

Н. И. Федоров, профессор; В. А. Ярмолович, доцент;
Н. П. Ковбаса, доцент; В. Б. Звягинцев, ст. преподаватель;
Н. В. Южик, студентка

ИСКУССТВЕННОЕ ЗАРАЖЕНИЕ БЕРЕЗЫ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВОДЯНКОЙ

The experiences on inoculation of a birch *in vitro* and *in vivo* have shown pathogenicity of the some species of bacteria genus *Erwinia*.

Введение. Значительные площади Березовых лесов Беларуси в настоящее время имеют неудовлетворительное санитарное состояние в результате поражения их новым для республики заболеванием – бактериальной водянкой. Из различных частей пораженных деревьев были отобраны образцы тканей и доставлены в лабораторию для дальнейших исследований по идентификации возбудителей болезни и проверке их патогенности.

В процессе работ по идентификации возбудителей заболевания в различных тканях пораженных деревьев было обнаружено 34 штамма пектолитических бактерий, из которых в чистую культуру удалось выделить только 22 штамма [1].

Патогенные микроорганизмы для питания за счет тканей древесных растений вырабатывают пектолитические ферменты, некоторые патогены обладают также целлюлазной активностью. Наличие таких групп ферментов, например, у бактерий может указывать на возможность ведения ими паразитического образа жизни. Способность бактерий вызывать болезнь на древесных растениях может быть оценена также методом ускоренного тестирования с использованием кусочков живых листьев, частей стволиков, почек или клубней [2] или путем прямого сравнения количества зараженных растений после инокуляции [3].

Материалы и методы исследований. Оценка патогенности выделенных из пораженных тканей штаммов бактерий была предпринята нами методом искусственного заражения. Предполагая, что не все из 22 используемых в опыте штаммов пектолитических бактерий могут вызывать бактериальную водянку, мы ставили перед собой задачу разделения полученных штаммов на патогенные и не патогенные для живых тканей березы. Опыты по инокуляции были предприняты по двум направлениям. Одно из них включало заражение в контролируемых, лабораторных, условиях (*in vitro*), второе направление включало искусственное заражение деревьев березы в природной среде (*in vivo*).

Всего в опытах определялась патогенность 25 образцов бактериальных штаммов, имеющих в рабочем порядке следующие номера: 1.3; 3.1; 4; 14.1; 14.2; 21.2; 25.1; 25рест; 26.1; 31.1; 33.2; 42.1;

51.1; 52.1; 52.2; 55.1; 56.1; 58.2; 61.1; 63.2; 64.1; B1; T1.1; T2.1; T3. Многие из них представляют один и тот же вид бактерий, но выделены они были либо из разных тканей пораженных берез, либо с разных деревьев, либо в разное время. Для опыта использовались свежие 5–10-дневные культуры данных штаммов, выращиваемых на сусло-агаровой среде. С поверхности колоний делались водные смывы, которые наносились на поверхность различных органов растений или внутрь них с повреждениями или без таковых.

В лабораторных условиях инокуляция производилась следующим образом. В весенний период, непосредственно перед распусканием листьев, березовые ветви были доставлены в лабораторию, где разделялись на небольшие веточки, каждая из которых имела несколько внешне здоровых, хорошо развитых почек. Веточки по отдельности помещали в колбы с водой, в некоторых случаях в воду добавляли стимулятор роста – индолилуксусную кислоту для продления срока жизни древесных растений.

Заражение ветвей производилось следующими путями: а) добавление бактериальной суспензии в воду в опытных колбах; б) инокуляция медицинским шприцем еще не распустившихся почек; в) инокуляция шприцем листьев после их распускания. Опыты производились не менее чем в 3-кратной повторности по каждому штамму. В контрольном варианте использовалась дистиллированная вода без бактериальных клеток. Продолжительность опыта составила около 14 дней. За этот срок листья березы уже и в контрольном варианте усыхали по естественным причинам.

