

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 579.64 : 632.937

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ *PANTOEAE BRENNERI* КАК СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

© 2023 г. Д. С. Бульмакова^{1,*}, Г. И. Шагиева^{1,**}, Д. Л. Иткина^{1,***}, О. А. Ленина^{2,****},
М. Р. Шарипова^{1,*****}, А. Д. Сулейманова^{1,*****}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия

²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук,
420029 Казань, Россия

*e-mail: daria_bulmakova@mail.ru

**e-mail: gulsatsagieva2@gmail.com

***e-mail: laia9301@mail.ru

****e-mail: leninaox@mail.ru

*****e-mail: marsharipova@gmail.com

*****e-mail: aliya.kzn@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 15.05.2023 г.

Принята к публикации 31.05.2023 г.

Исследована антагонистическая активность штаммов *Pantoea brenneri* в отношении широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов. Установлено, что штаммы характеризуются фунгицидной активностью в отношении микромицетов *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Ascochyta kamchatica*, *Colletotrichum coccodes*, и антибактериальной активностью в отношении фитопатогена *Erwinia amylovora*, вызывающего бактериальный ожог плодовых деревьев. Показано, что суспензия клеток и супернатант культуральной жидкости штаммов *Pantoea brenneri* способны подавлять фузариозы на клубнях картофеля при его хранении. Установлено, что штаммы *P. brenneri* являются безопасными для модельных животных. Сделано заключение о перспективах использования штаммов *P. brenneri* в качестве объектов для создания экологически безопасных средств защиты растений от фитопатогенов.

Ключевые слова: биоконтроль, биобезопасность, ризосферные бактерии, фитопатогенные микроорганизмы, *Erwinia amylovora*

DOI: 10.31857/S0026364823050033, **EDN:** UHEADW

ВВЕДЕНИЕ

За последние 50 лет население планеты выросло более чем в два раза. Этот фактор неизбежно привел к сокращению площади земли, доступной для выращивания продовольственных культур. В агропроизводстве на передний план выдвигаются вопросы защиты сельскохозяйственных растений, поскольку уровень развития патогенной микрофлоры в почве и на семенном материале достиг критического значения. Ущерб, причиняемый сельскому хозяйству патогенными микроорганизмами, растет из года в год во всем мире. Более 80% всех известных болезней растений вызываются микромицетами – самой широкой группой возбудителей заболеваний (Titova, Krasnovaeva, 2019).

Фузариозная сухая гниль картофеля, вызываемая микромицетами *Fusarium* spp., является основным разрушительным заболеванием, вызыва-

ющим загнивание клубней при хранении. Потери от *Fusarium* – ассоциированной сухой гнили, по некоторым оценкам, снижают урожайность до 25% при влиянии на развитие проростков картофеля, и более 60% клубней могут быть поражены при длительном хранении урожая (Lastochkina et al., 2020). Опасным и широко распространенным заболеванием растений во всем мире считается аскохитоз, возбудителем которого являются грибы *Ascochyta* spp., а потери урожая составляют до 50%. Современные меры борьбы с аскохитозом включают в себя уничтожение зараженных растений и применение химических фунгицидных препаратов (Bartetti et al., 2021). Представители рода *Rhizoctonia* являются почвенными фитопатогенами, мицелий которых обволакивает корни растений и может проникать в почву на глубину более 25 см. Растения, пораженные данными микроорганизмами, гибнут. Меры борьбы включают в себя агротехнические и химические приемы (Li et al., 2021). В 2019 году

впервые было обнаружено сильнейшее заболевание растений (антракноз) в Китае, возбудителем которого является гриб рода *Colletotrichum*. Вспышка болезни, вызванная этим возбудителем, привела к 60% гибели сельскохозяйственных культур. В настоящее время для борьбы с фитопатогенными микромицетами используются сильные химические фунгициды, которые вызывают пестицидный стресс у растений и снижают качество сельскохозяйственной продукции (Zhang et al., 2021).

