
14.5(2)	Витебская область, Браславский район, д.Марьянполье, (2015)	Слива
19.2	Минская область, Мядельский район, (2015)	Яблоня
19.10	Минская область, Мядельский район, (2015)	Вишня
20.1	г.Могилев, (2015)	Абрикос

Определение вирулентности штаммов

Для инокуляции использовали подвой груши ОНФ-87, адаптированные после культуры *in vitro*, с закрытой корневой системой (Р11) в условиях защищенного грунта. Возраст растений составлял 90 сут после пересадки в грунт, высота – 20 см с 4–5 междоузлиями.

На каждом растении груши ОНФ-87 выбирали по три полностью распустившихся и приблизительно одинаковых по размеру листа. По середине центральной жилки стерильным скальпелем делали надрез в 2–3 мм, на который наносили 20 µl бактериальной суспензии. Каплям давали немного подсохнуть, чтобы жидкость не стекала по поверхности листа. После инокуляции растения культивировали при температуре 24 °С в течение семи суток. Для поддержания влажности сеянцы помещали в полиэтиленовые пакеты и регулярно увлажняли. Вирулентность каждого штамма *Pseudomonas syringae* *pv. syringae* оценивали в 21-ой биологической повторности. Отрицательным контролем служили растения, инокулированные стерильной дистиллированной водой. Для учета динамики развития заболевания, величину пораженных участков измеряли ежедневно в течение семи дней. Каждому участку присваивались баллы по следующей шкале: 0 баллов – отсутствие симптомов заражения; 1 – диаметр зоны некроза до 3 мм, 2 – диаметр некроза до 10 мм, 3 – диаметр некроза до 25 мм, 4 – диаметр некроза 30–35 мм, 5 баллов – поражено более половины поверхности листа. Интенсивность развития заболевания (в %) рассчитывали по формуле согласно С. Moragrega [6]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.4.3 (Tukey's multiple comparisons test).

Определение способности к образованию центров кристаллизации льда

Бактерии высевали на плотную питательную среду LB-Lennox до изолированных колоний и культивировали в течение 24 ч при температуре 28 °С. Суспензию клеток готовили путем разведения одной изолированной бактериальной колонии в 140 µl дистиллированной воды. Суспензию каждого штамма в объеме 20 µl наносили каплями на алюминиевую фольгу, высланную сверху парафильмом. В качестве отрицательного контроля использовали 20 µl дистиллированной воды. Фольгу аккуратно

укладывали на поверхность этанола, заранее охлажденного до -4°C , и помещали емкость в морозильную камеру с температурой -4°C [16]. Через 3–5 мин результат оценивали визуально. Каждый штамм анализировали в трех повторностях.

Все инокулированные растения (за исключением контроля) показали развитие заболевания. Симптомы были отмечены на 3 сут после заражения и проявлялись неровными черными и коричнево-черными участками, постепенно прогрессировали, распространяясь по поверхности листа и по черешку. Ежедневные замеры участков поражения позволили отследить динамику развития поражения и выделить две группы вирулентности штаммов – умеренно вирулентные (УВ) и высоко вирулентные (ВВ). В соответствующие группы вошли штаммы, статистически достоверно не отличавшиеся по вирулентности (табл. 2). В первую группу вошли умеренно вирулентные штаммы 11.9; 11.11; 12.6; 19.2 и 19.10, степень поражения листовой пластины которыми варьировала от 33,3% до 50,5 %. Во вторую группу вошли высоковирулентные штаммы 11.12; 14.5(1); 14.5(2) и 20.1, степень поражения листовой пластины которыми варьировала между 70,9 % и 80,9 %.

Таблица 2. Группы вирулентности штаммов по степени поражения листовой пластины

Группа 1 Умеренная вирулентность		Группа 2 Высокая вирулентность	
Штамм	Степень поражения листовой пластины, %	Штамм	Степень поражения листовой пластины, %
11.9	43,81±2,2	11.12	80,95±3,2
11.11	50,48±2,9	14.5(1)	79,05±3,2
12.6	33,3±2,1	14.5(2)	72,38±4,7
19.2	40,95±4,0	20.1	70,9±3,3
19.10	39±3,7		

Следует отметить, что активный либо умеренный характер развития симптомов, вызванных ВВ и УВ штаммами (рис. 1) сохранялся на протяжении всего периода наблюдения.

