

Л.А. Пасичник, Е.А. Савенко, Л.Н. Буценко, Т.Н. Щербина, В.Ф. Патыка

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев МСП, Д 03680, Украина

## ***PSEUDOMONAS SYRINGAE* – ВОЗБУДИТЕЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СОРНЯКОВ**

В посевах пшеницы, выращенной в разных системах земледелия, выявлены и описаны симптомы бактериальных заболеваний сопутствующих сорняков. На основании морфологических, биохимических и серологических свойств возбудитель, изолированный из подмаренника цепкого, мари белой, ежовника обыкновенного, редьки дикой, пырея ползучего, хвоща полевого, вьюнка полевого и осота полевого идентифицирован как *Pseudomonas syringae*. Установлено серологическое родство бактерий из сорняков с возбудителем бактериальных болезней зерновых культур.

Ключевые слова: пшеница, сорняки, бактериальные болезни, *Pseudomonas syringae*.

Реакция природы на стабилизацию изменяющихся экологических условий развития агрофитоценозов – это не что иное, как повреждение их вредителями и болезнями, засоренность посевов сельскохозяйственных растений. Недостаточные сведения об экологических и биологических особенностях сорных растений, их болезнях и возбудителях усложняют возможности прогнозирования их вредности в посевах, что сопровождается снижением продуктивности и качества возделываемых культур [5]. Здоровые сорняки в посевах сельскохозяйственных культур являются экологической нишей фитопатогенных бактерий [3, 4, 10] и могут сами поражаться возбудителями болезней.

Данные о поражении сорняков бактериальными болезнями немногочисленны. В научной литературе есть сообщения о бактериальной пятнистости листьев вьюнка полевого (*Convolvulus arvensis*) в Индии, которую вызывает *Xanthomonas campestris* pv. *convolvuli* [11], вьюнка китайского (*Ipomoea aquatica*) в Таиланде, возбудитель *X. campestris* [14], канадского осота полевого (*Cirsium arvense*), возбудитель *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* [15]. В Украине определены возбудители бактериальных болезней листьев вьюнка полевого и хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.) [7, 8].

Кроме того выявлено аллелопатическое воздействия однодольных и двудольных сорных растений (вьюнок полевой, щетинник – *Setaria viridis* и овсюг – *Avena fatua*) на проростки пшеницы [5]. Понимание того, как те или другие сорняки реагируют на различные системы земледелия, имеет существенное значение при разработке эффективных программ контроля сорняков.

Целью нашей работы было выявление спектра поражения фитопатогенными бактериями рода *Pseudomonas* различных видов сорняков в посевах пшеницы в традиционной и органической системах земледелия.

**Материалы и методы.** Мониторинг поражений сорняков в агрофитоценозах пшеницы, выращиваемой в системах интенсивного и органического земледелия проводили на опытных полях ННЦ «Институт земледелия НААН». Сорт пшеницы Столичная. Варианты опытов включали участки с обработкой пестицидами и без обработки и внесения минеральных удобрений. На полях ПП «Агроэкология» Шишацкого района, Полтавской области, где более 20 лет используют органическое земледелие, обследованы посевы пшеницы сортов Левада, Подолянка, Косач и Скайген. В Бахмаче Черниговской области обследована пшеница сортов Бенефис, Полесская 90, Отборная. Отбирали листья и стебли с признаками поражения подмаренника цепкого (*Galium aparine* L.), мари белой (*Chenopodium album* L.), ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv), редьки дикой (*Raphanus raphanistrum* L.), пырея ползучего (*Elytrigia repens* (L.) Nevski), хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.), вьюнка полевого (*Convolvulus arvensis* L.), осота полевого (*Sonchus arvensis* L.) и других сорняков. Бактерии изолировали в течение всего вегетационного периода. Бактериологический анализ и изоляцию бактерий проводили по общепринятым методикам [13]. Патогенные свойства

© Л.А. Пасичник, Е.А. Савенко, Л.Н. Буценко, Т.Н. Щербина, В.Ф. Патыка, 2013

отобранных изолятов бактерий определяли путем искусственного заражения сорняков. Для искусственного заражения использовали суспензию бактерий плотностью  $1 \times 10^9$  КОЕ в мл стерильной водопроводной воды, которую наносили на поверхность листьев растений с последующим ранением тройником или вводили в стебель сорняков путем инъекции шприцем. Повторность опытов 5–7-кратная. Учет искусственного заражения проводили по 5-бальной шкале [3]. Морфологические, культуральные, биохимические свойства бактерий исследовали по описанным методам [1,2]. Серологические свойства изолятов бактерий изучали с использованием антисывороток к штаммам пяти серологических групп *Pseudomonas syringae* (I, II, IV, V, VI), которые встречаются на зерновых культурах. Для сравнительных исследований использовали типовой штамм *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 (УКМ В-1027) и неопатогенный – *P. syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394 (УКМ В-1011) из коллекции культур отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Бактерии идентифицировали, сравнивая их свойства с характеристиками коллекционных штаммов и согласно Определителю Берги [9].

