

# ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ КОМПЛЕКСА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИОЗА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

**В.О. Гресис, Е.Д. Фокина**

e-mail: gresis\_vo@rudn.ru; katsv08@mail.ru

**А.Н. Игнатов**, доктор биологических наук

e-mail: an.ignatov@gmail.com

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН)

**Ю.С. Панычева**

e-mail: panycheva@mail.ru

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

**Е.С. Герр**

e-mail: e.stognienko@yandex.ru

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

**Аннотация.** Проведена оценка распространения бактериальных патогенов сахарной свеклы на основе визуального обследования, ПЦР и микробиологической/фитопатологической диагностики образцов растений, собранных в 2017 и 2020 гг. Установлена высокая начальная степень поражения растений культуры возбудителем бактериального ожога и пятнистости *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* и достоверная корреляция между зараженностью этим патогеном и развитием мокрой гнили (возбудители *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. betavascularum*, *Dickeya chrysanthemi* и *Pantoea agglomerans*).

**Ключевые слова:** *Beta vulgaris*, бактериоз, сукцессия, ПЦР.

По данным Международной организации по сахару (ISO), около 20 % мирового производства продукта приходится на свекловичный и 80 % – на тростниковый сахар. Сахарную свеклу выращивают в основном в странах с умеренным климатом, и Россия является одним из ее ведущих производителей [1]. На всех этапах вегетации она подвергается поражению болезнями: большой экономический ущерб наносится культуре по меньшей мере 43 видами фитопатогенных грибов, 13 видами вирусов, 10 видами нематод и 13 видами бактерий [2]. В последние годы отмечается усиление поражения сахарной свеклы фитопатогенными бактериями [3, 4].

Известно, что для большинства бактериальных болезней растений характерна сукцессия микрофлоры – смена фитопатогенных видов и сапротрофов, разлагающих растительные остатки [5]. Этот процесс характерен и для сахарной свеклы, хотя параметры его

пока не изучены [6]. Так, известно не менее 150 видов грибов и 20 видов бактерий, связанных с кагатной гнилью сахарной свеклы, многие из которых полностью зависимы от первичного заражения фитопатогенами [2]. Современные исследования микробиоты культуры были посвящены в основном поиску видов, подавляющих развитие болезней [7], индикаторов больных и здоровых растений в поле [8], больных и здоровых корнеплодов после уборки [9]. Точная идентификация фитопатогенов, которые первыми проникают в растение и подавляют иммунитет, создавая нишу для вторичных патогенов и сапрофитов, позволит оценить пути их распространения и сохранения, а также найти эффективные меры борьбы, снижающие ущерб от бактериозов. Из распространенных в России бактериозов сахарной свеклы наиболее вредоносны бактериальный ожог и пятнистость листьев и бактериальная гниль (некроз) корнеплодов [3].

Бактериальная пятнистость и ожог листьев свеклы (возб. *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*) – заболевание сосудисто-паренхиматозного характера, поражает сахарную, кормовую и столовую свеклу на всех стадиях ее развития [4] (рис.). Первичное заражение приурочено к местам откладки яиц свекловичным долгоносиком-стеблеедом [10].

Задачей исследования было выявить влияние зараженности растений *P. syringae* pv. *aptata* на другие бактериальные болезни свеклы.

Опыты закладывали на производственных полях в Выселковском районе Краснодарского края в 2017 г. (45,55 с.ш., 39,69 в.д.) и в Рамонском районе Воронежской области в 2020 г. (51.94° с.ш., 38.88° в.д.). Были проведены: визуальная оценка встречае-



А)

Б)

Рисунок. Симптомы бактериального ожога и пятнистости, вызываемые бактериальным патогеном *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* в поле (А) и симптомы на листьях сахарной свеклы сорта Шайенн через 2 недели после инокуляции изолятом 2-2-1 *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Б).

мости симптомов на растении (не менее 30 растений); ПЦР анализ в реальном времени для диагностики бессимптомного развития болезни, выделение бактерий на селективной среде, определение патогенности бактерий на растениях-индикаторах по СЧР и на всходах свеклы. На момент первого учета (20.06.2017/15.06.2020) растения находились в фазе смыкания ботвы (31–34, код ВВСН). Во время второго учета (21.07.2017/20.07.2020) – в фазе 34–39, третьего (11.08.2017/15.08.2020) – в фазе 49 (полная спелость). Погодные условия начала вегетационных сезонов были благоприятными для развития бактериозов.

Для пробоподготовки и выделения ДНК из растительных тканей использовали коммерческие наборы фирмы «Синтол» (Москва).