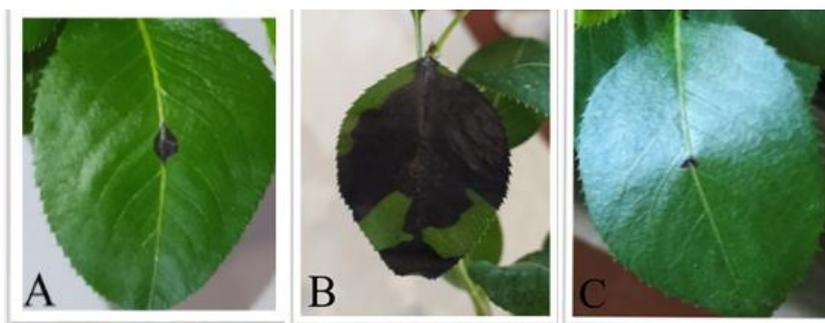


Рис. 1. Поражение листьев груши на пятые сутки после инокуляции умеренно вирулентным штаммом *P.s. pv. syringae* 11.9 (А); высоко вирулентным штаммом *P.s. pv. syringae* 11.12 (В); контроль – инокуляция дистиллированной водой (С).

Таким образом, показано, что в одном саду могут циркулировать штаммы *P.s. pv. syringae*, относящиеся как к высоко-, так и к умеренно вирулентным (например, штаммы 11.9; 11.11 и 11.12). Также установлено, что вирулентность исследуемых штаммов не коррелировала с источником их выделения. Так, например, штаммы 11.11 и 11.12, изолированные из пораженных растений груши, растущих в одном саду, проявляли разную степень вирулентности при заражении подвоев груши. Результаты оценки INA штаммов коллекции показали, что все исследуемые изоляты *P.s. pv. syringae* способны индуцировать образование кристаллов льда (рис. 2).

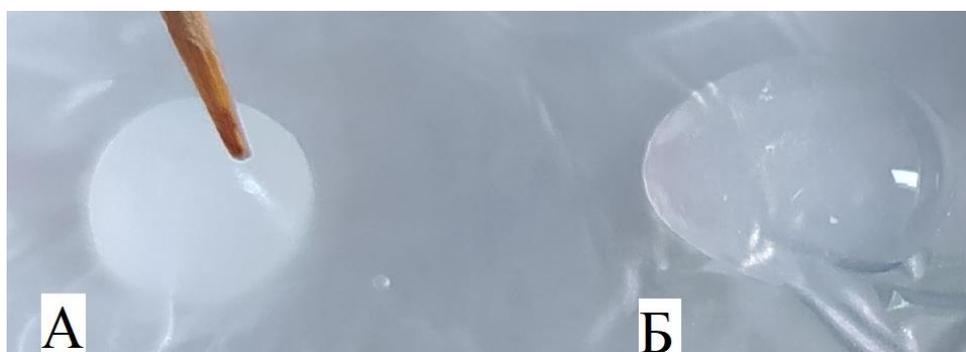


Рис. 2. Результат действия белков-нуклеаторов бактерий *P.s. pv. syringae* после трехминутной экспозиции при температуре -4°C (А – полностью замерзшая суспензия штамма 11.9, Б – дистиллированная вода)

Учет результатов проводили через 3, 4 и 5 мин. Через 3 мин суспензии семи из десяти изолятов представляли собой полностью замерзшие капли, тогда как только поверхность суспензий штаммов 14.5(2) и 19.10 была покрыта ледяной коркой и легко продавливалась деревянной шпилькой. Через 4 мин все девять исследуемых суспензий представляли собой полностью замерзшие капли. Вода замерзала через 5–6 мин.

Разница в скорости замерзания капель может быть объяснена разным количеством поверхностных белков-нуклеаторов, так как количество ядер льдообразования зависит не только от температуры инкубации, возраста бактерий и состава ростовой среды, но и от их генотипа [11, 17].

