

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ ПОЛЕВЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ XANTHOMONAS CAMPESTRIS

Майоров Павел Сергеевич, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Ляшенко Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Хайсанова Владислава Сергеевна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, Ульяновская область, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1

тел.: +7 (8422) 55-95-35

e-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

Ключевые слова: бактерии, *Xanthomonas campestris*, патогенность, капустные, фитопатоген, бактериоз, бактериофаг.

Грамотрицательная бактерия *Xanthomonas campestris*, являющаяся возбудителем бактериальных болезней многих культурных растений, ежегодно приводит к значительным экономическим потерям во многих странах мира. Разработка современных методов борьбы с данным фитопатогеном является актуальной задачей для сельского хозяйства. Одним из перспективных методов является применение бактериофагов, для отбора которых требуется работа непосредственно с бактериями, обладающими патогенными свойствами по отношению к естественным растениям-хозяевам. В данной работе представлены результаты изучения патогенности имеющейся коллекции микроорганизмов по отношению к различным сортам капусты. В качестве объекта исследования были использованы 38 штаммов бактерий *Xanthomonas campestris*. Изучение патогенности выбранных культур проводили методами изучения гиперчувствительности на растениях табака и путем инфильтрации в естественные растения-хозяева. Проведенные исследования показали, что бактерии обладали различной степенью активности по отношению к сортам капусты F1, Агамер 611 и Сибирячка 60. При этом 21 из 38 исследуемых штаммов проявляли свои патогенные свойства на растениях всех трех сортов. В большинстве случаев на листьях растений были обнаружены характерные V-образные поражения, которые со временем приводили к увяданию всего листа. В отдельных случаях наблюдалось появление некрозов в местах инокуляции исследуемого штамма бактерий. Анализ времени проявления симптомов бактериоза показал, что штаммы, ранее выделенные из пораженных растений, визуально проявляли свои патогенные свойства на 5-6 дней раньше, чем штаммы, выделенные из семенного материала. Полученные результаты в дальнейшем будут использованы для отбора бактериофагов с наибольшим спектром действия в отношении бактерий, обладающих патогенными свойствами.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2022 году. Регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 122030200369-2

Введение

Бактерии вида *Xanthomonas campestris* являются одними из наиболее экономически важных фитопатогенов в мире, поражающих многие культурные растения, в том числе семейства Крестоцветные, вызывая V-образные поражения на краях листьев и почерневшие жилки [1 - 4]. Бактерии *Xanthomonas campestris* живут эпифитно на поверхности листьев, заражают растения-хозяина, колонизируя сосудистую систему многих Крестоцветных [5].

Растения выработали различные защитные механизмы против патогенов. Однако эффективность имеющихся на вооружении у растений средств недостаточно, особенно в тех случаях, когда условия внешней среды благоприятствуют распространению и развитию патогена

[6 - 7].

В связи с этим актуальной является разработка современных средств защиты культурных растений от воздействия фитопатогенов, к которым среди прочих относится применение фаговых биопрепаратов [8 - 9]. Однако, для конструирования эффективного фагового препарата немаловажным является работа непосредственно с активными патогенами, способными поражать не только растение-хозяина, с которого они были получены, но и смежные сельскохозяйственные культуры [10-11]. В связи с этим целью данного исследования являлась оценка патогенных свойств имеющейся коллекции бактерий *Xanthomonas campestris*.

Материалы и методы исследований

Бактериальные штаммы

В процессе работы была использована имеющаяся коллекция бактерий *Xanthomonas campestris*, состоящая из 35 штаммов [12]. Для проведения сравнительного анализа использовали референс-штаммы бактерий, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) – В-570, В-610, В-611.

Питательные среды

В качестве основной плотной питательной среды была использована среда YDC: дрожжевой экстракт - 10,0 г/л; глюкоза - 20,0 г/л; карбонат кальция - 20,0 г/л; агар-агар - 15,0 г/л. Жидкую питательную среду использовали следующего состава: триптона -10,0 г/л; дрожжевого экстракта – 5,0 г; NaCl – 10,0 г/л.

