

Устойчивость штаммов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* к меди и влияние фунгицидных препаратов на развитие симптомов бактериального рака плодовых культур

В. Ю. Лагоненко, научный сотрудник, М. С. Кастрицкая, кандидат с.-х. наук,
РУП «Институт плодоводства»

(Дата поступления статьи в редакцию 12.09.2023)

Анализ 19 штаммов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, выделенных в четырех областях Беларуси показал толерантность 100 % изолятов к меди в концентрации 0,72 мМ и 21 % из них к 1,08 мМ, что говорит о присутствии в плодовых насаждениях Республики устойчивых к меди популяций возбудителя данного заболевания.

Искусственное заражение плодов груши (сортов Велеса и Чижовская) бактериями Pss11.9 показало, что обработка препаратами Дитан Нео Тек 75 и Касумин снижает интенсивность развития заболевания на 33–45 %.

The analysis of 19 strains of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* identified in four regions of Belarus showed that 100% of isolates were tolerant to 0.72 mM of copper, and 21 % of them – to 1.08 mM. This indicates the availability of populations of the agent of this disease, which are resistant to copper, in fruit orchards of the republic.

Artificial inoculation of pear fruits (Velsa and Chizhovskaya varieties) with Pss11.9 shows that treatment with Ditan Neo Tek 75 and Kasumin reduces the intensity of the development of this disease by 33–45%.

Введение

Фитопатогенные микроорганизмы не только снижают продуктивность растений, но и являются причиной гибели отдельных деревьев и целых насаждений. Бактерии-полифаги *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) вызывают пятнистости, ожоги, увядание, язвы у более чем 180 видов древесных и травянистых растений [1], включая косточковые и семечковые плодовые культуры. В Беларуси ассоциированный с Pss бактериальный рак плодовых культур наносит наибольший ущерб растениям груши, черешни и вишни [2].

По мере изучения патосистем, связанных с бактериями Pss, пополняется список растений-хозяев, а также ареал распространения возбудителя заболевания, что свидетельствует о важности исследования данного патогена [3].

Существенно затрудняет контроль заболевания отсутствие эффективных в отношении бактерий Pss препаратов защиты растений. Начиная с 60-х годов XX века стали появляться сообщения о снижении эффективности обработок медьсодержащими соединениями, которые традиционно использовались в борьбе с бактериозами, вплоть до развития у патогена полной резистентности к допустимым концентрациям меди. В настоящее время исследования показывают, что некоторые штаммы возбудителя бактериального рака, выделенные в крупных плодовых садах, способны к росту на среде, содержащей до 3,2 мМ меди [4]. По мнению исследователей, такая ситуация находится в тесной взаимосвязи с практикой применения медьсодержащих препаратов, а также обусловлена наличием в геноме патогена плазмид резистентности, способных передаваться между популяциями путем конъюгации, что приводит к постепенному замещению неустойчивых штаммов резистентными [5].

Способность к эпифитному и эндофитному существованию возбудителя бактериального рака требует поиска как контактных, так и системных препаратов. При этом считается, что избавиться от эндофитной инфекции Pss в растении практически невозможно, поэтому основное внимание необходимо уделять профилактике заболевания и снижению численности циркулирующих в насаждениях патогенов [6].

В связи с актуальностью данной темы, в настоящей работе рассматриваются вопросы устойчивости к меди штаммов возбудителя бактериального рака, выделенных на территории Республики Беларусь, а также эффективности фунгицидов при искусственном заражении растений бактериями Pss.

Материалы и методы

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2022–2023 гг.

В работе использовали штаммы Pss, выделенные и идентифицированные нами ранее (таблица 1).

Культуры клеток патогена хранились при температуре –20 °С в 15 % растворе глицерина. При проведении исследований штаммы поддерживались субкультивированием.

Определение чувствительности штаммов Pss к меди проводили согласно «МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания» в питательной среде LB (модификация Lennox) с использованием растворов CuSO₄ в диапазоне конечных концентраций от 0,09 до 1,80 мМ. Бактериальные штаммы высевали техникой зигзагообразных истощающих штрихов. Оценку ингибирующей активности соответствующих концентраций меди на рост бактериальных штаммов проводили визуально через 24, 48 и 72 ч после посева, сравнивая

с интенсивностью их роста на питательной среде без добавления CuSO_4 . Концентрация считалась ингибирующей при полном отсутствии роста бактерий по всей траектории посева в течение 72 ч. Рост бактерий только в зоне первых штрихов не рассматривался как признак устойчивости.