Проверка патогенности в полевых условиях проходила в два периода. Считается, что эффективность бактериальной инокуляции растущих деревьев выше в осенний и весенний периоды, тогда как летнее заражение одревесневших побегов положительных результатов, как правило, не дает [2]. В соответствии с этим нами было заложено два варианта опыта с инокуляцией деревьев березы – осенью (октябрь 2005 г.) и весной (май 2006 г.).

На пробном участке, выбранном для осеннего заражения, подбирались внешне здоровые, хорошо развитые деревья березы естественного семенного происхождения в возрасте 5–12 лет. Каждым из 11 испытываемых штаммов бактерий

проведено заражение 3 деревьев, причем инокуляцию проводили в нескольких вариантах:

а) внесение инфекции в Т-образный надрез на стволе;

г) инокуляция в зарубку коры до древесины;

в) инокуляция бактериальной жидкости под кору стволика шприцем с тонкой иглой.

Варианты внесения инфекции располагались на стволике вертикально с одной стороны на расстоянии 25–30 см. Перед инокуляцией проводили поверхностную стерилизацию коры 96% этиловым спиртом в местах нанесения ранений. В качестве контроля на данном участке были взяты деревья того же возраста, на которых вместо суспензии спор использовалась дистиллированная вода с теми же способами ее введения в ткани растения.

Результаты и обсуждение. Лабораторные исследования. Как показали проведенные нами исследования, *in vitro* большинство из исследуемых штаммов не проявили агрессии по отношению к растениям березы. По-видимому, березовый сок, как богатый источник питательных элементов, привлекает множество видов бактерий, в первую очередь сапротрофных. Только один из исследуемых штаммов (названный в рабочем порядке «3.1») дал положительные результаты в нескольких повторностях. В опытах с добавлением бактериальной жидкости в колбу с водой почки на ветвях березы до конца опыта так и не распустились, а под корой веточек наблюдались очаги некроза. Зараженные иглой почки в опытах с данным штаммом также в большинстве своем не подавали признаков жизни в отличие от контрольного варианта, где проколотые почки распустились. На зараженных штаммом 3.1 распустившихся листьях вокруг мест прокола наблюдались очаги некроза в виде пятен бурого цвета.

На 4-й день после распускания листьев наблюдалось массовое распространение древесной тли на исследуемых растениях, которая, вероятно, была завезена вместе с образцами. На отдельных листьях и их черешках наблюдалось до 5 шт. вредителей. Дальнейшие исследования в полевых условиях подтвердили массовое распространение данного вида на листьях березы.

Следует отметить, что в полной мере проверить патогенность бактериальных штаммов *in vitro* не представилось возможным, так как сроки жизни срезанных и поставленных в воду ветвей березы в опытах не превышали 15 дней. В этот период болезнь, вероятно, может протекать еще в скрытой форме (инкубационный период). Так, S. C. Gregory [4], сравнивая результаты лабораторного тестирования патогенности грибов рода *Armillaria* с результатами, полученными при инокуляции теми же изолятами растущих деревьев,

нашел некоторое несоответствие. Автор объяснял расхождение в патогенности, определенной различными методами, процессами, происходящими в отмирающих тканях растений-тестеров при лабораторном эксперименте. Причем данные процессы, главным образом касающиеся изменения влажности и химического состава содержимого клеток, могут как увеличить, так и снизить показатели патогенности. Поэтому особое значение имеют результаты опытов *in vivo*.

Полевые исследования. Наблюдения за состоянием деревьев березы на первом опытном участке показали, что в первые месяцы после заражения на деревьях не отмечалось видимых патологических изменений. Инокулированные деревья зимовали без изменений в их внешнем состоянии. В ранневесенний период изменений также не зафиксировано. И только в конце мая – начале июня 2006 г. (примерно через 7 месяцев после заражения) начали проявляться симптомы и признаки болезни.

