

РОЛЬ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОРАЖЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВОДЯНКОЙ ДРЕВЕСИНЫ *PINUS SIBIRICA* DU TOUR, В ПАТОГЕНЕЗЕ ХВОЙНЫХ

Гродницкая И.Д.¹, Сенашова В.А.¹

¹Институт леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН,
igrod@ksc.krasn.ru

THE ROLE OF BACTERIA ISOLATED FROM *PINUS SIBIRICA* DU TOUR AFFECTED BY BACTERIAL DROPSY IN THE CONIFERS PATHOGENESIS

Grodnitskaya I.D., Senashova V.A.¹

Bacteria belonging to the genera Bacillus, Paenibacillus, Rouxiella, Brevibacterium, Ewingella, Stenotrophomonas were isolated and identified from wet wood of Pinus sibirica damaged by bacterial dropsy. These bacteria were tested for virulence on indicator plants, as well as for their phytopathogenicity in relation to seeds and seedlings of conifers (Pinus sylvestris L. and Abies sibirica L.). It was shown that at the early stages of pine ontogenesis, the studied bacteria did not exhibit phytopathogenic action, only inhibitory (Ewingella). After infection with individual bacteria, Siberian fir seedlings coped with all signs of the disease for three years. Currently, there are no traces of infection and signs of the disease on the fir trees.

В темнохвойных лесах юга Восточной Сибири ежегодно увеличиваются площади лесных насаждений, пораженных болезнями, вызванными грибами и бактериями. С 2012 г. в кедрово-пихтовых лесах Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия) наблюдается распространение заболевания «бактериальная водянка». Ежегодно площадь заболевших древостоев пихты сибирской и сосны кедровой сибирской увеличивается в десятки раз. Только в Республике Бурятия за десятилетие общая площадь очагов достигла 16, 5 тысяч га. К настоящему времени площадь больного кедрового леса в лесничествах Иркутской области разрослась уже почти на 59 тысяч га. Бактериальная водянка лесных пород – широко распространенный системный бактериоз, протекающий обычно в хронической форме, поражающий многие лиственные и хвойные древесные породы. Симптоматика бактериоза связана с обводнением ядровой и заболонной древесины стволов, с трещинами и раковыми ранами стволов и ветвей; для хвойных характерна также засмоленность пораженных тканей. Заболевание может протекать десятилетиями с периодами активности и затухания. По степени лесохозяйственной вредоносности бактериальную водянку относят к бактериозу № 1 в лесах России. Меры борьбы с этим заболеванием до сих пор не разработаны: использование антибиотиков в лесных насаждениях для обработки взрослых деревьев малоэффективно и экономически нецелесообразно, химические средства защиты в условиях охраняемых природных территорий запрещены. Возникает неразрешимая проблема сохранения уникальных Прибайкальских лесов. В этой связи первостепенная задача найти возбудителя данного заболевания, а затем искать пути борьбы с ним. Однако вопрос об истинном возбудителе этого заболевания до сих пор остаётся открытым как в России, так и за рубежом (Черпаков, 2017; Alizadeh et al., 2017; Gary, 2004). В литературе есть сведения, что бактериальную водянку хвойных вызывают некоторые виды бактерий из родов *Erwinia* и *Pseudomonas* (Рыбалко, Гукасян, 1986). Ряд исследователей считает, что в развитии патогенеза могут принимать участие ассоциации различных микроорганизмов, в том числе и непатогенных (Черпаков, 2017; Гродницкая и др., 2023; Gary, 2004). Мы полагаем, что в возникновении бактериальной водянки участвует не

только целый комплекс микроорганизмов, но и факторы окружающей среды, влияющие на устойчивость древостоев к этому заболеванию. В связи с этим весьма актуальными становятся исследования по выделению и идентификации изолятов микроорганизмов из пораженных заболеванием деревьев для дальнейшей их проверки на патогенность.

Целью настоящего исследования было выделение бактерий из пораженной бактериальной водянкой древесины, оценка фитопатогенных свойств выделенных изолятов и их участие в патологическом процессе при искусственном заражении семян и саженцев хвойных.

Объектами исследований являлись микроорганизмы, выделенные из древесины (кernов и спилов) сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) с «мокрым ядром». Образцы древесины отбирались в Слюдянском лесничестве Иркутской области в 200-летних кедровниках, пораженных бактериальной водянкой. Из данных образцов изолировано в чистые культуры 25 эндофитных бактерий. С помощью молекулярно-генетического анализа выделена их геномная ДНК, проведены амплификация гена 16S рРНК и секвенирование ДНК изолятов по методу Сэнгера, которое проводилось в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск).

Для быстрого определения вирулентных свойств опытных бактерий применялся метод инъекции-инфильтрации (Кирай и др., 1974). Индикаторным растением служила фасоль (*Phaseolus vulgaris* L.). Для проверки влияния эндофитных бактерий на рост и развитие хвойных проведен вегетационный опыт (*in vitro*). Семена сосны обыкновенной (*P. sylvestris* Ledeb) обрабатывали водными суспензиями эндофитных бактерий (10^7 кл/мл) и засевали в пластиковые кюветы с почвой, в контроле семена замачивали в стерильной воде. Всего было семь вариантов опыта (по три повторности). Учитывали всхожесть семян и развитие проростков в течение 30 дней. Выделенные бактерии также проверяли на вирулентность на 6-летних саженцах пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb), для чего было проведено заражение стволиков суспензией (титр 10^7 кл /мл) каждой бактерии.