Таблица 1 – Перечень штаммов *Pss*, использованных в работе

Штамм	Выделен			
	Год	Район/город	Культура	Сорт
11.9	2014	Минская область, Минский р-н	Вишня	н/д
11.11			Груша	н/д
11.12			Груша	н/д
12.6		г. Минск	Вишня	н/д
14.5(1)	2015	Витебская область, Браславский р-н	Слива	н/д
14.5(2)			Слива	н/д
19.2	2015	Минская область, Мядельский р-н	Яблоня	Белорусское сладкое
19.10			Вишня	Лотовая
20.1		г. Могилев	Абрикос	Знаходка
26.1		2016	Гомельская область, аг. Довск	Груша
26.4	Груша			Большая летняя
26.5	Груша			Десертная росошанская
32.1	Минская область, Минский р-н		Груша	Сувенир
32.4			Груша	н/д
36.1			Груша	Белорусская поздняя
40.1	2020	Минская область, Минский р-н	Груша	Талгарская красавица
43.2	2021	Минская область, Минский р-н	Вишня	н/д
43.4			Вишня	н/д
43.5			Вишня	Гриот белорусский

Примечание – н/д – нет данных.

Эффективность фунгицидов в отношении возбудителя бактериального рака анализировали с использованием незрелых плодов и однолетних побегов груши (сортов Велеса, Чижовская и Талгарская красавица) в пяти вариантах опыта, приведенных в таблице 2.

Таблица 2 – Варианты опытов для анализа эффективности фунгицидов

Вариант	Обработка		
	за 24 ч до заражения	заражение	через 48 ч после заражения
I	Вода (отрицательный контроль)		
II	–	Суспензия бактерий <i>Pss</i> 11.9 (10^8 КОЕ/мл)	–
III	Дитан Нео Тек 75, ВДГ (3 кг/ 1000 л)		–
IV	–		Касумин, ВР (4 л/1000 л)
V	Косайд 2000, ВДГ (3 кг/ 1000 л)		–

Для проведения искусственного заражения бактериальный штамм *Pss*11.9 наращивали в жидкой питательной среде до 10^8 КОЕ/мл. Плоды и побеги предварительно промывали в 50 % этаноле (30 сек), затем трижды в стерильной дистиллированной воде. После подсыхания излишков жидкости проводили обработку согласно вариантам опыта. Для имитации перехода от эпифитной стадии развития инфекции к эндофитной, бактериальную суспензию наносили без повреждения эпидермиса. Для поддержания высокой влажности, необходимой для инициации заражения и последующего развития инфекции, плоды помещали в одноразовые пластиковые контейнеры на влажную фильтровальную бумагу, а побеги ставили в колбы с водой под полиэтиленовые пакеты. Учет результатов проводили в течение 240 ч.

Оценка развития заболевания проведена согласно модифицированной нами шкале по методическим указаниям «Изучение устойчивости плодовых, ягодных и декоративных культур к заболеваниям». Шкала оценки интенсивности развития заболевания на плодах/листьях: 0 баллов – признаков поражения нет; 1 балл – пятна мелкие, встречаются редко/появление 1–2 мелких пятен; 2 балла – пятна мелкие, встречаются часто/появление 3–5 мелких или 1–2 крупных пятен, занимающих 1/10 части поверхности листа; 3 балла – пятна $\leq 0,5$ см, многочисленные/ появление до 10 мелких или 5 крупных, сливающихся пятен, занимающих $\frac{1}{4}$ поверхности листа; 4 балла – пятна многочисленные, сливающиеся $\geq 0,5$ см/ поражено более $\frac{1}{2}$ поверхности листа. Статистический анализ проведен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3.

Результаты и обсуждение

Чувствительность штаммов *Pss* к меди. Согласно литературным данным, однозначного значения, при котором штаммы *Pss* считаются устойчивыми к меди, нет; более того, с годами наблюдается тенденция к увеличению этих значений. В соответствии со шкалами, приведенными М. Sulikowska [7] и М. Hwang [8], патоген является устойчивым, если способен к росту на среде, содержащей $\geq 0,36$ и $\geq 0,80$ мМ меди соответственно. Таким образом, 100 % наших изолятов устойчивы, согласно первой классификации и 26 % – согласно второй (таблица 3). Только временный ингибирующий эффект на 32 % штаммов оказывает медь в концентрации 0,72 мМ, а на 21 % штаммов – концентрация в 1,08 мМ. Штамм *Pss*19.10, который оказался высокоустойчивым к воздействию меди (1,44 мМ), в предыдущих экспериментах проявлял также повышенную устойчивость и к воздействию фунгицидов Каптан, Делан и Абига-Пик.