Детальное обследование пробного участка через один год после заражения (сентябрь 2006 г.) выявило типичные признаки, характерные для бактериальной водянки [5], практически на всех деревьях, задействованных в эксперименте (см. таблицу). При положительном результате инокуляции на поверхности стволиков образуются как бы вдавленные участки, вызванные отмиранием камбия и хорошо просматривающиеся под тонкой молодой корой. Вдавленности имеют, как правило, овальную форму и окружают место инокуляции. Глубина их варьируется от 1–2 до 4–5 мм. Размеры пятен по высоте ствола колеблются от 3 до 12 см, а по ширине – от 1 до 7 см. В некоторых случаях на поверхности коры видны слабые потеки экссудата, выделяющегося из повреждений коры, нанесенных при инокуляции. Под корой таких участков наблюдался коричневатый слой отмершего камбия, окруженный однолетним валиком каллюсной ткани.

Микробиологический анализ поврежденных участков в 90% случаев выявил наличие только бактериальной инфекции и в 10% – совместное присутствие и бактериальной, и грибной инфекции. В большинстве случаев грибные isolates относились к роду *Penicillium* – в состав которого входят сапротрофные виды, не способные развиваться на живых тканях и, следовательно, вызывать болезнь.

Наличие признаков заболевания при инокуляции всеми исследуемыми штаммами бактерий и даже иногда в контрольных вариантах не позволяет объективно оценить результаты эксперимента. Данная ситуация свидетельствует о нарушении чистоты опыта вмешательством трудно поддающихся контролю в полевых условиях факторов.

Результаты инокуляции растущих деревьев березы

№ штамма	Вид или род бактерии	Эффективность инокуляции по вариантам		
		В Т-образный разрез	В зарубку	Инъекция шприцем
4	<i>Erwinia nimipressuralis</i>	+++	++-	-++
T2.1	<i>Pseudomonas</i>	+++	+++	---
51.1	<i>Erwinia populina</i>	+++	+++	?-?
21.2	<i>Pseudomonas</i>	+++	++?	-??
31.1	<i>Pseudomonas</i>	+?+	+++	???
25pect	<i>Bacillus</i>	+?+	+?+	??+
B1	<i>Erwinia populina</i>	++?	+++	???
61.1	<i>Erwinia populina</i>	?++	?++	???
T3	<i>Erwinia populina</i>	?++	+++	-+?
58.2	Не выяснен	++?	+++	???
25.1	<i>Bacillus</i>	-++	+++	???
Контроль		-+?	-+-	?--

Примечание. «+» – успешное заражение (наблюдаются характерные признаки бактериальной водянки);
 «?» – трудно интерпретируемые результаты заражения (характерные признаки бактериальной водянки отсутствуют, однако имеются признаки других патологических процессов);
 «-» – неудачное заражение (признаки бактериальной водянки отсутствуют).

Одним из таких факторов может оказаться высокий естественный инфекционный фон патогенных бактерий, способных проникать в повреждения коры, нанесенные при инокуляции и вызывать симптомы заболевания. Данное заключение подтверждают различия в эффективности инокуляции со значительным повреждением коры (в Т-образный разрез и в зарубку) и при слабо повреждающей покровные ткани инъекции шприцем с тонкой иглой. Таким образом, скорее прослеживается зависимость успешности внедрения патогенов от размера повреждения, а не от вида внесенного возбудителя.

Появления других признаков, характерных бактериальной водянке, как то: усыхание ветвей, наличие водяных побегов и общее ослабление пораженных деревьев, пока не отмечено. Таким образом, несмотря на успешную инокуляцию, болезнь не получила широкого распространения в тканях деревьев и не привела к заметному ослаблению деревьев. Очевидно, один вегетационный сезон – это сравнительно небольшое время для более очевидного проявления болезни. С другой стороны, может сыграть роль тот факт, что заражению подвергались здоровые молодые деревья, обладающие высокой энергией роста и не испытывающие ощутимого стресса от воздействия других неблагоприятных факторов. Следовательно, высокий иммунитет таких деревьев позволил им локализовать болезнь, что подтверждается интенсивным развитием каллюсной ткани по периметру инфицированных участков.