Для первоначального определения видового состава фитопатогенных бактерий проводили посев микроорганизмов из собранного растительного материала на неселективные питательные среды Кинга Б и YDC (дрожжевой экстракт – декстроза – карбонат кальция). Выделенные изоляты идентифицировали методами ПЦР с оригинальными праймерами и пробами для видов *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *Dickeya chrysanthemi*, *Pantoea agglomerans*, *P. carotovorum*, *P. betavascularum* и др. Результаты первичной идентификации проверяли секвенированием фрагмента гена 16S rRNA с универсальными праймерами 8UA/519B и оценкой вирулентности изолятов на молодых растениях свеклы. Количественный анализ фитопатогенных бактерий в образцах растений проводили методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе ABI Step One (Termo Fisher Scientific, США), используя те же видоспецифичные праймеры и оригинальные зонды (TaqMan®). Статистическую обработку результатов опытов осуществляли методами дисперсионного кла-

Таблица 1. Результаты обследования распространения в полевых условиях бактериального ожога и церкоспороза сахарной свеклы

Год	Встречаемость бактериальной гнили корнеплодов, балл (0-9)	Урожайность, т/га	Поражение растений по учетам*		
			1	2	3
2017	7,8	53,65	5,8/0,2	23,7/11,7	12,1/38,5
2020	5,8	56,86	6,4/0,3	18,9/21,8	16,5/29,6
НСР <sub>95</sub>	0,28	-	3,1/ 0	4,0/3,1	6,5/4,8

\*Первое число – процент листьев с поражением (не менее 10 % площади листа) бактериальным ожогом и пятнистостью (*P. syringae* pv. *aptata*), второе число – процент листьев с поражением церкоспорозом (*Cercospora beticola*). Снижение поражения бактериозом листьев в 3 учете связано с отрастанием новых здоровых листьев.

стерного анализа, при помощи пакета статистических программ Statistica 12.0 (StatSoft, США).

В результате проведенных исследований была установлена высокая неоднородность естественного инфекционного фона на поле для возбудителей бактериальных болезней (табл. 1). В ходе вегетации наибольшее число бактерий на листьях было зарегистрировано в первом учете (достаточно влажно и тепло), а при последующих учетах (жаркая сухая погода) популяция бактерий существенно снижалась. Полученные в ходе оценки вирулентности выделенных из листьев бактерий *P. syringae* pv. *aptata* показали, что они наиболее агрессивны при температуре ниже 20°C.

Между учетами были обнаружены значительные различия в общем числе бактерий, обратно пропорциональном трешхолду ПЦР в реальном времени (табл. 2).

В результате анализа данных установлена высокая начальная степень поражения растений сахарной свеклы возбудителем бактериального ожога и пятнистости *P. syringae* pv. *aptata*, возбудителями бактериозов *P. carotovorum* и *P. betavascularum*. Популяция этих фитопатогенов существенно снижалась во время второго, третьего учетов и в убранных корнеплодах. Популяция вторичного патогена *P. agglomerans*, сопутствующего различным возбудителям болезней растений, оставалась очень высокой до третьего учета и снова выросла в убранных корнеплодах. Таким образом, количество *P. agglomerans* в растении является индикатором общего заражения растений бактериальными фитопатогенами.

Возбудитель бактериальной гнили *Dickeya chrysanthemi* (учет 2020 г.), наоборот, стал доминировать со времени второго учета, что соответствовало более высокой температуре воздуха, благоприятной для данного возбудителя.

Обнаружена статистически достоверная корреляция между поражением растений *P. syringae* pv. *aptata* (первый учет) и количеством бактерий *P. carotovorum* ( $r$  Пирсона = 0,55, достоверность при  $P < 0,005$ ), *P.*

Таблица 2. Динамика популяций фитопатогенных бактерий в образцах листьев 1–3 учетов и образцов корнеплодов (учет К) по значению числа циклов Ст в ходе учетов. Значения цикла обратно пропорциональны концентрации бактерий

Патоген	Учет	Число циклов Ст			
		Ср. 2017	Ср. 2020	Ст. 2017	Ст. 2020
<i>P. syringae pv. aptata</i>	1	25,8**	21,2**	0,0	0,0
	2	28,9*	33,9*	0,1	0,7
	3	39,3*	40,2*	0,1	0,1
	К	36,5	39,7	0,2	0,9
<i>P. carotovorum</i>	1	31,9*	33,7**	0,1	0,7
	2	33,5*	37,9**	0,1	0,6
	3	41,2*	42,7**	0,1	0,1
	К	36,40	37,6	0,4	0,6
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	26,9	23,9**	0,0	0,3
	2	26,0	27,8**	0,0	0,8
	3	35,1**	38,6**	0,0	0,2
	К	32,3	33,7	0,1	0,9
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	1	39,8**	32,8**	0,0	0,2
	2	43,4	42,9	0,5	0,1
	3	43,0	43,0	-	-
	К	42,1	42,7	0,4	0,0
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	1	Нд	42,8**	Нд	0,2
	2	Нд	32,9	Нд	0,1
	3	Нд	33,0	Нд	0,1
	К	Нд	35,7	Нд	0,0

Ср. — среднее значение для 3 повторностей.