Представленные данные свидетельствуют о наличии устойчивых и высокоустойчивых популяций возбудителя бактериального рака в плодовых насаждениях Республики Беларусь, что может представлять проблемы не только в контроле над заболеванием, но и в связи с возможностью постепенного замещения восприимчивых к меди бактерий *Pss* резистентными. Анализ устойчивости штаммов и источника их выделения показывает отсутствие связи с растением-хозяином и местом его произрастания.

Таблица 3 – Динамика роста бактерий *Pss* на питательной среде с разными концентрациями CuSO_4 в течение 72 ч после посева

Штамм	Концентрация CuSO_4 , мМ														
	0,09	0,18	0,36	0,72			1,08			1,44			1,80		
	24 ч			24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
11.9	+	+	+	+	+	+	±	±	±	–	–	–	–	–	–
11.11	+	+	+	+	+	+	±	±	±	–	–	–	–	–	–
11.12	+	+	+	+	+	+	–	±	+	–	–	–	–	–	–
12.6	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14.5(1)	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14.5(2)	+	+	+	+	+	+	±	±	±	–	–	–	–	–	–
19.2	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19.10	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	+	+	–	–	–
20.1	+	+	+	±	+	+	–	±	+	–	–	–	–	–	–
26.1	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26.4	+	+	+	±	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26.5	+	+	+	±	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
32.1	+	+	+	±	+	+	–	±	+	–	–	–	–	–	–
32.4	+	+	+	+	+	+	±	±	+	–	–	–	–	–	–
36.1	+	+	+	±	+	+	±	±	±	–	–	–	–	–	–
40.1	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
43.2	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
43.4	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
43.5	+	+	+	±	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание – (+) – есть рост штаммов; (±) – рост штаммов в зоне первых штрихов; (–) – нет роста штаммов.

Влияние фунгицидов с доказанной бактерицидной активностью при искусственном заражении плодов и листьев груши. В проведенных нами предварительных исследованиях получены данные о бактерицидных свойствах препаратов Дитан Нео Тек 75 и Касумин в максимально допустимых к обработке плодовых деревьев против проанализированных выше штаммов *Pss* в условиях *in vitro*. Также ингибирующее рост бактерий действие установлено для контактного медьсодержащего фунгицида Косайд 2000, что особенно интересно, учитывая данные об устойчивости этих штаммов к меди. Принимая во внимание данные о различной биодоступности меди в химических соединениях [9], в том числе в зависимости от условий окружающей среды, было принято решение проанализировать влияние данного препарата на способность предупреждать развитие бактериального рака.

Симптомы заражения на плодах во **II варианте** опыта были зарегистрированы уже через 24 ч после инокуляции, и представляли собой многочисленные дискретные либо сливающиеся между собой пятна черного цвета до 0,2 мм в диаметре. Поражение листьев во II варианте в виде черных пятен 0,2–0,5 мм в диаметре, окруженных хлоротичным ореолом или без него, проявилось через 120 ч. Анализ интенсивности развития некроза в этом варианте опыта, проведенный через 240 ч после искусственного заражения, показал отсутствие достоверных различий между значениями поражения плодов груши сорта Вилия и Чижовская ($p = 0,5547$) и значительные различия в интенсивности развития заболевания между листьями и плодами ($p < 0,0001$ для сорта Велеса и $p = 0,0003$ для сорта Чижовская).

Анализ результатов в **III и IV вариантах** опыта, проведенный через 240 ч после инокуляции бактерий, показал, что превентивная обработка препаратом *Ди-*

тан Нео Тек 75 снижает интенсивность развития поражений на плодах сорта Велеса на 45 %, на плодах сорта Чижовская на 33 % (рисунок 1, а). Опрыскивание после появления первых симптомов препаратом Касумин снизило интенсивность развития некроза на плодах обоих сортов на 45 %.

Оценка поражения на листьях не выявила достоверных различий между **II, III и IV** ($p < 0,0001$) вариантами опыта (рисунок 1, б). Тем не менее, при относительно слабом развитии некроза листья, обработанные только бактериальной суспензией, имели также симптомы хлороза и увядания, а обработанные препаратами Дитан Нео Тек 75 и Касумин сохраняли цвет и плотность листовой пластины.