**Результаты и их обсуждение.** Показано, что среди однолетних сорняков в посевах пшеницы преобладали подмаренник цепкий (ПП «Агроэкология», г. Бахмач) и марь белая (ПП «Агроэкология»). Редька дикая присутствовала в незначительном количестве в посевах пшеницы (ННЦ «Институт земледелия НААН» и ПП «Агроэкология»), а ежовник обыкновенный встречался лишь на распределительных полосах и обочинах. На полях пшеницы ННЦ «Институт земледелия НААН», в вариантах интенсивного земледелия сорняки почти отсутствовали, лишь встречались единичные растения хвоща полевого, подмаренника цепкого, фиалки полевой. Следует отметить, что на полях пшеницы ННЦ «Институт земледелия НААН» видовой состав сорняков был менее разнообразен, чем на производственных полях ПП «Агроэкология». На всех обследованных полях ПП «Агроэкология» сорняки присутствовали в значительном количестве и практически без признаков поражения. Четко прослеживалась тенденция зависимости уровня засоренности посевов от плотности посева и высоты пшеницы. Чем плотнее посев и выше пшеница, тем меньше сорняков.

Симптомы естественного поражения фитопатогенами ежовника обыкновенного представляли собой темно-коричневые водонасыщенные штриховатые пятна, расположенные на центральной жилке и окружены мелкими ржавыми точками.

Вдоль боковых краев и на верхушке листовой пластинки подмаренника цепкого ткань становилась бордового цвета без признаков увядания и усыхания. Иногда эта ткань постепенно приобретала коричневый оттенок и засыхала. Усыхания распространялось с краев листа к центру и приводило к повреждению 1/2 листовой пластинки. На хорошо развитых растениях симптомы поражения были незначительные.

На отдельных растениях мари белой наблюдали пятна прямоугольной формы, размером 5 x 10 мм. Пораженные участки были коричневого цвета со светло-коричневыми и бордовыми вкраплениями с темно-коричневой, иногда коричнево-бурой, каймой и слабым хлорозом, расположены ближе к краю листа.

На полях ННЦ «Институт земледелия НААН» и ПП «Агроэкология» пораженные участки редьки дикой представляли собой серовато-коричневые пятна округлой формы, с более темным центром, без каймы, с хлорозным ореолом.

Хвощ полевой произрастал на всех обследованных полях. На незначительном количестве растений на корневой шейке и стебле образовывались темно-коричневые, почти черные, маслянистые штрихообразные или удлиненные пятна. Ржавые и темно-коричневые поражения хвоща полевого охватывали большую часть иголки или распространялись на всю иголку. На поздних фазах развития пшеницы количество пораженных сорняков увеличивалось.

Поражения вьюнка полевого имели вид коричневых пятен овальной и неправильной угловатой формы, иногда напоминали прямоугольник, с темно-коричневой каймой, некротизированная ткань которых со временем растрескивалась и рассыпалась. Пятна размещались посередине, вдоль центральной жилки, и ближе к краю и кончика листа, в виде ожога. Иногда пораженная ткань вьюнка полевого (Бахмачский район) от центральной жилки и к краю листа окрашивалась в желтый цвет, местами с оранжевым оттенком и хлорозной зоной.

На пырее ползучем наблюдали поражения в виде красновато-коричневых и ржавых точечных или штриховатых некрозов вдоль центральной жилки, часть из которых окружены светло-коричневой каймой и многочисленными мелкими белыми пятнами, которые разбросаны по всей листовой пластинке.

Единичные растения осота полевого с признаками бактериального поражения присутствовали только на полях пшеницы ННЦ «Институт земледелия НААН». Поражения имели вид хлороза кончика листа и темно-коричневых пятен ближе к краю листовой пластинки, вокруг которых развивался хлороз.

Проанализировано 233-и образца пораженных сорняков, из которых изолировано 372 изолята бактерий. 103 культуры бактерий были патогенными для сорняков, из которых они выделены. Отобранные патогенные изоляты отличались морфологией колоний и представляли пять морфотипов (табл. 1).

