

**МЕТОДИКИ, РЕКОМЕНДАЦИИ, ТЕХНОЛОГИИ,
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕГЛАМЕНТЫ**

УДК 634.10/2:632.35(083.13)
<https://doi.org/10.47612/0134-9759-2021-33-196-201>

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ
И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА
ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE****

В. Ю. ЛАГОНЕНКО, А. Л. ЛАГОНЕНКО, Н. В. КУХАРЧИК,
М. С. КАСТРИЦКАЯ, Н. П. МАКСИМОВА

РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: belhort@belsad.by

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный рак плодовых – широко распространенное заболевание, вызываемое грам-отрицательными бактериями *Pseudomonas syringae* van Hall. Пораженные насаждения отстают в росте, у них уменьшаются длина однолетнего прироста, размер листовой пластинки, высота кроны. Снижаются общий урожай и выход товарных плодов. При скоротечной форме заболевания деревья чаще всего погибают [1]. В 1997 г. в Республике Беларусь был зарегистрирован один из патоваров возбудителя бактериального рака плодовых – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [2]. В условиях республики наибольший вред данный фитопатоген наносит растениям груши и черешни. Также страдают насаждения яблони, вишни, сливы и других плодовых растений. Распространение заболевания напрямую зависит от устойчивости сортов плодовых, от погодных условий и соблюдения агротехнических приемов по уходу за садом. Своевременное обнаружение очага позволяет максимально снизить урон от болезни и предотвратить ее дальнейшее распространение [1, 2].

СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ И ЕЕ ВОЗБУДИТЕЛЕ

P. syringae van Hall – облигатная аэробная грамотрицательная палочковидная бактерия с двумя полярными жгутиками, диаметром 1 мкм и длиной 4–5 мкм. Штаммы *P. syringae* были изолированы более чем из 180 видов растений по всему миру. Разделение вида на патовары основано на их способности инфицировать определенные виды растений. В отличие от других патоваров данного вида, pv. *syringae* обладает огромным кругом растений-хозяев. Патоген, изначально выделенный из растений сирени, в дальнейшем был обнаружен более чем на 80 видах растений, включая косточковые и семечковые плодовые деревья, овощные и декоративные культуры [3–5].

* Рекомендации подготовлены в рамках проекта «Выделение и микробиологическая оценка штаммов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*, скрининг устойчивости сортов плодовых культур к бактериальному раку». Договор с БРФФИ № Б19МС-001 от 02.05.2019.

Рекомендованы к публикации ученым советом РУП «Институт плодоводства», протокол № 3 от 26.02.2021.

Общепринятое название болезни: бактериальный рак.

Возбудитель: *P. syringae* pv. *syringae*.

Синонимы: *P. syringae* van Hall.

Таксономическое положение: Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas, Pseudomonas syringae group, Pseudomonas syringae group genomsp. 1, Pseudomonas syringae, *P. syringae* pv. *syringae*.

Общепринятое название болезни: бактериальный рак, бактериальный рак плодовых культур, bacterial canker.

Другие названия болезни (англ.): Blast of stone fruit trees, blossom blast, blister bark of apple, apical necrosis, spur dieback.

Географическое распространение: заболевание распространено во всех регионах, где возделываются плодовые культуры.

Растения-хозяева: груша (*Pyrus communis* L.), яблоня (*Malus domestica*), черешня (*Prunus avium* L.), вишня (*Prunus cerasus* L.), абрикос (*Prunus armeniaca*), персик (*Prunus persica*), слива (*Prunus domestica*) и др.

ВРЕДНОСТЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Заболевание поражает все надземные части плодовых растений: ветви, штамб, почки, цветки, листья и плоды. При скоротечной форме болезнь носит характер апоплексии, т. е. внезапного и быстрого, в течение нескольких дней, усыхания всего дерева или частей кроны в период налива плодов. Хроническая форма связана с поражением скелетных частей дерева, появлением ран и некрозов на штамбе и ветвях [6]. Как правило, инфекция проникает в растение через цветки или спящие почки, а также через раневые поверхности (морозобоины, обрезка). Спящие почки также могут быть заражены бактериями, распространяющимися от ближайших язв, что приводит к симптому мертвой почки. Такая эндофитная инфекция особо опасна для молодых деревьев, ее быстрое распространение приводит к скорой гибели растения [7].