Наибольшая степень поражения отмечена в **V варианте** опыта. Через 24 ч после инокуляции бактерий на плодах наблюдались многочисленные, сливающиеся некротические поражения, достигая размера в 0,5 см, а спустя 10 суток инкубации интенсивность поражения превосходила значения II варианта в 1,6 и 2 раза для сортов Велеса и Чижовская соответственно. Поражения на листьях в виде очагов черного цвета и размером в 0,5–1,5 см, наиболее выраженные с адаксиальной стороны, проявились также на вторые сутки после нанесения суспензии бактерий (рисунок 2, в). Через 240 ч инкубации некроз с ярко-желтым ореолом занимал от 20 до 70 % поверхности листовых пластин (рисунок 2, г), превышая значения, полученные во II варианте в 5,8 раза. Вероятной причиной таких симптомов могло быть фитотоксическое воздействие меди на эпидермис, чечевички и устьица плодов и листьев в условиях высокой влажности [10], что создало открытые ворота для интенсивного развития инфекции, так как ни обработка только бактериальной суспензией, ни обработка только препаратом Косайд 2000 к таким симптомам не привела (рисунок 2, в; 1, 2).

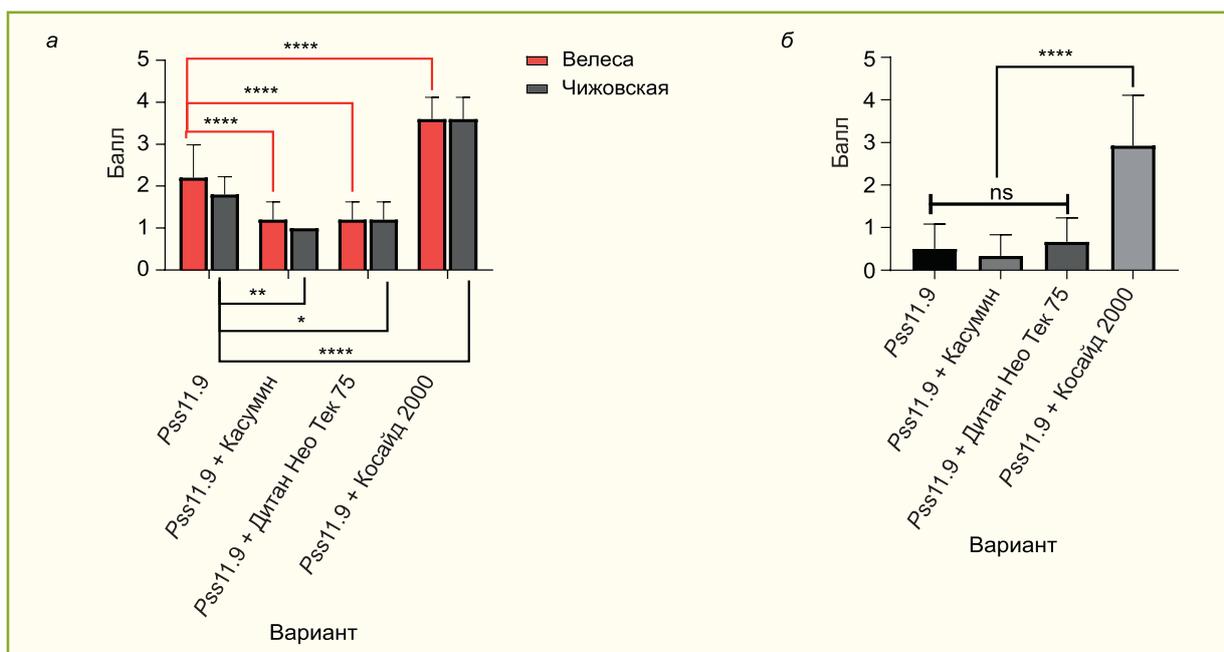


Рисунок 1 – Влияние фунгицидов на интенсивность развития некроза, вызванного бактериями *Pss11.9*, на плодах (а) и листьях (б) груши (ns – отличия незначительны; * $p = 0,0124$; *** $p = 0,0004$; **** $p < 0,0001$)