Из 61 изолята бактерий, колонии которых серые, прозрачные или полупрозрачные, с плоским или вогнутым центром и волнистыми краями отобраны 49 оксидазоотрицательных изолятов для дальнейших исследований (табл. 2). В основном, все изоляты бактерий высокоагрессивные, но гетерогенные по агрессивности к сорнякам, из которых они выделены – от 2-х до 5-ти баллов (табл. 2). Больше патогенных изолятов бактерий выделено из сорняков в фазе полной спелости пшеницы.

Таблица 1

Морфотипы колоний бактерий

Цвет и морфология колоний	Количество выделенных изолятов из мест отбора образцов:		
	ННЦ «Институт земледелия НААН», Киевская обл.	ПП «Агроэкология» Полтавская обл.	Черниговская область, Бахмач
Серые, прозрачные, плоские или с приподнятым центром, блестящие, края волнистые	19	19	6
Белые, выпуклые, гладкие, блестящие, края ровные	8	0	9
Бежевые, плоские, гладкие, края ровные	3	2	3
Желтые, выпуклые или с конусообразным центром, непрозрачные, края ровные	18	1	11
Розовые, непрозрачные, выпуклые	2	1	1
Всего	50	23	30

При искусственном заражении изоляты с вьюнка полевого на листьях образовывали водонасыщенные пятна, которые впоследствии приобретали бежевую или светло-коричневую окраску. На осоте полевым патогенные изоляты бактерий вызывали на листьях некрозы округлой, угловатой формы, которые по краю листа выглядели в виде ожогов. На стеблях развивались небольшие светло-серые эллипсоидные пятна, водонасыщенные, маслянистые, более темные по краю, четко окаймленные.

Следует отметить, что молодые растения вьюнка полевого и осота полевого были менее чувствительны к искусственной инокуляции фитопатогенными бактериями, чем эти же растения в более поздние фазы развития. Выделенные бактерии при искусственном заражении стеблей пырея ползучего вызывали развитие на них водонасыщенных пятен, а также пожелтение листьев и чешуек. При инокуляции подмаренника цепкого развивались светло-коричневые пятна, вытянутые вдоль стебля, иногда они охватывали весь стебель, в результате растения надламывались и засыхали. Выявлено, что хвощ полевой очень чувствительная культура, которая легко инфицируется. Бактерии на стеблях хвоща полевого вызывали образование на 3-4 сутки водонасыщенных пятен, которые увеличивались в размерах, приобретали темно-коричневый, почти черный цвет, и охватывали стебель.

Изученные нами 18 представителей оксидазоотрицательных патогенных изолятов, выделенных из таких сорняков как вьюнок полевой, хвощ полевой, ежовник обыкновенный,

пырей ползучий, марь белая, осот полевой, подмаренник, редька дикая представляли собой подвижные грамотрицательные палочки, с поступательным движением (табл. 3). Клетки размещаются одиночно, редко короткими цепочками. На МПБ растут в виде слабой шелковистой мути с образованием тонкой нежной пленки. Бактерии не образуют индола и сероводорода, не редуцируют нитраты. Пять исследованных изолятов не гидролизуют желатину (536а, 562, 564а, 566б, 650в). Все изоляты бактерий подщелачивают лакмусовую сыворотку, пептонизируют молоко, усваивают как единственный источник углеродного питания арабинозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, маннитол, сорбитол, инозитол. Не используют лактозу, рамнозу, дульцитол, салицин, инулин. Изоляты гетерогенны в потреблении сахарозы, мальтозы, раффинозы. В отличие от типового штамма *P. syringae* pv *syringae* NCPPB 281 и неопатотипового – *P. syringae* pv *atrofaciens* PDDCC 4394 около 40 % изолятов используют мальтозу, а 33 % – не ферментируют раффинозу. Два изолята (662г и 690б) не используют сахарозу. Гетерогенность в использовании некоторых источников углеродного питания патоваров *P. syringae* отмечается и другими авторами [6, 12]. На основании изученных свойств бактерии, выделенные из сорняков, идентифицированы как *P. syringae*. Принадлежность штаммов к виду *P. syringae* подтверждено данными по жирнокислотному составу клеточных липидов. У исследуемых штаммов были идентифицированы насыщенные (C12:0, C16:0, C18:0), ненасыщенные (C16:1, C18:1), циклопропановые (C17:0cyclo, C19:0cyclo) и оксизамещенные (C10:0 3ОН, C12:0 2ОН, C12:0 3ОН) жирные кислоты.