В некоторых районах Германии в отдельные годы наблюдалась гибель 30–40 % трех- и пятилетних деревьев косточковых культур. В США возбудитель бактериального рака приводил к гибели 70–75 % садов, во Франции – до 50 %. Также заболевание приводит к значительным потерям урожая, снижает товарные качества и лежкость плодов [6].

Следует отметить, что бактерии *P. syringae* pv. *syringae* синтезирует белок InaZ, который катализирует формирование кристаллов льда при температуре выше –1,2 °С, существенно влияя на холодоустойчивость растений [8, 9].

СИМПТОМЫ БОЛЕЗНИ

Кора в местах поражения бактериальным раком слегка западает. Сначала она бурая, рыхлая, пропитанная камедью (у косточковых культур) или влажная, затем кора подсыхает и шелушится, легко отслаиваясь от древесины. Раковые язвы на стволах и скелетных ветвях обычно впалые. Разрастаясь, они опоясывают ветви и ствол, что со временем приводит к гибели кроны или всего дерева [7]. Для косточковых культур в местах поражения характерно камедетечение [1].

Характерной особенностью проявления бактериального рака на яблоне служат красновато-коричневые некротические пятна и отслаивание верхнего слоя пораженной коры [6]. Также отмечаются подковообразные или округлые трещины до 2–3 см в диаметре, выпуклые вздутия (волдыри), удлиненные вдавленные участки коры [10]. Для груши характерны черные пятна вокруг нераспустившихся почек с четкой границей, отделяющей больную часть от здоровой. Такие же пятна можно наблюдать вокруг высохших прошлогодних побегов [6].

На листьях заболевание проявляется округлыми пятнами, окруженными хлоротичными кольцами. Со временем эти пятна высыхают и выпадают (shot-hole symptom). На черешне такие выпадения часто локализируются по краям листа, что приводит к скручиванию листовой пластины. На усыхающих концевых ветвях листья темнеют, приобретая буро-коричневую окраску, вы-