Заключение

Показано, что среди циркулирующих на территории Республики Беларусь фитопатогенных бактерий *P.s. pv. syringae* можно выделить высоко- и умеренновирулентные штаммы, которые при искусственном заражении подвоев груши приводят к появлению симптомов различных по своей интенсивности. Показано, что все проанализированные в работе изоляты обладают одной из основных детерминант вирулентности фитопатогенных псевдомонад, а именно – способностью к образованию центров кристаллизации льда и, как следствие, повышению температуры замерзания воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hirano, S. S. Christen D. Upper. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte / S. S. Hirano, C. D. Upper // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2000. – Vol. 64, №3. – P. 624–653.
2. Kaluzna, M. Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of cost 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts *Pseudomonas syringae* pathovars / M. Kaluzna1, J.D. Janse, J.M. Young // *Journal of plant Pathology*. – 2012. Vol. 94, 1 supplement. – P. 1.117–1.126.
3. Gašić, K. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits / K. Gašić, A. Prokić, M. Ivanović [et al.] // *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*. – 2012. – Vol. 27, № 3. – P. 219–229.
4. Григорцевич, Л. Н. Защита плодовых деревьев от болезней в садах интенсивного типа: методические указания для изучения дисциплины «Основы плодоводства и огородничества» для студентов специальности 1-75 02 01 «Садово-парковое строительство» / Л. Н. Григорцевич. – Минск: Издания БГТУ, 2010.
5. Natalini, E. Genetic and pathogenetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard / E. Natalini., M.P. Rossi, D. Barionovi [et al.] // *Journal of Plant Pathology*. – 2006. – Vol. 88, № 2. – P. 219–223.
6. Moragrega, C. Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays // C. Moragrega, I. Llorentem, C. Manceau [et al.] // *European Journal of Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 109. – P. 319–326.
7. Горшков, В. Ю. Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем / В. Ю. Горшков. – Казань: Изд-во Сергея Бузукина, 2017. – 304 с.
8. Yessad, S. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear / S. Yessad, C. Manceau, J. Luisetti // *Plant disease*. – 1991. – Vol. 76, № 4. – P. 370–373.
9. Bender, C. L. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases / C. L. Bender, F. Alarcón-Chaidez, D. C. Gross // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1999. – Vol. 63, № 2. – P. 266–292.
10. Bultreys, A. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2 / A. Bultreys, M. Kaluzna // *Journal of Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 92, 1 supplement. – P. 1.21–1.33.
11. Гулевский, А. К. Белки-нуклеаторы бактериального происхождения. Сообщение III. Регуляция активности и значение в природе и биотехнологии / А. К. Гулевский, Л. И. Релина // *Теоретическая и экспериментальная криобиология*. – 2010. – Т.20, № 3. – С. 225–234.
12. Moore, Larry W. *Pseudomonas syringae*: disease and ice nucleation activity / Larry W. Moore // *Ornamentals northwest archives*. – 1988. – Vol. 12., iss. 2. – P. 3–16.
13. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы: учебно-методический комплекс / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. – Минск: БГУ, 2006.
14. Lelliott, R. A. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* / R. A. Lelliott, E. Billing, A. C. Hayward // *J. appl. Bact.* – 1966. – Vol. 29, № 3. – P. 470–489.
15. Sorensen, Kevin N. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains / Kevin N. Sorensen, Kwang-Hee Kim, Jon Y. Takemoto // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – Vol. 64, № 1. – P. 226–230.
16. Pietsch, R. B. Diversity and abundance of ice nucleating strains of *Pseudomonas syringae* in a Freshwater Lake in Virginia, USA / Renee B. Pietsch, Boris A. Vinatzer and David G. Schmale III // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8, article 318. – P. 11. – doi: 10.3389/fmicb.2017.00318
17. Waturangi, Stephanie Diana Elizabeth. Distribution of ice nucleation-active (INA) bacteria from rain-water and air / Stephanie Diana Elizabeth Waturangi // *Hayati Journal of biosciences*. – 2011. – Vol. 18, № 3. – P. 108–112.