Помимо микромицетов, большой ущерб наносят и фитопатогенные бактерии. Ожог плодовых культур — одно из опаснейших заболеваний, поражающих растения. Его возбудитель *Erwinia amylovora* вызывает некрозы всех органов растений-хозяев (Ordax et al., 2015). Экономический ущерб от ожога плодовых деревьев выражается как в потерях урожая и гибели плодовых, так и в затратах на выкорчевку и уничтожение больных растений, проведение профилактических химических обработок против возбудителя болезни и его переносчиков, а также карантинных фитосанитарных мероприятий. Методы борьбы с *E. amylovora* являются предметом многих исследований. Первоначально было показано, что антибиотики, в частности стрептомицин, являются эффективным средством контроля бактериальной инфекции при обработке растений во время цветения (Johnson, 1993). Длительное использование антибиотика привело к появлению устойчивых к стрептомицину популяций *E. amylovora*, что вызывает беспокойство медицинских сообществ, использующих антибиотик в терапевтических целях (Förster et al., 2015). В мире в качестве агентов биологической борьбы с бактериальным ожогом широко используются штаммы *Pantoea vagans* C9-1, *P. ananatis* BRT175, *P. agglomerans* E325 и P10c, *Pseudomonas fluorescens* A506, *Bacillus subtilis* QST713 и BD170 (Walterson, 2014). В нашей стране частные и промышленные сады занимают большие площади, а применяемые меры борьбы не препятствуют акклиматизации возбудителя. Согласно “Списку пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации” в настоящее время в нашей стране не зарегистрировано биопрепаратов для борьбы с возбудителем бактериального ожога плодовых культур.

На современном этапе очевидна важнейшая роль биологических методов повышения урожайности и сохранности сельскохозяйственных культур, в том числе использования почвенных ризосферных микроорганизмов. Полезные ризобактерии можно назвать “растительными пробиотиками”, которые увеличивают рост, урожайность, эффективность использования питательных веществ, устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам (Rochlani et al., 2022). В свою очередь, коммерциализация биоудобрений на основе бак-

терий ограничена в связи со сложностью использования лабораторных штаммов в полевых условиях из-за ряда факторов (физико-химические свойства почвы, взаимодействие с другими ризосферными организмами, экологические факторы). Важной стратегией для преодоления этих ограничений является применение автохтонных микроорганизмов, адаптированных к климатическим условиям региона (Etesami et al., 2021). Все большую значимость приобретает применение бактериальных удобрений на основе ассоциативных ризобактерий, стимулирующих рост растений, которые являются неотъемлемой частью ризосферной биоты. В связи с высокой адаптацией к широкому диапазону питательных сред, быстрым темпам роста и биохимической универсальностью метаболизма, ризобактерии рассматривают как необходимый компонент в управлении агрокультурами. Микробиологический способ защиты растений от болезней основан на природном явлении антагонизма бактерий по отношению к фитопатогенам. Он реализуется с использованием таких механизмов, как способность к конкуренции за питательные вещества и пространство, продукция сидерофоров, литических ферментов, антибиотиков (Santoyo et al., 2021).

Ранее нами из почв Республики Татарстан были выделены фитатгидролизующие штаммы, идентифицированные с помощью MLSA-анализа как *Pantoea brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1 (Suleimanova et al., 2015, 2021). В предыдущих исследованиях уже показаны положительные эффекты отдельных штаммов на растения: установлена способность к секреции комплекса гидролитических ферментов (фитазы, протеазы, целлюлазы), деструкции цианидов (HCN), синтезу фитогормонов и сидерофоров (Itkina et al., 2021). Целью данной работы явилось изучение антагонистической активности штаммов *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1 в отношении широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Исследовалась антибиотическая активность бактериальных штаммов *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1. В качестве тест-культур использовали бактериальный штамм *Erwinia amylovora* (коллекция микроорганизмов ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии”) и штаммы микромицетов *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Ascochyta kamchatica*, *Colletotrichum coccodes* (коллекция микроорганизмов НИЛ “Агробиоинженерия” ФГАОУ ВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”).

Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов. Культивирование бактериаль-

ных штаммов осуществляли на питательной среде LB (г/л): триптон — 1.0, дрожжевой экстракт — 0.5, NaCl — 0.5. Культивирование штаммов проводили в пробирках при соотношении объема среды к объему пробирки 1 : 5 на лабораторных орбитальных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин при температуре 30°C.

Штаммы микромицетов культивировали в лабораторных термостатах при 25–28°C на среде Чапека (г/л): сахароза — 30.0, NaNO₃ — 3.0, KH₂PO₄ — 1.0, MgSO₄ × 7H₂O — 0.5, KCl — 0.5, FeSO₄ × 7H₂O — 0.01, агар — 20.0.