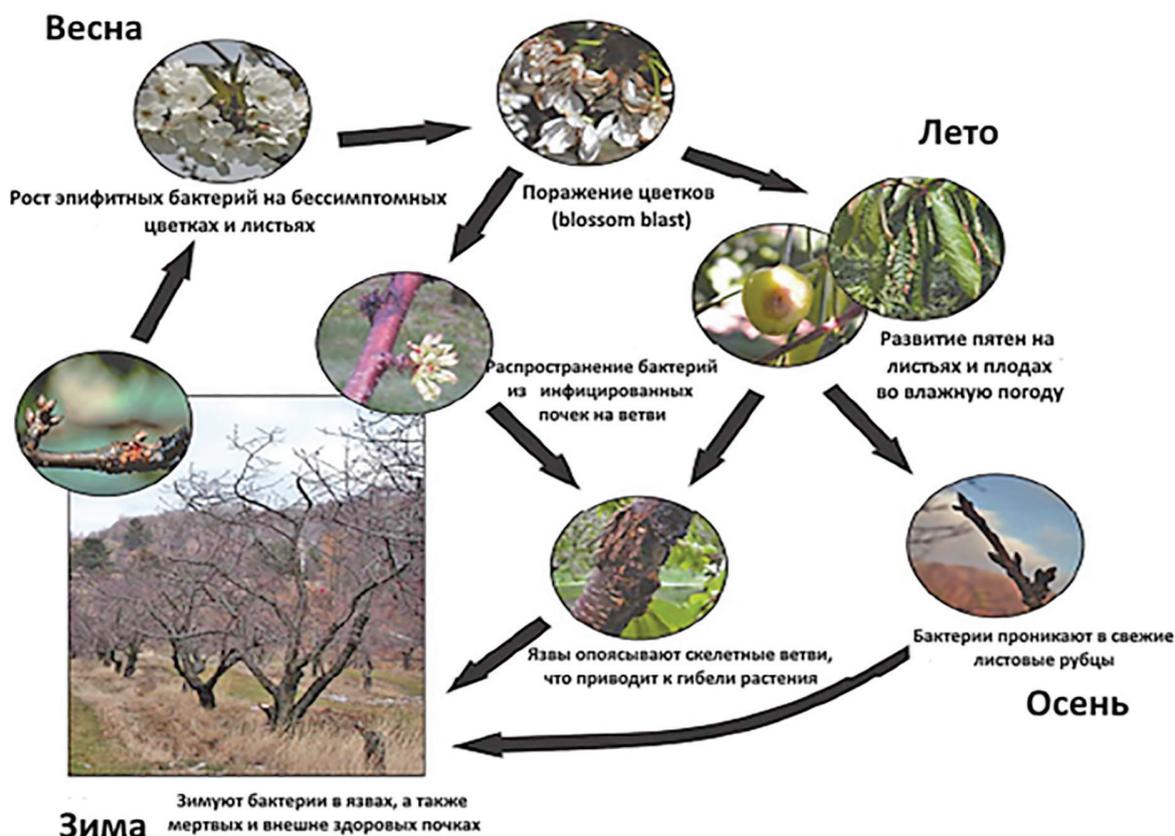
глядят обожженными [7]. На цветках инфекция проявляется в виде влажноватых коричневых, быстро разрастающихся пятен [6]. Пораженные бактериальным раком плоды становятся морщинистыми, чаще у основания появляются коричневые или черные пятна (у плодов сливы пятна вначале оливково-зеленые). У косточковых культур пятна чаще водянистые [6, 7]. Высохшие почки, цветки, листья и плоды не опадают и продолжительное время остаются висеть на дереве [6].

ЦИКЛ РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНИ

Цикл развития начинается весной. Из спящих почек и расположенных рядом язв большие популяции *P. syringae* pv. *syringae* попадают на цветки. Количество патогенов на один цветок может составлять 10^4 – 10^6 КОЕ. Симптомы заражения проявляются после продолжительного периода прохладной и влажной погоды или заморозков. Далее инфекция распространяется по древесине и приводит к возникновению язв [7].

Бактерии *P. syringae* pv. *syringae* имеют эпифитную и эндофитную фазы роста. Эпифитная фаза патогена может поражать листья, древесину, плоды, таким образом являясь источником постоянного заражения в течение всего вегетационного периода. В летний период, вследствие эндогенного распространения инфекции или из-за эпифитов, на плодах и листьях появляются пятна. Популяция эпифитов на протяжении этого времени сокращается, и возвращение до первоначального уровня происходит осенью или после осадков [7].

Местом зимовки патогена являются спящие почки. В них инфекция проникает осенью во время падения листьев через листовые рубцы. На перемещение *P. syringae* pv. *syringae* от поверхности листьев к месту будущего отрыва листа влияют низкая температура, осадки и ветер. Колонизированные спящие почки в большинстве случаев остаются здоровыми, но иногда происходит их отмирание и проявляются так называемый симптом мертвой почки и инициация бактериального рака. В здоровых почках бактерии переживают зиму и весной заражают цветки и листья [7]. Весь цикл развития показан на рисунке.



Цикл развития бактериального рака, вызванного *P. syringae* pv. *syringae* (адаптированный перевод)

ПРАВИЛА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ К ТЕСТИРОВАНИЮ

Для подтверждения этиологии заболевания отбираются образцы растительной ткани с признаками поражения бактериальным раком. В зависимости от органа, на котором проявляются симптомы, в качестве образца могут быть использованы почки, листья, цветки, плоды, стебли, участки коры и древесины. Во избежание ошибок диагностики желательно собирать материал с начальными признаками заболевания, так как в глубоко пораженных участках может содержаться большое количество посторонней микрофлоры. Все образцы должны иметь пограничную область между визуально здоровой и пораженной тканью. Каждый образец укладывается в отдельную, желательно стерильную тару (бумажный конверт, пакет, пластиковый контейнер и т. д.) и сопровождается запиской, содержащей информацию о дате и месте сбора, названии культуры и сорта и др.

