

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСМОТОЛЕРАНТНОСТИ, ЭПИФИТНОЙ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ И ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS SP*

В. Ю. ЛАГОНЕНКО

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

(Поступила в редакцию 11.09.2025)

У патогенных бактерий комплекса *Pseudomonas syringae* (*sensu lato*), которые являются возбудителями бактериозов огромного числа культурных и дикорастущих растений, определенную часть жизненного цикла занимает эпифитная стадия, во время которой бактерии увеличивают свою численность, не вызывая симптомов заболевания, однако, переносят осмотический стресс, вызванный колебаниями влажности. Осмотический стресс может изменять численность эпифитной популяции, что в свою очередь оказывает влияние на патогенез. В данной статье проведен анализ взаимосвязи вирулентных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из растений с симптомами бактериозов, с возможностью адаптироваться к эпифитному существованию, а также со способностью к росту в средах с различной концентрацией хлорида натрия. В ходе маршрутных обследований плодовых и ягодных насаждений Беларуси выделены патогенные бактерии, относящиеся к комплексу *Pseudomonas syringae*, в том числе и штаммы бактерий-полифагов *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, а также непатогенные бактерии рода *Pseudomonas*. Установлены концентрации соли, оптимальные для роста бактерий: 0,5 % NaCl (для двух исследуемых штаммов), 2,0 % (для четырех штаммов), от 0,5 до 2 % NaCl (для четырех штаммов) и от 0,2 до 4 % (для двух непатогенных штаммов). Выявлены значительные различия в динамике численности эпифитных популяций патогенных и непатогенных штаммов рода *Pseudomonas* на листьях томатов на 3 и 5 сутки инкубации. Установлена взаимосвязь между эпифитной приспособленностью и осмотолерантностью. С применением метода искусственного заражения листьев груши установлены различия в интенсивности развития заболевания растений (от 7,2 до 68,6 %) для штаммов, обладающих различной осмотолерантностью и эпифитной выживаемостью.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, фитопатогенные бактерии, вирулентность, осмотолерантность, эпифиты.

Pathogenic bacteria of the *Pseudomonas syringae* (*sensu lato*) complex, which cause bacterial diseases in a large number of cultivated and wild plants, spend a certain portion of their life cycle in an epiphytic stage. During this stage, the bacteria increase in numbers without causing disease symptoms, but they tolerate osmotic stress caused by fluctuations in humidity. Osmotic stress can alter the size of the epiphytic population, which in turn influences pathogenesis. This article analyzes the relationship between the virulence properties of *Pseudomonas* bacteria isolated from plants exhibiting bacterial diseases, their ability to adapt to epiphytic growth, and their ability to grow in environments with varying sodium chloride concentrations. Pathogenic bacteria belonging to the *Pseudomonas syringae* complex, including strains of the polyphagous *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bacteria, as well as non-pathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas*, were isolated during route surveys of fruit and berry plantations in Belarus. Optimal salt concentrations for bacterial growth were established: 0.5 % NaCl (for the two studied strains), 2.0 % (for four strains), 0.5 to 2 % NaCl (for four strains), and 0.2 to 4 % (for two non-pathogenic strains). Significant differences in the dynamics of the epiphytic populations of pathogenic and non-pathogenic strains of the genus *Pseudomonas* on tomato leaves on days 3 and 5 of incubation were revealed. A relationship between epiphytic adaptation and osmotolerance was established. Using artificial infection of pear leaves, differences in the intensity of plant disease development (from 7.2 to 68.6 %) were observed for strains with varying osmotolerance and epiphytic survival.

Key words: *Pseudomonas syringae*, phytopathogenic bacteria, virulence, osmotolerance, epiphytes.

Введение

Бактерии комплекса *P. syringae* являются возбудителями заболеваний широкого ряда растений – культурных и дикорастущих, древесных и травянистых, овощных, плодовых и орехоплодных культур. Наиболее распространенные симптомы бактериозов, вызванных этими патогенами, на плодовых растениях, в частности, на груше, яблоне, вишне, черешне, фундуке, является внезапное увядание части или всего растения, язвенные поражения ствола, скелетных ветвей и однолетних побегов, некротическая пятнистость листьев и обильное камедетечение (на косточковых культурах).