Приборы и оборудование: лабораторная бактериологическая посуда, водяная баня, термометр ртутный, дистиллятор, шкаф сушильно-стерилизационный ШСС – 80, автоклав ГК-100-3, холодильники минусовые и бытовые, термостат ТС-80М-2.

Изучение патогенности по наличию гиперчувствительной реакции на растении табака

Оценку патогенности проводили путем инокуляции с помощью шприца для подкожных инъекций разбавленной суспензии бактериальной культуры в листья табачных растений. Патогенность исследуемых культур оценивали по наличию некроза в течение 24 часов после инокуляции.

Изучение патогенности методом инфильтрации

Оценку патогенности выделенных штаммов по отношению к растению-хозяину проводили методом инфильтрации, для чего вводили бактериальную суспензию в межклеточное пространство листьев с помощью шприца для подкожных инъекций 26-го калибра. Иглу шприца вставляли под эпидермис с дорсальной стороны листа. За развитие инфекции наблюдали в течение 1 месяца с еженедельной фиксацией результата в первой половине и каждые 1-2 дня во второй половине месяца.

Статистическая обработка проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты исследований

Проведенные исследования показали, что на растении табака все 38 используемых штаммов бактерий *Xanthomonas campestris* проявили свои патогенные свойства. Спустя 24 часа после

инокуляции на листьях наблюдались следы некроза размером от 10 до 40 % поверхности листа.

Далее исследуемые штаммы были инокулированы в естественные растения-хозяева, в качестве которых использовали капусты трех сортов: F1, Агамер 611, Сибирячка 60. В той или иной степени патогенными по отношению к выбранным сортам растений оказались 37 из 38 используемых штаммов бактерий. Появление симптомов инфекции наблюдалось не ранее 12 суток после инокуляции соответствующего штамма. При этом патогенные штаммы в первые дни проявления инфекции вызывали как характерные, так и нехарактерные для данного возбудителя симптомы. В 80% случаев наблюдали характерные V-образные поражения по краям листьев, что впоследствии приводило к увяданию всего листа.

Таблица

Патогенность *Xanthomonas campestris* по отношению к различным сортам капусты

Штамм	F1	Агамер 611	Сибирячка 60	Штамм	F1	Агамер 611	Сибирячка 60
СК-1	+	+	+	СК-12	+	-	+
СК-2	+	-	+	СК-13	-	-	+
СК-3	-	-	+	СК-14	+	+	+
СК-4	+	+	+	СК-15	+	+	+
СК-5	+	+	+	СК-16	+	+	+
СК-6	+	+	+	СК-17	+	+	+
СК-7	+	+	-	СК-18	+	+	+
СК-8	-	-	+	СК-19	-	+	+
СК-9	+	+	+	СК-20	-	-	-
СК-10	+	+	+	СК-21	+	+	+
СК-11	-	-	+	СК-22	+	+	+
Хс1-УлГАУ	+	+	-	Хс2-УлГАУ	+	+	-
Хс9-УлГАУ	+	+	+	Хс12-УлГАУ	+	+	+
Хс18-УлГАУ	+	-	+	Хс22-УлГАУ	+	+	+
Х1-УлГАУ	+	+	+	Х2-УлГАУ	+	+	+
Х3-УлГАУ	+	+	+	Х4-УлГАУ	-	-	-
Х5-УлГАУ	-	-	+	Х6-УлГАУ	+	+	-
Х7-УлГАУ	+	+	+	В-570	+	+	-
В-610	+	+	+	В-611	-	-	+

Из исследуемых штаммов Х4-УлГАУ не обладал патогенностью по отношению к используемым сортам капусты. В остальных случаях наблюдались различные результаты. Так, из 38 штаммов 21 проявлял патогенность ко всем используемым в исследовании сортам капусты. В