Таблица 2

Характеристика изолятов бактерий, выделенных из сорняков

Сорняк	Изоляты	Агрессивность, баллы	Реакция микроагглютинации	Сорняк	Изоляты	Агрессивность, баллы	Реакция микроагглютинации
Вьюнок полевой	508в	3,75	+	Подмаренник цепкий	505	3,6	–
	560а	4,1	+		549 а	3,5	–
	560в	2,33	+		682а	4,25	+
	562	2,33	+		684а	3	+
	563а	2,66	–		684 б	2,5	+
	563 б	3,25	+		686а	3	–
	564а	4	+		687а	3	+
	599а	2,5	–	Пырей ползучий	645 з	3	+
	643г	2,5	+		646 а	3,66	+
	643д	4	+		586а	2,33	–
	708б	3,66	+	587а	3,5	+	
	718д	3,25	–	Марь белая	565а	0,5	+
	718з	3,25	+/-		566б	3	+
	718к	2,4	–	Осот полевой	662 г	4,1	+
Хвощ полевой	515в	4,66	+		670е	2,5	+
	516а	5	+	Редька дикая	536а	3	+
	517а	3,8	–		554 б	3,5	–
	677в	3	–	Мятлик	532	2,5	–
	688в	2,66	+	Щетинник сизый	702а	2,5	–
	689б	2,5	+	Ежа сборная	520	2,5	–
	690б	4,33	+	Фиалка полевая	534б	2,3	–
	691г	2,66	–	Собачья петрушка	558г	3	–
Ежовник обыкновенный	650б	3	+	Пикульник	570а	3	+
	650в	2,5	+	Энотера	573а	3,5	+
					606а	4	–

Таблица 3

## Свойства бактерий, изолированных из сорняков

Тесты	Изоляты бактерий								<i>P. syringae</i> pv.	
	516а 536а 560а 560в 688в	562	563б	564а 566б 650в	570а 646а 684б 689б	645з	650б	662г 690б	<i>atrofaciens</i> PDDCC 4394	<i>syringae</i> NCPFB 281
Окраска по Грамму	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Редукция нитратов	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Оксидаза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Лакмусовая сыворотка	Щ	–	Щ	Щ	Щ	–	Щ	Щ	Щ	Щ
Гидролиз желатинины	+(536а)	–	+	–	+	+	+	+	+	+
Использование молока	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П
Образование сероводорода, индола	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Использование: Глюкозы, фруктозы, арабинозы, галактозы, маннитола, сорбитола, ксилозы, инозитола	К	К	К	К	К	К	К	К	К	К
Лактозы, рамнозы, дульцитоло, инулина, салицина	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Сахарозы	К	К	К	К	К	К	К	–	К	К
Мальтозы	Ксл	Ксл	–	–	–	–	Ксл	–	–	–
Раффинозы	К	–	–	К	К	–	–	–	К	К

**Примечание:** “+” – положительный, “-” отрицательный результат, “К” - образование кислоты, “Ксл” - образование слабой кислоты, “Щ” – щелочь, “П” - пептонизация

Из 49 исследованных оксидазоотрицательных изолятов бактерий положительную реакцию микроагглютинации с использованием полиштаммовой антисыворотки к фитопатогенным бактериям *Pseudomonas syringae* (I-VI серогрупп) дали 30 изолятов бактерий (табл. 2).

Установлено высокое серологическое родство отобранных 18 изолятов с антисыворотками к штаммам пяти серологических групп *Pseudomonas syringae* (I, II, IV, V, VI), которые встречаются на зерновых культурах. Выявлено, что 77 % штаммов, изолированных из сорняков в высоких титрах (12800-25600) реагировали с антисыворотками до штаммов *P. syringae* pv. *atrofaciens* серогрупп II, IV или VI. Почти все изоляты давали реакцию агглютинации с антисыворотками до штаммов *P. syringae* pv. *atrofaciens* серогрупп I и V, но титры реакции были значительно слабее.

Таким образом, у посевах пшеницы выявлены сорняки – подмаренник цепкий, марь белая, ежовник обыкновенный, редька дикая, пырей ползучий, хвощ полевой, вьюнок полевой и осот полевой с симптомами бактериального поражения. Возбудители заболеваний на основании морфологических, биохимических и серологических свойств идентифицированы как *P. syringae*. Установлено серологическое родство бактерий, изолированных из сорняков с возбудителем бактериальных болезней зерновых культур. В дальнейшем планируется определить круг поражаемых растений бактерий *P. syringae*, изолированных из сорняков, и провести молекулярно-генетические исследования выделенных бактерий.