Часть жизненного цикла фитопатогенных бактерий комплекса *Pseudomonas syringae* приходится на эпифитную стадию, во время которой микроорганизмы, не вызывая симптомов заболевания, активно увеличивают свою численность для последующего внедрения внутрь растений [1]. Бактерии, живущие на поверхности растений, подвергаются постоянному воздействию неблагоприятных факторов – недостатку питательных веществ, УФ-излучению, суточным перепадам температур. Эпифиты также регулярно подвергаются воздействию водного стресса, как результата частых колебаний влажности – от избытка, обусловленного такими факторами, как роса, осадки, до недостатка во время периодических высыханий листовой поверхности. Таким образом, регуляция внутриклеточной осмоларности, а следовательно и устойчивость к осмотическому стрессу является жизненно важным свойством эпифитных микроорганизмов [2].

Таким образом, логично предположить, что данные бактерии обладают способностью развиваться в условиях нехватки воды, в том числе в насыщенных солями растворах, что не только способствует адаптации к эпифитному существованию на высыхающей поверхности листьев, но и к выживаемости в межклеточном пространстве при переходе к эндофитной фазе (в том числе в условиях ограничения воды как компонента защиты растений) [2, 3].

Различия в осмотолерантности могут быть связаны со стратегиями выживания бактерий. Возбудитель бурой пятнистости фасоли – бактерия *P. syringae* pv. *syringae* B728a – в условиях солевого стресса продуцирует различные соединения-осмолиты, повышающие галотолерантность, что позволяет культивировать бактерии при концентрации NaCl от 1 до 3 % [1]. Исследования показали, что эпифитная приспособленность двух патогенных штаммов *P. syringae* (B728a и DC3000) различается, что согласуется с вариациями в осмотолерантности и связано с продукцией экзополисахаридов (в частности левана) и поглощением осмопротекторов [3].

Так как большое значение на патогенез оказывает не только агрессивность штаммов при попадании их внутрь зараженного растения, но и эпифитная выживаемость, целью настоящей работы было определить осмотолерантность бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из растений с признаками бактериозов, а также провести анализ из эпифитной приспособленности и вирулентных свойств.

Основная часть

В работе использовались штаммы, выделенные на территории Республики Беларусь с 2014 по 2025 гг. (табл. 1) из растений с признаками бактериального поражения.

Таблица 1. Список штаммов, использованных в работе

Штамм	Год и место выделения	Растение-хозяин; орган и симптомы	Систематическая принадлежность
<i>Pss11.9</i>	2014 г., Минская область, Минский район	Вишня; участок побега (язвенное поражение)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
<i>Pss11.12</i>	2014 г., Минская область, Минский район	Груша; лист (некротическая пятнистость)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
<i>Ps12.20</i>	2014 г., г. Минск	Сирень; лист (некротическая пятнистость черного цвета)	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Ps43.4</i>	2020 г., Минская область, Минский район	Вишня; лист (быстрое увядание, усыхание отдельных ветвей)	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Pss50.2</i>	2022 г., Минская область, Минский район	Груша; побег (усыхание соцветий, листьев, симптом «мертвой почки»)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
<i>Ps89/2</i>	2024 г., Брестская область, Брестский район	Черешня; лист (некротическая пятнистость с хлоротичным ореолом)	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Ps89/3</i>	2024 г., Брестская область, Брестский район	Черешня; участок побега (язвенные поражения с камедетечением)	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Ps93/3-2</i>	2024 г., Минская область, Минский район	Актинидия; лист (некротические пятна коричневого цвета с хлоротичным ореолом)	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Ps96/1</i>	2024 г., Минская область, Минский район	Облепиха; участок побега (усыхание ветвей, мелколистность, язвы)	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Ps97/1</i>	2024 г., Минская область, Минский район	Лох многоцветковый; участок побега (усыхание ветвей, мелколистность)	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Ps105/1</i>	2024 г., Минская область, Минский район	Слива; лист (некротическая пятнистость красно-коричневого цвета с выпадением сухой ткани)	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Ps107/6-2</i>	2024 г., Минская область, Минский район	Слива; лист (красно-коричневая пятнистость с выпадениями сухой ткани)	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Ps110/1</i>	2025 г., Минская область, Минский район	Груша; побег (язвенное поражение)	<i>Pseudomonas syringae</i>