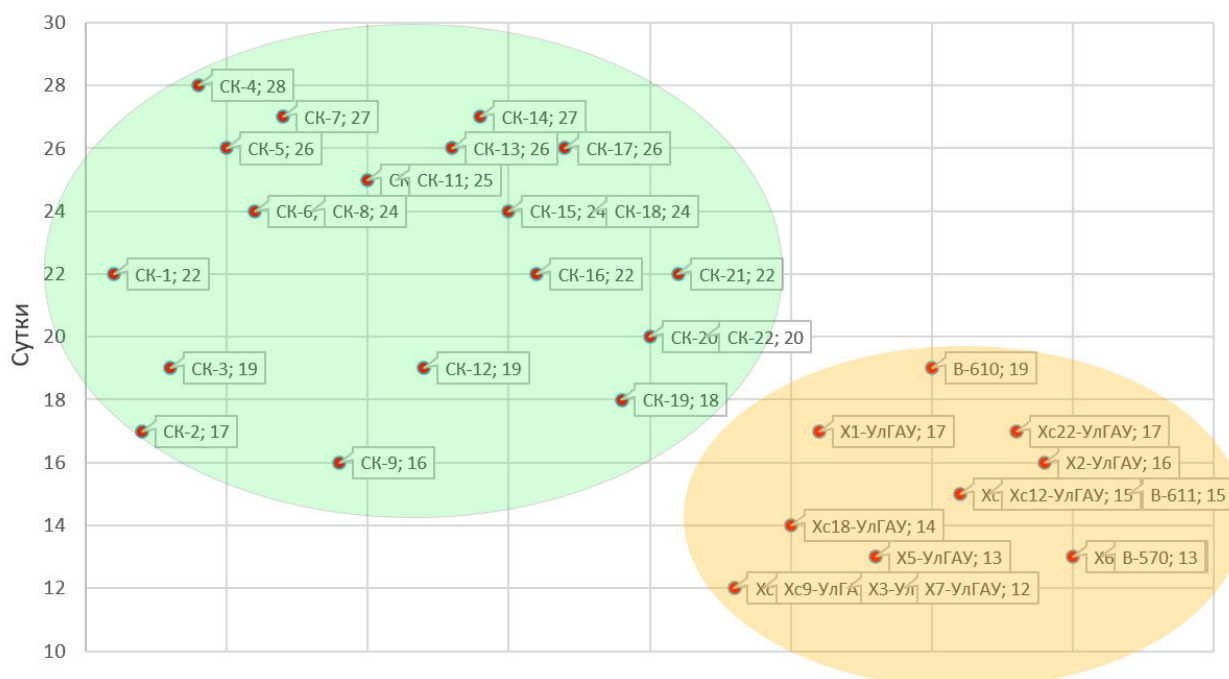


Рис. - Скорость проявления симптомов поражения бактериозом (сутки)

остальных случаях наблюдались смешанные результаты.

В дополнение был проведен анализ скорости проявления симптомов инфекции на естественных растениях-хозяевах. Результаты исследования приведены на рисунке.

Полученные данные показали, что симптомы поражения бактериозом проявлялись на тестируемых образцах капусты не ранее, чем на 12 суток. Из рисунка видно, что все изученные штаммы можно разделить на 2 группы по скорости проявления патогенных свойств. Так, в первую группу входят культуры, выделенные в свое время непосредственно из зараженных растений (желтый цвет), в то время, как вторая группа сформирована штаммами, выделенными из семян капусты (зеленый цвет).