Совместное культивирование штаммов *Pantoea brenneri* и *Erwinia amylovora* проводили на следующих питательных средах (г/л): NAS (сахароза — 50.0, агар — 15.0), King B (пептон — 20.0, глицерин — 10.0, KH₂PO₄ — 1.5, MgSO₄ × 7H₂O — 1.5, агар — 15.0), LB, R2A (дрожжевой экстракт — 0.5, пептон — 0.5, гидролизат казеина — 0.5, крахмал — 0.5, глюкоза — 0.5, K₂HPO₄ — 0.3, MgSO₄ × H₂O — 0.3, NaCl — 0.3, агар — 15), NAG (глюкоза — 10.0, агар — 15.0), 925 (глюкоза — 5.0, K₂HPO₄ — 3.0, NaH₂PO₄ — 1.0, NH₄Cl — 1.0, MgSO₄ × H₂O — 0.3, агар — 15.0).

Измерение оптической плотности (ОП) суспензии клеток проводили на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 590 нм.

Получение супернатанта. В работе использовали супернатант культуральной жидкости штаммов *Pantoea brenneri*. Клетки культивировали на питательной среде LB при температуре 30°C в течение 18 ч. Далее клетки осаждали путем центрифугирования при 10000 об./мин в течение 15 мин. Полученный супернатант пропускали через мембранный фильтр (Millipore, Германия) с диаметром пор 0.22 мкм и использовали для дальнейшей работы.

Определение антагонистической активности. Антагонистическую активность бактериальных штаммов по отношению к тест-культурам микромицетов определяли методом двойных культур на среде Чапека (Егоров, 2004). Бактериальные штаммы предварительно высевали на чашку Петри газоном, используя 100 мкл 18-часовой культуры. Далее в центр чашки выкладывали агаровый блок с культурой патогена. В контрольном варианте использовали культуру гриба без бактериальных штаммов. Анализ чашек проводили через 10–14 сут, определяя размер зон ингибирования роста мицелия. Степень ингибирования определяли по формуле: $I = (1 - A/B) \times 100\%$, где I — ингибирование роста колонии патогена (%), A — диаметр роста гриба в варианте с бактериальным штаммом (см), B — диаметр роста гриба в контроле (см) (Netrusov, 2005).

Антагонистическую активность бактериальных штаммов по отношению к тест-культуре *Erwinia amylovora* определяли аналогично путем совместного культивирования на различных питательных

средах (NAS, King B, LB, R2A, NAG, 925). Готовили 18-часовые культуры штаммов и доводили оптическую плотность (ОП) суспензии клеток *Pantoea brenneri* — до 1.0, *Erwinia amylovora* — до 0.1. Поверхность чашки Петри засеивали газоном суспензией *E. amylovora*, после чего в центр чашки пипеткой вносили по 5 мкл суспензии штаммов *Pantoea brenneri*. В контрольных вариантах использовали культуры *Erwinia amylovora* и *Pantoea brenneri*, растущие по-отдельности. Об уровне антагонистической активности штаммов судили по диаметрам зон задержки роста тест-культуры вокруг колоний бактерий-антагонистов. Анализ проводили через 48–72 ч культивирования.

Оценка жизнеспособности микромицетов. Оценку жизнеспособности микромицетов в присутствии бактериальных штаммов проводили путем окрашивания граничащего с бактериями мицелия гриба красителями [нейтральный красный (Sigma, Германия) в концентрации 0.1 мг/мл или Эванс голубой (Sigma, Германия) в концентрации 0.5 мг/мл] и дальнейшего микроскопирования на световом микроскопе “МС300” (Австрия) (Jiang et al., 2019). В качестве контроля проводили аналогичное окрашивание и микроскопирование мицелия гриба, культивируемого без бактериальных штаммов.

Определение способности исследуемых штаммов подавлять фузариозы клубней картофеля. Для работы использовали выращенные в тепличных условиях здоровые, неповрежденные клубни картофеля сорта “Балтик Роуз”, любезно предоставленные к.б.н. З. Сташевски, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Сорт “Балтик Роуз” восприимчив к основным послепосевным заболеваниям картофеля, включая фузариозную сухую гниль. Клубни промывали в водопроводной воде для удаления почвы и дезинфицировали путем погружения в 10%-й раствор гипохлорита натрия на 20 мин, после чего трижды промывали стерильной дистиллированной водой и высушивали. В клубнях продельвали отверстия глубиной 1.5–2 см и диаметром 1–1.3 см. В эксперименте использовали следующие контрольные и опытные группы.