Выделение бактерий, патогенные свойства, а также принадлежность штаммов к комплексу *P. syringae* или бактерии-полифагу *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* проводили согласно методическим указаниям [4].

Анализ осмотолерантности проводили согласно модифицированной методике Yang X. [et al.] [5]. Концентрация NaCl в питательном бульоне – от 0,5 до 10 %. Суспензию тестового штамма инокулировали в питательный бульон (до OD₆₀₀ = 0,1) и культивировали в течение 48 ч (24 °С, 120 об/мин). Количество клеток после инкубации определяли по OD₆₀₀ культуральной жидкости.

Эпифитную приспособленность определяли по методике J. Yu [et al.] [6]. Листья томатов погружали в суспензию штаммов (2×10⁸ КОЕ/мл) до полного смачивания, после чего растения помещали

в климатическую камеру (25 °С, с фотопериодом 16/8 ч, и относительной влажностью 60–65 %) на 5 суток. После первых, третьих и пятых суток отбирали по 2 листа, обработанных соответствующими штаммами. Листья обмывали в физиологическом растворе (в 15 мл, 20 мин. на роторной качалке с аэрацией 120 об/мин), после чего проводили разведения в 100 раз и высевали по 20 мкл на плотную среду KingB для подсчета жизнеспособных колоний.

Анализ вирулентных свойств и определение группы вирулентности проводили согласно методике искусственного заражения отдельных листьев [7], [8] при плотности бактериальной культуры всех исследуемых штаммов 1×10^6 КОЕ/мл.

Анализ растительных тканей, собранных в ходе маршрутных обследований плодовых и ягодных насаждений, установил наличие флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* в образцах с симптомами внезапного увядания цветков и листьев, усыхания отдельных ветвей или целого растения, некротическими пятнистостями, а также язвенного поражения (рис. 1). Патогенные штаммы *Ps12.20*, *Ps43.4*, *Ps89/2*, *Ps89/3*, *Ps96/1*, *Ps105/1*, *Ps107/6-2* и *Ps110/1* идентифицированы как представители комплекса *P. syringae*; штаммы *Pss11.9*, *Pss11.12* и *Pss50.2* – как бактерии-полифаги, относящиеся к патовару *syringae*. Штаммы *Ps93/3-2* и *Ps97/1*, выделенные из растений актинидии и лоха многоцветкового соответственно, не вызвали развития РГ при инокуляции в листья табака, что позволило отнести их к непатогенным штаммам.