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что штаммы бактерий, выделенные непосредственно из пораженных растений, либо из семенного материала практически на 100% являются патогенными по отношению к растениям-хозяевам. При этом многие штаммы проявляют свои патогенные свойства по отношению к различным сортам капусты. Единственный штамм, который в данном исследовании продемонстрировал отрицательный результат патогенности, с высокой вероятностью является патогенным для очень узкой группы капустных культур. При этом стоит сказать, что выделен он был также из рас-

тения с типичными признаками наличия бактериоза и обладал характерными для бактерий *Xanthomonas campestris* биологическими свойствами.

Отдельно стоит обратить внимание на скорость проявления исследуемыми штаммами симптомов инфекции на естественных растениях-хозяевах. Бактерии, выделенные из пораженных растений, проявляли свои патогенные свойства в среднем быстрее, чем штаммы, выделенные из семян капусты. Обусловлено это может быть тем, что в первом случае бактерии гораздо быстрее приспосабливаются к той среде обитания, из которой они были выделены, тогда как во втором случае бактериям необходимо определенное время для перестройки.

Заключение

Проведенные исследования показали, что из 38 исследуемых штаммов патогенными свойствами к выбранным сортам капусты обладали 37, из них 34 штамма являлись «полевыми» культурами, полученными в основном из растений с признаками бактериоза или семенного материала.

Изучение скорости проявления симптомов инфекции также позволило разделить исследуемые культуры на 2 группы. Первая, выделенные из пораженных растений, проявляла патогенные свойства в среднем на 5-6 суток раньше, чем вторая, выделенные из семян капусты.

Библиографический список

1. Black rot of crucifers / A. M. Alvarez, A. J. Slusarenko, R. S. S. Fraser, L. C. van Loon // *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (Dordrecht: Springer). - 2000. - P. 21–52.
2. Fatmi, M. *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material* / M. Fatmi, R. R. Walcott, N. W. Schaad. - Second Edition. - 2016. - P. 360.
3. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal / B. D. Jensen, J. G. Vicente, H. K. Manandhar [et al.] // *Plant Dis.* - 2010. - Vol. 94. - P. 298-305.
4. Occurrence and Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Vegetable Brassica Fields in Nepal / B. Jensen, J. Vicente, H. Manandhar, S. Roberts // *Plant Disease.* - 2010. - № 94. - P. 298-305.
5. Danhorn, T. Biofilm formation by plant-associated bacteria / T. Danhorn, C. Fuqua // *Annu. Rev. Microbiol.* - 2007. - № 61. - P. 401–422.
6. Bostock, R. M. Predisposition in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response / R. M. Bostock, M. F. Pye, T. V. Roubtsova // *Annu. Rev. Phytopathol.* - 2014. - № 52. - P. 517–549.
7. Corzo, M. First report of *Xanthomonas campestris* causing black rot of chard in Cuba / M. Corzo, M. Quiñones, K. Pauls // *New Disease Reports.* - 2019. - Vol. 39. - P. 13.
8. Balogh, B. Phage Therapy for Plant Disease Control / B. Balogh, J. Jones, F. Iriarte // *Current pharmaceutical biotechnology.* - 2009. - 11. - P. 48-57.
9. Jones, J. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. Jones, G. Vallad, F. Iriarte // *Bacteriophage.* - 2012. - № 2. - P. 208-214.
10. Lu, T. K. The next generation of bacteriophage therapy / T. K. Lu, M. S. Koeris // *Curr.Opin.Microbiol.* - 2011. - № 14. - P. 524-531.
11. Silva, Y. J. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture / Y. J. Silva, L. Costa, C. Pereira // *Microb. Biotechnol.* - 2014. - Vol. 7. - P. 401–413.
12. Майоров, П. С. Выделение, идентификации и изучение биологических свойств бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / П. С. Майоров, Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев // *Естественные и технические науки.* - 2019. - № 4(130). - С. 25-30.

STUDY OF PATHOGENICITY OF FIELD STRAINS OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS BACTERIA

Maierov P.S., Feoktistova N.A., Suldina E.V., Khaisanova V.S.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU
432017, Ulyanovsk region, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1
tel. : +7 (8422) 55-95-35
e-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

Key words: bacteria, *Xanthomonas campestris*, pathogenicity, cabbage, phytopathogen, bacteriosis, bacteriophage.

Gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris*, which is the causative agent of bacterial diseases of many cultivated plants, annually leads to significant economic losses in many parts of the world. The development of modern methods of combating this phytopathogen is an urgent task for agriculture. One of the promising methods is the use of bacteriophages, the selection of which requires working directly with bacteria that have pathogenic properties in relation to natural host plants. This paper presents the results of studying the pathogenicity of the existing collection of microorganisms in relation to various varieties of cabbage. 38 strains of *Xanthomonas campestris* bacteria were used as the object of the study. The pathogenicity of the selected crops was studied by methods of studying hypersensitivity on tobacco plants and by infiltration into natural host plants. Studies have shown that the bacteria had varying degrees of activity in relation to cabbage varieties F1, Agamer 611 and Siberian 60. At the same time, 21 of the 38 strains studied showed their pathogenic properties on plants of all three varieties. In most cases, characteristic V-shaped lesions were found on the leaves of plants, which eventually led to the withering of the entire leaf. In some cases, necrosis was observed at the sites of inoculation of the studied strain of bacteria. Analysis of the time of manifestation of symptoms of bacteriosis showed that strains previously isolated from affected plants visually showed their pathogenic properties 5-6 days earlier than strains isolated from seed material. The obtained results will be used in the future to select bacteriophages with the greatest spectrum of action against bacteria with pathogenic properties.

Bibliography:

1. Black rot of crucifers/ A. M. Alvarez, A. J. Slusarenko, R. S. S. Fraser, L. C. van Loon // *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (Dordrecht: Springer). - 2000. - P. 21–52.
2. Fatmi, M. *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material* / M. Fatmi, R. R. Walcott, N. W. Schaad. - Second Edition. - 2016. - P. 360.
3. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal / B. D. Jensen, J. G. Vicente, H. K. Manandhar [et al.] // *Plant Dis.* - 2010. - Vol. 94. - P. 298-305.
4. Occurrence and Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Vegetable Brassica Fields in Nepal / B. Jensen, J. Vicente, H. Manandhar, S. Roberts // *Plant Disease.* - 2010. - № 94. - P. 298-305.
5. Danhorn, T. Biofilm formation by plant-associated bacteria / T. Danhorn, C. Fuqua // *Annu. Rev. Microbiol.* - 2007. - № 61. - P. 401–422.
6. Bostock, R. M. Predisposition in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response / R. M. Bostock, M. F. Pye, T. V. Roubtsova // *Annu. Rev. Phytopathol.* - 2014. - № 52. - P. 517–549.
7. Corzo, M. First report of *Xanthomonas campestris* causing black rot of chard in Cuba / M. Corzo, M. Quiñones, K. Pauls // *New Disease Reports.* - 2019. - Vol. 39. - P. 13.
8. Balogh, B. Phage Therapy for Plant Disease Control / B. Balogh, J. Jones, F. Iriarte // *Current pharmaceutical biotechnology.* - 2009. - 11. - P. 48-57.
9. Jones, J. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. Jones, G. Vallad, F. Iriarte // *Bacteriophage.* - 2012. - № 2. - P. 208-214.
10. Lu, T. K. The next generation of bacteriophage therapy / T. K. Lu, M. S. Koeris // *Curr.Opin.Microbiol.* - 2011. - № 14. - P. 524-531.
11. Silva, Y. J. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture / Y. J. Silva, L. Costa, C. Pereira // *Microb. Biotechnol.* - 2014. - Vol. 7. - P. 401–413.
12. Майоров, П. С. Выделение, идентификации и изучение биологических свойств бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* / П. С. Майоров, Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев // *Естественные и технические науки.* - 2019. - № 4(130). - С. 25-30