Отбирать материал для исследования лучше всего в весенний и осенний периоды, так как бактерии *P. syringae* pv. *syringae* лучше развиваются в условиях прохладной и влажной погоды. Образцы для тестирования желательно принять в работу в день сбора, а при отсутствии такой возможности – хранить до момента исследования в холодных и влажных условиях. Для каждого образца используются стерильный инструмент и отдельная стерильная подложка. После использования образца скальпель стерилизуют в 96%-ном этаноле, обжигают в пламени спиртовки и дают остыть.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ

Стерильным скальпелем вырезается участок (2–5 см²) на границе визуально здоровой и пораженной ткани. Образец измельчают и помещают в колбы объемом 20 мл с 5 мл стерильного физиологического раствора. Раствор инкубируют на роторной качалке в течение 10 мин на скорости 240 об/мин. После инкубации 100 мкл суспензии высевают с помощью шпателя на полуселективную среду KingB (состав среды на 1000 мл дистиллированной воды: ферментативный пептон – 20 г, глицерин – 15 мл, K₂HPO₄(безв.) – 1,5 г, MgSO₄×7H₂O – 1,5 г, агар-агар – 15 г; pH 7,2±0,2) и культивируют 36–72 ч при 28 °С.

Для исследования бактерии отбирают по их способности продуцировать в питательную среду желто-зеленый пигмент пиовердин и флюоресцировать в проходящем УФ-свете. Колонии бактерий пересевают на отдельные чашки до получения чистой культуры.

Фитопатогенные бактерии *P. syringae* pv. *syringae* обладают набором физиолого-биохимических характеристик, которые можно определить при помощи следующих методик.

Способность вызывать реакцию гиперчувствительности. Бактериальные культуры инкубируют 24 ч на среде KingB. Затем производят смыв бактерий 3 мл физиологического раствора и вводят 20 мкл данной суспензии стерильным шприцем в листья табака (*Nicotiana tabacum*). Стерилизацию шприца проводят последовательно 70%- и 96%-ным этанолом, а затем промывают стерильным физиологическим раствором. В качестве отрицательного контроля используется такой же объем физиологического раствора. Реакция гиперчувствительности выражается в гибели клеток растения в месте инъекции фитопатогена [11].

Тест на продукцию левана. Исследуемые бактерии засевают на поверхность полноценного агара, содержащего 5 % сахарозы, и инкубируют в течение 3–5 дн. при температуре 28 °С. Бактерии, продуцирующие леван, образуют белые, мукоидные, тянущиеся колонии [11]. Бактерии *P. syringae* pv. *syringae* в этом тесте показывают положительный результат.

Тест на аргининдегидролазную активность. Основная среда (на 1000 мл воды: пептон ферментативный – 1 г, NaCl – 5 г, K₂HPO₄ – 0,3 г, L(+)-аргинин × HCl – 10 г, феноловый красный – 0,01 г, агар-агар – 15 г; pH 6,9–7,0. Среда стерилизуется на протяжении 15 мин при 0,5 атм. Среду разливают по 5 мл в стерильные пробирки и после охлаждения исследуемую культуру засевают путем укола. Каждую культуру засевают в две пробирки, одну из которых покрывают стерильным вазелиновым маслом. Результаты учитывают через 24–48 ч. В случае положительной реакции у бактерий, выращенных в анаэробных условиях, цвет среды изменяется с желтого на красный [11]. Бактерии *P. syringae* pv. *syringae* в этом тесте показывают отрицательный результат.