Ст. — стандартное отклонение

\*Варианты с достоверными различиями на 90 % уровне.

\*\*Варианты с достоверными (95 %) различиями между учетами

*agglomerans* ( $r$  Пирсона = 0,68, достоверность при  $P < 0,005$ ) и *Dickeya chrysanthemi* ( $r$  Пирсона = 0,71, достоверность при  $P < 0,001$ ) в растениях. Достоверная (при  $P < 0,005$ ) корреляция была также отмечена между числом бактерий *P. syringae pv. aptata* в корнеплодах после уборки и количеством бактерий *P. carotovorum* (0,50), *P. agglomerans* (0,64) (данные не приведены).

Изменения микробиоты растений сахарной свеклы служат предиктором развития поражения и потерь урожая [8, 9]. Грамотрицательные фитопатогенные бактерии, особенно псевдомонады, наносят ущерб растениям в начале вегетационного сезона на фоне высокой влажности почвы и воздуха, а затем провоцируют колонизацию растений вторичными фитопатогенами и сапрофитами [9]. Очевидно, что основным фактором снижения ущерба от бактериозов может быть профилактика заражения растений *P. syringae pv. aptata* за счет использования незараженных семян, диагностики зараженности культур-предшественников и борь-

бы со свекловичным долгоносиком-стеблеедом, обеспечивающим большую часть первично-зараженных растений в весенний период вегетационного сезона.

#### Список литературы

1. International Sugar Organization, 2021. <https://www.isosugar.org/sugarsector/sugar>.

2. Haverson, R.M. Compendium of Beet Diseases and Pests (2nd ed.) / R.M. Haverson. - St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 2009. - P. 58-59.

3. Панычева, Ю.С. Бактериальные болезни сахарной свеклы в Российской Федерации: распространение и вредоносность / Ю.С. Панычева, М.В. Воронина, В.О. Гресис, А.Н. Игнатов // Сахар. - 2017. - № 11. - С. 26-30.

4. Игнатов, А.Н. Ожог листьев и гниль корнеплодов сахарной свеклы, вызванные *Pseudomonas syringae pv. Aptata*, в РФ / А.Н. Игнатов, Ю.С. Панычева, В.О. Гресис, Е.Н. Пакина // Сахар. - 2018. - № 7. - С. 14-17.

5. Cui, Z. Temporal and spatial dynamics in the apple flower microbiome in the presence of the phytopathogen *Erwinia amylovora* / Z. Cui, R.B. Huntley, Q. Zeng, B. Steven // The ISME Journal. - 2021. - Jan. - #15(1). - P. 318-329.

6. Селиванова, Г.А. Причины широкого распространения корневых гнилей в ЦЧР / Г.А. Селиванова // Сахарная свекла. - 2013. - № 5. - С. 27-31.

7. Mendes, R. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria / R. Mendes, M. Kruijt, I. De Bruijn, E. Dekkers, M. van der Voort, J.H. Schneider, Y.M. Piceno, N.Z. DeSantis, G.I. Andersen, P.A. Bakker, J.M. Raaijmakers // Science. - 2011. - May 27. - #332(6033). - P. 1097-1100.

8. Kusstatscher, P. Disease incidence in sugar beet fields is correlated with microbial diversity and distinct biological markers / P. Kusstatscher, T. Cernava, K. Harms, J. Maier, H. Eigner, G. Berg, C. Zachow // Phytobiomes Journal. - 2019. - Jan 20. - #3(1). - P. 22-30.

9. Kusstatscher, P. Microbiome-driven identification of microbial indicators for postharvest diseases of sugar beets / P. Kusstatscher, C. Zachow, K. Harms, J. Maier, H. Eigner, G. Berg, T. Cernava // Microbiome. - 2019. - Dec. #7(1). - P. 1-2.

10. Стогниенко, Е.С. Связь между повреждением свекловичным долгоносиком-стеблеедом и поражением сахарной свеклы хвостовой гнилью / Е.С. Стогниенко, О.И. Стогниенко, А.Н. Игнатов // Защита картофеля. - 2020. - № 1. - С. 25-26.

#### Dynamics of development of sugar beet bacterial pathogens complex in the field

V.O. Gresis, E.D. Fokina, A.N. Ignatov, Y.S. Panycheva, E.S. Gerr

**Summary.** The spread of bacterial pathogens of sugar beet was assessed by visual examination, PCR and microbiological/phytopathological diagnostics of the collected at 2017 and 2020 plants samples. A high initial degree of damage to sugar beet plants by the causative agent of bacterial spot and blight *Pseudomonas syringae pv. aptata* has been established, and a significant correlation between infection with this pathogen and the development of soft rot disease (caus. agents: *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. betavasculorum*, *Dickeya chrysanthemi*, and *Pantoea agglomerans*).

**Key words:** *Beta vulgaris*, bacterial plant disease, succession, PCR.