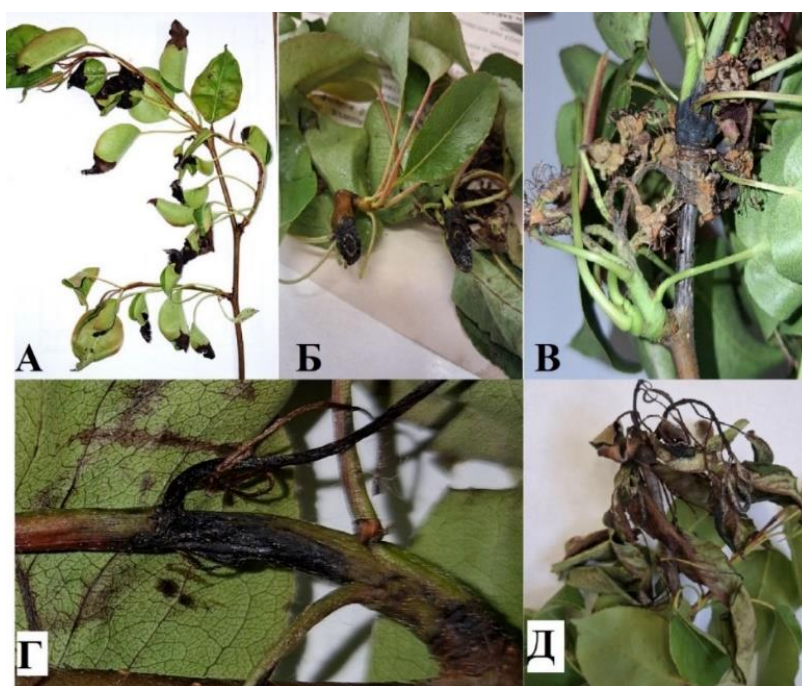


Рис. 1. Симптомы бактериального рака на растениях груши:

А – некроз листьев (сорт Горная красавица); Б – некроз побега; В – некроз побега и цветоножек, усыхание цветков (сорт Горная красавица); Г – продольная язва; Д – увядание верхушки побега (сорт Горная красавица)

Измерение оптической плотности (ОП) исследуемых культур до и после инкубации позволило установить значительные различия в скорости роста бактериальных штаммов в питательной среде с минимальным значением NaCl – 0,5 %. При начальных значениях ОП $0,060 \pm 0,0016$ (λ_{600} нм) для всех бактериальных культур, через 48 ч культивирования в зависимости от штамма значения находилась в диапазоне от 0,170 до 0,450 (рис. 2).

Согласно полученным данным, оптимальная концентрация соли для роста штаммов *Ps43.4*, *Ps89/2* составляет 0,5 %, для штаммов *Pss11.12*, *Ps12.20*, *Pss50.2* и *Ps89/3* – 2 %. Штаммы *Pss11.9*, *Ps96.1*, *Ps105/1* и *Ps107/6-2* обладают примерно одинаковой скоростью роста в диапазоне концентраций NaCl от 0,5 до 2 %. Таким образом, вышеперечисленные штаммы можно отнести к слабогалофильным бактериям [9].

Отдельно следует отметить штаммы *Ps93/3-2* и *Ps97/1*, способные к активному росту в диапазоне концентраций от 2 до 4 % NaCl – величина оптической плотности бактериальной культуры (λ_{600} нм) в этих условиях составляет 0,3–0,5, что соответствует значению в 1×10^6 – 1×10^8 КОЕ/мл. Так как предварительный анализ не выявил наличия у них патогенных свойств, можно предположить, что

данные бактерии являются представителями вида *P. fluorescens*, для которого характерна не только повышенная осмоотолерантность, связанная с исключительно эпифитным существованием, но и более высокая скорость роста.

Также установлено, что в стандартной полноценной питательной среде скорость роста штаммов, проявляющих повышенную осмоотолерантность, в среднем была в 1,6 раза выше, чем у менее толерантных.