Тест на разжижение желатина. К жидкой полноценной среде добавляют 15 % желатина, после набухания его растворяют нагреванием. Автоклавируют среду в течение 15 мин при 0,5 атм и разливают в пробирки по 5 мл. Бактерии засевают путем укола. При наличии протеолитических ферментов, выделяющихся при росте культуры, наблюдается разжижение столбика желатина [11]. Бактерии *P. syringae* pv. *syringae* в этом тесте показывают положительный результат.

Определение оксидазы. Перед постановкой опыта готовится свежий 1%-ный водный раствор N',N'-диметилпарафенилендиамина. Несколько капель этого раствора наносится на 24-часовую культуру бактерий в чашке. Реактиву дают стечь, наклонив чашку. При положительной реакции через 1–3 мин культура окрашивается в пурпурный цвет. Бактерии *P. syringae* pv. *syringae* в этом тесте показывают отрицательный результат [11].

Тест на мацерацию растительной ткани. Чистый картофель разрезается поперек на кусочки толщиной 5 мм и помещается в чашку Петри на фильтровальную бумагу, смоченную физиологическим раствором. Тестируемую культуру наносят на центр картофельного диска. Мацерацию ткани оценивают через 2 сут с момента заражения. Бактерии *P. syringae* pv. *syringae* в этом тесте показывают отрицательный результат [11].

Полимеразная цепная реакция. Для подтверждения принадлежности изолятов к виду *P. syringae* pv. *syringae* используют метод ПЦР-диагностики с праймерами к генам *syrD* (5'-AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG-3' и *syrD2* 5'-GGCAATACCGAACAGGAACAC-3') и *syrB* (*B1* 5'-CTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3' и *B2* 5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3'). ПЦР проводят с использованием 0,5 мкл суспензии нативных клеток. Общий объем для ПЦР составляет 100 мкл. Состав реакционной смеси: по 10 пмоль каждого праймера; 0,2 ед. Таq ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого из дНТФ; 16 мМ сульфата аммония; 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3); 1,5 мМ MgCl₂; 50 мМ KCl. Параметры амплификации: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 40 с (35 циклов); 72 °C – 5 мин. Продуктом амплификации с праймерами к гену *syrD* является фрагмент длиной 446 п. н., к гену *syrB* – 752 п. н. [12]. Продукты амплификации разделяют электрофорезом в 0,8–1,0%-ном агарозном геле.

Искусственное заражение незрелых плодов. Данный метод используется для определения растений-хозяев патогена.

Бактериальные клетки культивируют в течение 24 ч на среде KingB, затем ресуспендируют в стерильной дистиллированной воде до концентрации 10⁷ КОЕ/мл (ОП₆₀₀ = 0,5). Эксперимент выполняют с использованием свежесобранных незрелых плодов (например, вишни и груши). Плоды стерилизуют погружением в 50%-ный этанол на 3 мин, затем промывают стерильной дистиллированной водой и помещают в контейнеры на увлажненную фильтровальную бумагу. Каждый плод прокалывают трижды на глубину 2–4 мм (для вишни и груши соответственно) иглой, смоченной в бактериальной суспензии. Контролем служат плоды, которые инокулируют стерильной дистиллированной водой. Контейнеры хранят в условиях высокой влажности при температуре 25–28 °C на протяжении 96 ч. Наличие некротических повреждений оценивают визуально через 24, 48 и 96 ч [4, 13, 14].

Определение вирулентности штаммов. Для инокуляции используют однолетние подвои (например, груши). Штаммы *P. syringae* pv. *syringae* культивируют с аэрацией в жидкой среде KingB (или ППБ) в течение 24 ч при 28 °C и доводят стерильной дистиллированной водой до плотности 10⁸ КОЕ/мл (OD₆₀₀ = 0,3).