На втором опытном участке (Негорельский УОЛ, май 2006 г.) для инокуляции были подобраны 5–7-летние деревья березы в количестве 25 шт. В опыте использовались несколько штаммов, проявивших себя в лабораторных опытах наиболее агрессивно, а именно: 3.1; T1.1; 31.1; 25.1. Из вариантов заражения было использовано внесение инокулята под кору при помощи шприца, в зарубку в коре и прокалыванием листьев с внесением инфекции. С момента инокуляции до настоящего времени велось наблюдение, однако симптомов и признаков болезни пока выявить не удалось. Ввиду отсутствия заражения деревьев в данном варианте опыта имеется несколько предположений, которые со временем необходимо проверить:

– молодые деревья березы до 7-летнего возраста не подвержены воздействию болезни или инфицируются с трудом;

– древесные растения в основном заражаются водянкой в осенний период;

– заболевание имеет достаточно продолжительный (до года) инкубационный период.

Выводы. В результате проведенной работы можно сделать следующие основные выводы:

1) заражения деревьев березы легко добиться инокуляцией в осенний период;

2) лучший результат инокуляции проявляется при значительных повреждениях коры при внесении инфекции в Т-образный разрез или в зарубку коры до древесины. Эффективность внесения бактериальной жидкости под кору стволика методом инъекции не высока;

3) за один вегетационный период инфицированные деревья не проявили признаков ослабления. Это свидетельствует либо об их высоком иммунитете в молодом возрасте и отсутствии предрасполагающих факторов, что позволяет деревьям локализовать болезнь, либо о том, что патогенная активность не успела проявиться из-за относительно длительного срока инкубационного периода болезни;

4) одним из вероятных разносчиков патогенных бактерий, вызывающих бактериальную водянку березы, может быть древесная тля, что, однако, следует подтвердить детальными исследованиями;

5) из древесины и луба ствола и ветвей, а так же из листьев пораженных деревьев выделены фитопатогенные бактерии родов *Erwinia*, *Pseudomonas* и *Bacillus*. Наиболее часто из инфицированных органов выделялся вид *Erwinia populina*. Однако данный вид не прошел официальную процедуру регистрации нового вида, и, следовательно, есть необходимость в уточнении его систематики. Поэтому, по нашему мнению, наиболее вероятным возбудителем бактериальной водянки является фитопатогенная бактерия *Erwinia nimipressuralis*. По данным ряда исследователей эта бактерия является полифагом и способна вызывать бактериальную водянку на многих лиственных и хвойных

породах. Выделенные фитопатогенные бактерии из родов *Pseudomonas* и *Bacillus* проявили меньшую патогенность. Они, по нашему мнению, являются сопутствующими при развитии бактериальной водянки. Их роль в развитии заболевания до конца не выяснена.

Литература

1. Бактериальная водянка березы в Республике Беларусь / А. Н. Евтушенко [и др.] // Сб. науч. тр. / РНУП «Институт защиты растений» НАН Беларуси. – Минск, 2006. – Вып. 30: Стратегия и тактика защиты растений – Ч. 1. – С. 220–224.
2. Практикум по общей фитопатологии / П. Н. Головин [и др.]. – СПб., 2002. – 287 с.
3. Гвоздяк, Р. И. Диагностика бактериальных болезней лесных древесных пород / Р. И. Гвоздяк, Л. М. Яковлева. – М.: ВАСХ-НИЛ, 1980. – 22 с.
4. Gregory, S. C. The use of potato tubers in pathogenicity studies of *Armillaria* isolates / S. C. Gregory // Plant Pathology. – 1985. – Vol. 34. – P. 41–48.
5. Федоров, Н. И. Бактериальная водянка березы в лесах Беларуси / Н. И. Федоров, Н. П. Ковбаса, В. А. Ярмолович // Проблемы лесной фитопатологии и микологии; под ред. В. Г. Стороженко. – М. – Петрозаводск: МГУЛ, 2005. – С. 346–350.