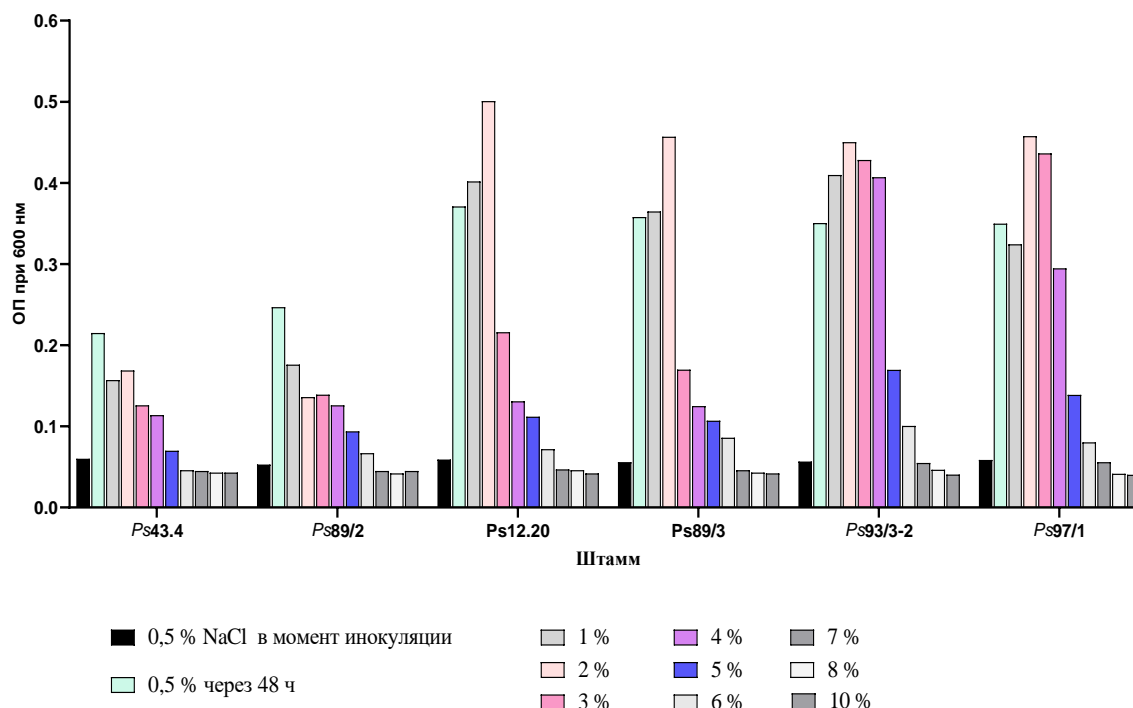


Рис. 2. Рост бактерий *Pseudomonas* sp. при разных концентрациях NaCl

Значения ОП бактериальных культур в диапазоне концентраций NaCl от 7 до 10 % статистически не отличались от ОП до инкубации ($P > 0,05$). При этом 100 % штаммов увеличивали численность популяции в 1,5–3 раза в среде с 5 % NaCl, а в среде с 6 % солью двухкратное увеличение зафиксировано только для штаммов *Ps107/6-2*, *Ps97/1* и *Ps93/3-2*.

Полученные данные позволяют предположить, что штаммы *Ps11.9*, *Ps11.12*, *Ps12.20*, *Ps50.2*, *Ps89/3*, *Ps93/3-2*, *Ps96.1*, *Ps97/1*, *Ps105/1* и *Ps107/6-2* имеют повышенный потенциал к эпифитному выживанию, что может также способствовать успешной колонизации растений-хозяев.

Эпифитная приспособленность. Взаимосвязь между осмоотолерантностью и эпифитной приспособленностью устанавливали для четырех патогенных (*Ps12.20*, *Ps43.4*, *Ps89/2*, *Ps89/3*) и одного непатогенного изолята (*Ps93/3-2*). Эпифитная выживаемость оценивалась на листьях томата, который не является хозяином для большинства штаммов возбудителя бактериального рака (табл. 2).

Таблица 2. Численность эпифитной популяции штаммов *Pseudomonas* sp.

Штамм	24 ч инкубации		72 ч инкубации		120 ч инкубации	
	масса листьев, г	КОЕ/г	масса листьев, г	КОЕ/г	масса листьев, г	КОЕ/г
<i>Ps12.20</i>	0,429	1×10^7	0,542	2×10^5	0,444	2×10^4
<i>Ps43.4</i>	0,402	1×10^7	0,360	2×10^6	0,341	2×10^4
<i>Ps89/2</i>	0,568	1×10^7	0,775	6×10^4	0,239	2×10^4
<i>Ps89/3</i>	0,398	1×10^7	0,437	1×10^5	0,374	5×10^5
<i>Ps93/3-2</i>	0,327	1×10^7	0,343	1×10^5	0,255	2×10^5

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, наиболее резкое изменение численности эпифитной популяции наблюдалось у штамма *Ps89/2* – на 3 сутки инкубации (плотность снизилась более чем в 160 раз), тогда как для штамма *Ps43.4* число жизнеспособных клеток сократилось всего в 5 раз.