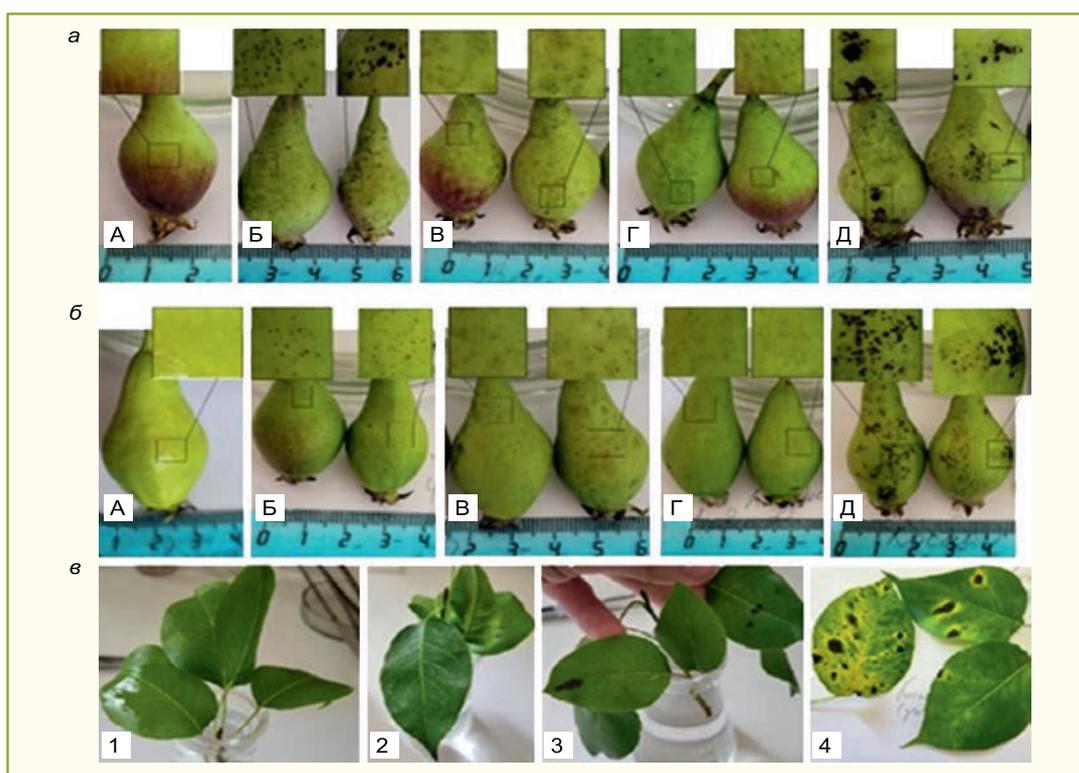


Рисунок 2 – Влияние фунгицидных препаратов на развитие некроза, вызванного бактериями *Pss11.9*: а – плоды сорта Велеса; б – плоды сорта Чижовская (А – I вариант опыта; Б – II вариант; В – III вариант; Г – IV вариант; Д – V вариант); в – листья груши сорта Талгарская красавица (1 – II вариант опыта, 24 ч инкубации; 2 – обработка только препаратом Косайд 2000, 24 ч инкубации; 3 – V вариант, 24 ч инкубации; 4 – V вариант, 240 ч инкубации)

В I варианте опытов симптомы заболевания не проявлялись.

Высев микрофлоры из очагов поражения искусственно зараженных плодов и листьев груши, проведенный для подтверждения постулатов Коха, показал наличие в тканях флюоресцирующих бактерий, вызывавших при повторном заражении аналогичные сим-

птомы. Принадлежность выделенных бактерий к *Pss* подтверждена с помощью ПЦР анализа к гену *sygD*.

Установлено также, что при относительно небольшом количестве поражения на листьях, высеив из бессимптомного листового черешка показал наличие там соответствующей микрофлоры, что говорит о базилептальном перемещении патогена в стебель.

Заключение

Анализ устойчивости к меди 19 штаммов *Pss*, выделенных на территории Республики Беларусь показал, что 100 % изолятов способны к росту на среде, содержащей 0,72 мМ CuSO_4 . Из них 21 % нечувствительны к 1,08 мМ и 5 % – к 1,44 мМ CuSO_4 . При этом не выявлено зависимости между устойчивостью и источником выделения патогена.

Оценка эффективности фунгицидов в отношении возбудителя бактериального рака плодовых показала, что обработка контактным препаратом Дитан Нео Тек 75 (3 кг/1000 л) снижает интенсивность развития заболевания на плодах на 33–45 %, а системным препаратом Касумин (4 л/1000 л) – на 45 %.