По результатам секвенирования идентифицировано 6 родов бактерий: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rouxiella*, *Ewingella*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacterium*, которые обладали различной степенью вирулентности по отношению как к индикаторному растению (фасоль), так и к проросткам хвойных. Проверка выделенных изолятов бактерий на реакцию сверхчувствительности к ним индикаторного растения показала, что при инокуляции листьев фасоли бактериальными суспензиями родов *Bacillus* и *Paenibacillus* отмечено появление незначительных точечных повреждений по месту уколов. На листьях, инокулированных суспензиями бактерий родов *Rouxiella* и *Brevibacterium*, наблюдали появление более обширных локальных некрозов, что говорит о развитии выраженной сверхчувствительной (СЧ) реакции под воздействием этих бактерий. На 10-й день после заражения фасоли суспензиями бактерий родов *Ewingella* и *Stenotrophomonas* наблюдали увядание и гибель листьев в результате нарушения ксилемного тока и поступления питательных веществ. Это может свидетельствовать о проявлении бактериями патогенных свойств в отношении растений фасоли.

На рост развитие семян и проростков сосны обыкновенной испытываемые бактерии оказывали различное воздействие. Так, положительное влияние на всхожесть семян сосны оказала обработка штаммом р. *Brevibacterium* – увеличение всходов на 12 % по сравнению с контролем. Обработка семян сосны бактериями родов *Bacillus*, *Rouxiella*, *Paenibacillus* увеличила всхожесть семян на 3–9%. Бактерии рода *Stenotrophomonas* не оказали влияния на всхожесть семян, а в варианте с *Ewingella* отмечено уменьшение количества проростков на 15.1%. Анализ морфометрических данных показал, что статистически значимых различий размеров надземной части (стебелек и мутовка) проростков между контролем и опытом выявлено не было.

Достоверное ($p < 0.05$) уменьшение длины корней, по отношению к контролю, отмечено в вариантах обработки бактериями родов *Ewingella* и *Paenibacillus* (на 42 и 26% соответственно) и *Brevibacterium* (на 11.7%). При обработке семян бактериями родов *Rouxiella* и *Bacillus* также наблюдали уменьшение длины корней проростков на 10–17%. При визуальном осмотре на проростках не было обнаружено каких-либо признаков поражения (усыхания, мацерации растительной ткани и др.).

Следовательно, можно утверждать, что на ранних этапах онтогенеза сосны обыкновенной исследуемые эндофитные бактерии не проявляли фитопатогенного действия. Ростстимулирующее влияние на развитие семян и проростков стабильно оказывали бактерии родов *Brevibacterium* и *Bacillus*, ингибирующее – бактерии рода *Ewingella* (уменьшали всхожесть проростков и длину корешка).

После проведения исследований на семенах сосны обыкновенной проведена оценка на фитопатогенность методом инокуляции исследуемых бактерий на шестилетних саженцах пихты сибирской, стволы которых уже одревеснели. Проведенный через 3 месяца осмотр мест инокуляции показал наличие обширных некрозов в опытных вариантах растений (до 30–40 мм), в то время как на саженцах, инокулированных водой (контроль), ранки затянулись. На растениях, инокулированных бактериями родов *Ewingella* и *Rouxiella*, появились трещины, сформировались довольно широкие валики возле ран, и отмечен некроз хвои – она стала рыжего цвета. У саженцев, инокулированных бактериями рода *Stenotrophomonas*, отмечены аналогичные проявления заболевания. При заражении бактериями рода *Brevibacterium* усохли вершинки, вокруг ранок с инокулятом отмечены черные потеки экссудата. На 3 год после инокуляции бактериями саженцы пихты справились со всеми признаками заболевания: на стволиках и на хвое не видны следы инокулирования. В настоящее время это вполне здоровые деревца.

На основании проведенных опытов можно заключить, что в возникновении заболевания «бактериальная водянка» принимает участие не одна группа бактерий. Полагаем, что для дерева не опасно вторжение одного вида фитопатогена, с которым его иммунная система вполне в силах справиться. Для запуска развития патологического процесса необходим комплекс микроорганизмов и неблагоприятное стечение факторов окружающей среды, что все вместе ослабляет устойчивость древостоев к заболеваниям.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЛ СО РАН (№ FWES-024-0029).

Литература

Alizadeh M., Khakvar R., Babai-Ahari A. Isolation and characterization of bacterial agents associated of wetwood disease on elm trees in Iran // Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. 2017. Vol. 52, No.2. P. 157–168.

Gary M. Bacterial Wetwood or Slime Flux [Электронный ресурс]. 2004. Режим доступа: <http://agsci.psu.edu> (<http://agsci.psu.edu/>)

Гродницкая И.Д., Сенашова В.А., Трусова М.Ю., Пашкеева О.Э., Баранчиков Ю.Н. Состав и фитопатогенные свойства эндофитных бактерий, выделенных из древесины *Pinus sibirica* Du Tour, пораженной бактериальной водянкой, в Прибайкалье // Сибирский лесной журнал. 2023. № 1. С. 70–84.

Кирай З., Клемент З., Шоймойши Ф., Вереш Й. Методы фитопатологии. М.: Колос, 1974. 343 с.

Рыбалко Т.М., Гукасян А.Б. Бактериозы хвойных Сибири. Новосибирск: Наука, 1986. 84 с.

Черпаков, В.В. Этиология бактериальной водянки древесных растений // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2017. № 220. С. 125–139.