Анализ плотности популяции штаммов на 5 сутки инкубации показал продолжение снижения численности эпифитных бактерий для штаммов *Ps12.20*, *Ps43.4* и *Ps89/2*, при этом размер популяций штаммов *Ps89/3* и *Ps93/3-2* вырос по сравнению с 3 сутками в 5 и 2 раза соответственно. Таким

образом, по данным за пятые сутки инкубации штаммы, проявившие большую осмотолерантность (за исключением *Ps12.20*) обладают более высокой эпифитной выживаемостью.

Так как вирулентность штаммов бактерий рода *Pseudomonas* определяется несколькими критериями, одним из которых является персистенция (процесс длительного выживания патогена в организме хозяина за счет сопротивления защитным реакциям растения, в том числе и при эпифитном существовании), следующим этапом работы являлось определение вирулентности проанализированных выше штаммов.

Вирулентные свойства штаммов *Pseudomonas* sp.

Для анализа были выбраны штаммы *Ps93/3-2*, *Pss43/4*, *Ps89/2*, *Ps12.20*, *Ps89/3*, а также *Pss11.9* (контрольный умеренно вирулентный штамм) и *Ps110.1* (контрольный высоковирулентный штамм) (табл. 3, рис. 3).

Таблица 3. Группы вирулентности штаммов *Pseudomonas* sp.

Штамм	Значение интенсивности развития заболевания, %	Группа вирулентности
<i>Ps93/3-2</i>	7,2 ^a	Низковирулентные
<i>Pss43/4</i>	33,8 ^b	Умеренно вирулентные
<i>Ps89/2</i>	35,7 ^b	
<i>Ps12.20</i>	40,0 ^c	
<i>Pss11.9</i>	43,8 ^d	
<i>Ps89/3</i>	44,0 ^d	
<i>Ps110.1</i>	68,6 ^e	Высоковирулентные
Примечание: значения под одним индексом (a, b, c, d, e) не отличаются статистически		

Спустя 5 суток инкубации установлен диапазон значений интенсивности развития заболевания от 33,8 до 68,6 %, а также выделены 3 группы вирулентности штаммов. Также выявлено, что штамм с повышенной осмотолерантностью и эпифитной выживаемостью (*Ps89/3*) вызывает статистически более интенсивное ($p < 0,05$) развитие заболевания по сравнению со штаммами *Pss43/4*, *Ps89/2* с оптимум роста при концентрации соли в 0,5 % и сниженной эпифитной приспособленностью. Штамм *Ps12.20*, занял промежуточное значение по степени вирулентности – 40,0 %.

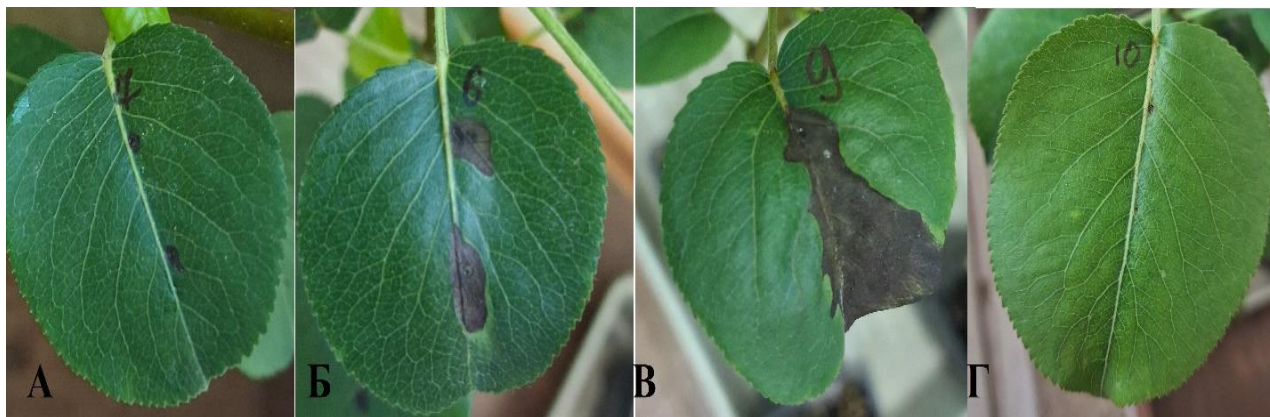


Рис. 3. Развитие некроза при инокуляции штаммов *Pseudomonas* sp.:

А – штамм *Ps93/3-2*; Б – *Ps89/2*; В – *Ps110.1*; Г – вода

Следует отметить, что инокуляция авирулентного штамма *Ps93/3-2* также выявила наличие незначительных некротических поражений листьев груши, что может говорить либо о слабом патогенном потенциале данных бактерий, либо реакции растения на инвазию микроорганизма.