Анализ симптомов бактериального рака после искусственного заражения листьев груши не выявил достоверных различий в интенсивности развития некроза на поверхностях обработанных только бактериальной суспензией и с применением фунгицидов Дитан Нео Тек 75 и Касумин. Однако обработанные данными препаратами листья не проявляли симптомов увядания и хлороза.

Заражение плодов и листьев груши бактериальной суспензией после нанесения препарата Косайд 2000 привело к увеличению интенсивности развития некроза в 1,6–5,8 раза по сравнению с вариантом без фунгицида.

Литература

1. Kennelly, M. M. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control / M. M. Kennelly, F. M. Cazorla // *Plant Disease*. – 2007. – Vol. 91, № 1. – P. 4–17.

2. Григорцевич, Л. Н. Бактериальный рак плодовых культур в Республике Беларусь / Л. Н. Григорцевич, А. Ф. Былинский // *НТИ и Рынок*. – 1996. – № 12. – С. 13–15.
3. Peng Lili. Characterization and Genetic Diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Isolates Associated with Rice Bacterial Leaf Spot in Heilongjiang, China / Peng Lili, Songrun Yang // *Biology*. – 2022. – Vol. 11, № 720. – <https://doi.org/10.3390/biology11050720>.
4. Aiello, D. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in Sicily and occurrence of copper-resistant strains / D. Aiello // *Journal of Plant Pathology*. – 2015. – Vol. 97, № 2. – P. 273–282.
5. Sundin, G. W. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* / G. W. Sundin, C. L. Bender // *Applied and environmental microbiology*. – 1993. – Vol. 59, № 4. – P. 1018–1024.
6. Balaž, J. Etiology of bacterial canker on young sweet cherry trees in Serbia / J. Balaž, R. Ilić, V. Ognjanov // *Journal of Plant Pathology* 2016. – Vol. 98, № 2. – P. 285–294.
7. Sulikowska, M. *Pseudomonas* spp. isolated from stone fruit trees in Poland / M. Sulikowska, P. Sobiczewski // *Zemdirbyste-Agriculture*. – 2008. – Vol. 95, No. 3. – P. 166–170.
8. Hwang, M. S. H. Phylogenetic Characterization of Virulence and Resistance Phenotypes of *Pseudomonas syringae* / M. S. H. Hwang // *Applied and environmental microbiology*. – 2005. – Vol. 71, № 9. – P. 5182–5191.
9. Rapid Evaluation of Pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a Lilac Tissue Culture Bioassay and Syringomycin DNA Probes / Heather J. Scheck [et al.] // *Plant Disease*. – 1997. – Vol. 81, № 8. – P. 905–910.
10. Lamichhane, Jay Ram. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture (A review) / Jay Ram Lamichhane // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2018. – Vol. 38, art. 28. – <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>.

ПОЗДРАВЛЯЕМ С ЮБИЛЕЕМ! (к 60-летию со дня рождения Татьяны Мирославовны Андрушкевич)

14 декабря 2023 года исполнилось 60 лет со дня рождения Андрушкевич Татьяны Мирославовны – кандидата сельскохозяйственных наук, доцента, ведущего научного сотрудника отдела ягодных культур РУП «Институт плодородства».



Татьяна Мирославовна Андрушкевич (урожд. Корженевская) родилась 14.12.1963 г. в д. Березки Глубокского района Витебской области в семье служащих. В 1981 г. окончила 10 классов Червенской средней школы № 2 имени А. К. Флегонтова с золотой медалью. В 1986 г. с отличием окончила биологический факультет Белорусского государственного университета и поступила в аспирантуру при БелНИИКПО (ныне НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству) по специальности «Плодородство». В 1989 г., после окончания аспирантуры, Т. М. Андрушкевич приступила к работе в должности младшего научного сотрудника лаборатории ягодных культур БелНИИКПО (ныне отдел ягодных культур РУП «Институт плодородства»). В 1997 г. Татьяну Мирославовну перевели на должность научного сотрудника как грамотного и высококвалифицированного специалиста, успешного селекционера-практика. Впоследствии, после подготовки и защиты диссертационной работы на тему «Исходный материал и селекция универсальных сортов крыжовника в Беларуси» на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство, Т. М. Андрушкевич была переведена на должность