На каждом растении выбирают три приблизительно одинаковых по размеру листа. По середине центральной жилки стерильным скальпелем делают надрез, на который наносят 20 µl бактериальной суспензии. Каплям дают немного подсохнуть, чтобы жидкость не стекала по поверхности листа. После инокуляции растения культивируют при температуре 24 °C на протяжении 7 дн. Для поддержания влажности на сеянцы надевают полиэтиленовые пакеты и регулярно поливают. В качестве отрицательного контроля используют растения, инокулированные стерильной дистиллированной водой. Для учета динамики развития заболевания величину пораженных участков измеряют ежедневно. Каждому участку присваивают баллы по шестибальной шкале: 0 баллов – отсутствие симптомов заражения; 1 балл – диаметр зоны некроза до 3 мм; 2 балла –

диаметр некроза до 10 мм; 3 балла – диаметр некроза до 25 мм; 4 балла – диаметр некроза 30–35 мм; 5 баллов – поражено более половины поверхности листа. Интенсивность развития заболевания (S) выражают в процентах и рассчитывают по формуле:

$$S = \frac{\sum_{n=1}^N I_n}{NI_{\max}},$$

где I_n – соответствующий уровень интенсивности развития заболевания, N – число инокулированных соответствующим бактериальным изолятом листьев, I_{\max} – максимальный индекс развития заболевания [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают общие сведения о болезни и ее возбудителе, характеризуют вредоносность заболевания, симптомы и цикл развития болезни. Регламентируют правила отбора образцов и их подготовку к тестированию, методики выявления патогена, идентификации и определения вирулентности штаммов. Применение рекомендаций в практическом плодоводстве позволяет выявить *P. syringae* pv. *syringae* на ранних стадиях и предотвратить распространение особо опасного бактериального патогена в насаждениях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Григорцевич, Л. Н. Защита плодовых деревьев от болезней в садах интенсивного типа : метод. указания / Л. Н. Григорцевич. – Минск, 2010. – 16 с.
2. Копиця, В. Н. Раковые заболевания скелетных частей яблони в Беларуси / В. Н. Копиця // Изв. Акад. аграр. наук Респ. Беларусь. – 1997. – № 4. – С. 58–62.
3. Hirano, Susan S. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte / Susan S. Hirano, Christen D. Upper // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – Vol. 64, № 3. – P. 624–653.
4. 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. Kaluzna, J. D. Janse, J. M. Young // J. Plant Pathol. – 2012. – № 94, suppl. 1. – P. 1.117–1.126.
5. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from Stone Fruits / K. Gašić [et al.] // Pestic. Phytomed. (Belgrade). – 2012. – Vol. 27, № 3. – P. 219–229. – DOI: 10.2298/PIF1203219G.
6. Гвоздяк, Р. И. Методические указания по диагностике и мерам борьбы с бактериальным некрозом и ожогом плодовых культур / Р. И. Гвоздяк, Е. В. Матвеева, М. А. Чумаевская. – М., 1987. – 30 с.
7. Kennelly, Megan M. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees. Progress toward understanding and control / Megan M. Kennelly, Francisco M. Cazorla, Antonio de Vicente // Plant Disease. – 2007. – Vol. 91, № 1. – P. 4–17.
8. Cochet, N. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae* / N. Cochet, P. Widehem // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 54, № 2. – P. 153–161.
9. Sulikowska, M. *Pseudomonas* spp. isolated from stone fruit trees in Poland / M. Sulikowska, P. Sobiczewski // Zemdirbyste-Agriculture. – 2008. – Vol. 95. – P. 166–170.
10. Dhanvantari, B. N. Occurrence of bacterial canker of sweet cherry and plum in Ontario / B. N. Dhanvantari // Can. Plant Dis. Surv. – 1969. – Vol. 49, № 1. – P. 5–7.
11. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. – Минск, 2006. – С. 64–65.
12. 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 // Appl. Environ. Microbiol. Jan. – 1998. – P. 226–230.
13. Moragrega, Concepció. Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays / Concepció Moragrega, Isidre Llorentem, Charles Manceau // Eur. J. Plant Pathol. – 2003. – Vol. 109. – P. 319–326.
14. Genomic and pathogenetic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from apricot in East Azerbaijan province, Iran / Y. Vasebi [et al.] // Biocatal. Agric. Biotechnol. – 2019. – Vol. 19. – P. 101–167.

Поступила в редакцию 02.03.2021