Л.А. Пасичник, О.А. Савенко, Л.М. Буценко, Т.М. Щербина, В.П. Патики

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

## **PSEUDOMONAS SYRINGAE - ЗБУДНИК БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ БУР'ЯНІВ**

### Резюме

У посівах пшениці, вирощеної за різних систем землеробства, виявлено та описано симптоми бактеріальних захворювань супутніх бур'янів. На підставі морфологічних, біохімічних і серологічних властивостей збудник, ізольований із підмаренника чіпкого, лободи білої, плоскухи звичайної, редьки дикої, пирію повзучого, хвоща польового, безезки польової та осоту польового ідентифікований як *Pseudomonas syringae*. Встановлено серологічну спорідненість бактерій із бур'янів зі збудником бактеріальних хвороб зернових культур.

Ключові слова: пшениця, бур'яни, бактеріальні хвороби, *Pseudomonas syringae*.

L.A. Pasichnik, E.A. Savenko, L.N. Butsenko, T.N. Shcherbina, V.F. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

## **PSEUDOMONAS SYRINGAE – THE AGENT OF BACTERIAL DISEASES OF WEEDS**

### Summary

The symptoms of bacterial diseases of the associated weeds have been identified and described in the wheat crops grown in different farming systems. On the basis of its morphological, biochemical and serological properties the agent isolated from frost-blite, barnyard grass, wild radish, couch grass, bottle-brush, bindweed and sow thistle has been identified as *Pseudomonas syringae*. Serological affinity between the weed bacteria and the agent of bacterial diseases of cereals has been established.

The paper is presented in Russian.

Key words: wheat, weeds, bacterial disease, *Pseudomonas syringae*.

The author's address: Pasichnik L.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. – Москва: Мир, 1983. – Т. 1. – 563 с.
2. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. – Москва: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.
3. Гвоздяк Р.И., Яковлева Л.М., Пасичник Л.А., Щербина Т.Н., Огородник Л.Е. Бактерии рода *Pseudomonas* на сорняках // Микробиол. журн. – 2005. – 67, № 2. – С. 63–69.
4. Гвоздяк Р.И., Пасичник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гриник І.В., Патики В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В.П. Патики. – Київ: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
5. Краснопорова Е. М. Экология сорных растений зерновых агрофитоценозов Приобской лесостепи : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Калининград, 2006. – 24 с.
6. Пасичник Л.А., Патыка В.Ф., Ходос С.Ф., Винничук Т.С. Базальный бактериоз пшеницы и влияние агротехнических приемов на его распространение // Микробиол. журн. – 2012. – 74, № 4. – Р. 37–44.
7. Яковлева Л.М., Захарченко Т.М., Щербина Т.М., Патики В.П. Бактеріальні захворювання *Convolvulus arvensis* L. у посівах *Glycine max* (L.) Merr. та їх збудники // Вісник Харківського національного ун-ту. Серія біологія. – 2010. – Вип. 3 (21). – С. 92–98.
8. Яковлева Л.М., Патыка В.Ф., Щербина Т.Н., Савенко Е.А. Видовой состав возбудителей бактериозов хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.). // Микробиол. журн. – 2012. – 24, № 3. – С. 29–35.
9. Bergey's manual of systematic bacteriology / Eds D.R. Boone, R.W. Castenholz, Editor-in-chief G.M. Garrity. – Vol. 1, 2nd ed. – New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. – 2, Part B. – 1106 p.
10. Bogatzevska N. Natural epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* on weeds // Development in Plant Pathology. – 1997. – 9. – Р. 72–74.
11. Bradbury J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. – Great Britain: Cambrian News Ltd, 1986. – 334 p.
12. Jacobellis N.S., Figlinolo G., Janse J., Scorticini M., Ciuffreda G. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* // Development in Plant Pathology. – 1997. – 9. – Р. 500–504.
13. Klement Z., Rudolph R., Sands D.S. Methods in phytobacteriology. – Budapest: Akademia Kiado, 1990. – 568 p.
14. Leksomboon C., Thaveechai N., Kositratana W. Bacterial leaf spot of Chinese convolvulus (*Ipomoea aquatica*) // 29th Kasetsart University Annual Conf.: Proc. (Bangkok, Thailand, 4-7 Feb., 1991). – Bangkok, 1991. – P.277–283.
15. Tichich R.P., Doll J.D. Field-based evaluation of a novel approach for infecting Canada thistle (*Cirsium arvense*) with *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* // Weed Science. – 2006. – 54, N 1. – Р. 166–171.

Отримано 28.11.2012