Заключение

Проведенный анализ свойств штаммов рода *Pseudomonas* позволил установить различия в скорости роста исследуемых бактерий как в стандартной питательной среде (0,5 % NaCl), так и при повышенном содержании соли. Исследуемые бактерии относятся к слабогалофильным – оптимальная концентрация соли для роста штаммов *Ps43.4*, *Ps89/2* составляет 0,5 %, для штаммов *Pss11.12*, *Ps12.20*, *Pss50.2* и *Ps89/3* – 2 %; штаммы *Pss11.9*, *Ps96.1*, *Ps105/1* и *Ps107/6-2* обладают примерно одинаковой скоростью роста в диапазоне концентраций NaCl от 0,5 до 2 %. Непатогенные штаммы *Ps93/3-2* и *Ps97/1* способны к активному росту в диапазоне концентраций NaCl от 2 до 4 %.

Для патогенных штаммов (за исключением *Ps12.20*) с повышенной осмотолерантностью характерна большая эпифитная приспособленность, а также достоверно более высокий ($p < 0,05$) уровень вирулентности.

Работа выполнена в рамках задания 1.25 «Диагностика видового и патогенного состава фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* на плодовых и орехоплодных культурах и оценка эффективности средств защиты растений для контроля бактериозов» подпрограммы «Плодородие почв и защита растений» Государственной программы научных исследований «Сельскохозяйственные технологии и продовольственная безопасность» на 2021–2025 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control / M. M. Kennelly [et al.] // Plant Disease. – 2007. – Vol. 91, № 1. – P. 4–17.
2. Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance / Matthias Kurz, Adrien Y. Burch, Britta Seip [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2010. – Vol. 76, № 16. – P. 5452–5462.
3. Physiological and transcriptional responses to osmotic stress of two *Pseudomonas syringae* strains that differ in epiphytic fitness and osmotolerance / Brian C. Freeman, Chiliang Chen, Xilan Yu [et al.] // Journal of bacteriology. – 2013. – Vol. 195, iss. 20. <https://doi.org/10.1128/jb.00787-13>
4. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя бактериального рака (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) плодовых культур / В. Ю. Лагоненко, А. Л. Лагоненко, Н. В. Кухарчик, М. С. Кастрюцкая, Н. П. Максимова // Плодоводство: сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства; редкол.: А. А. Таранов [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2021. – Т. 33. – С. 196–201.
5. A salt-tolerant growth-promoting phyllosphere microbial combination from mangrove plants and its mechanism for promoting salt tolerance in rice / Yang X., Yuan R., Yang S. [et al.] // Microbiome. – 2024. – Vol. 12. – <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01969-9>.
6. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* / Jing Yu, Alejandro Peñaloza-Vázquez, Ananda M. Chakrabarty, Carol L. Bender // Molecular Microbiology. – 2002. – Vol. 33, Iss. 4. – P. 712–720.
7. Оценка вирулентности и способности к нуклеации льда фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* / В. Ю. Лагоненко, Н. П. Максимова, М. С. Кастрюцкая, А. Л. Лагоненко // Вестн. Белорус. гос. с.-х. акад. – 2022. – № 2. – С. 84–87.
8. Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays // C. Moragrega [et al.] // Europ. J. of Plant Pathol. – 2003. – Vol. 109. – P. 319–326.
9. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) / И. М. Ибрахим, С. А. Коннова, Е. Н. Сигида [и др.] // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, вып. 3. – с. 345–353.