Контрольная группа 1 — клубни инокулировали агаровыми дисками со штаммами *Fusarium sambucinum* и *F. oxysporum*. Контрольная группа 2 — клубни инокулировали путем внесения пипеткой суспензии каждого из бактериальных штаммов *Pantoea brenneri* в объеме 200 мкл. Контрольная группа 3 — клубни инокулировали стерильной водой в объеме 200 мкл.

Для обоих исследуемых патогенов проводили как превентивную обработку штаммами бактерий, так и обработку бактериями после заражения патогеном. Опытная группа 1 — клубни инокулировали суспензиями бактериальных штаммов в объеме 200 мкл, через 24 ч добавляли агаровые диски со штаммами *Fusarium oxysporum* или *F. sam-*

Таблица 1. Коэффициент ингибирования роста фитопатогенных микромицетов бактериальными штаммами *Pantoea brenneri* (%)

Штаммы	Коэффициент ингибирования роста						
	<i>Fusarium sambucinum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Ascochyta kamchatica</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>
<i>P. brenneri</i> 3.1	88.8 ± 4.4	38.8 ± 1.9	38.2 ± 2.0	86.8 ± 4.1	37.5 ± 1.2	65.5 ± 3.5	52.3 ± 2.9
<i>P. brenneri</i> 3.2	89.8 ± 4.7	17.7 ± 0.9	75.0 ± 3.3	86.8 ± 3.9	25.0 ± 1.9	66.6 ± 3.5	56.7 ± 3.2
<i>P. brenneri</i> 3.5.2	68.8 ± 3.4	22.2 ± 1.15	85.3 ± 4.0	85.8 ± 4.2	77.5 ± 2.7	82.2 ± 3.9	50.0 ± 3.0
<i>P. brenneri</i> 3.6.1	87.8 ± 4.3	55.5 ± 2.9	77.9 ± 3.9	86.8 ± 3.6	87.5 ± 3.9	86.6 ± 3.8	40.6 ± 1.9

bucinum. Опытная группа 2 — клубни инокулировали агаровыми дисками со штаммами *F. oxysporum* или *F. sambucinum*, через 24 ч добавляли пипеткой суспензии бактериальных штаммов в объеме 200 мкл. Опытная группа 3 — клубни инокулировали супернатантом культуральной жидкости бактериальных штаммов в объеме 200 мкл, через 24 ч добавляли агаровые диски с *F. sambucinum*. Опытная группа 4 — клубни инокулировали агаровыми дисками с *F. sambucinum*, через 24 ч добавляли супернатанты культуральной жидкости бактериальных штаммов в объеме 200 мкл.

Клубни инкубировали при температуре 25°C в течение 21 сут. Далее делали разрез от поверхности вдоль участка инокуляции для измерения ширины и глубины некроза тканей (в мм). Глубину проникновения фузариозной гнили рассчитывали по формуле (Mejdoub-Trabelsi et al., 2017): $P = [1/2 + (p - 6)]/2$, где P — проникновение гнили (мм), l — максимальная ширина зоны некроза (мм), p — максимальная глубина зоны некроза (мм). Переводили значения в процентное соотношение относительно контроля. Коэффициент поражения фузариозной гнили рассчитывали по формуле: $P = [(W/2) + D - 5] \times 2$, где W — ширина некроза (мм), а D — глубина некроза (мм) (Sellem et al., 2017).

Определение вирулентности, токсичности и токсигенности бактерий. Определение вирулентности, токсичности и токсигенности бактерий проводили на белых мышах обоего пола линии ICR (CD-1) в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария, для кормления использовали стандартный корм. Для каждой экспериментальной группы были отобраны по пять мышей одного возраста массой 16 ± 0.5 г. Вирулентность штаммов определяли путем однократного перорального, либо внутрибрюшинного введения животным 24-часовой бактериальной культуры в стерильном физиологическом р-ре в дозах 10^6 , 10^7 и 10^8 КОЕ на одно животное. Токсичность изучали путем внутрибрюшинного введения мышам взвеси 18-часовой культуры микроорганизмов в стерильном физиологическом р-ре, инаktivированной нагреванием при 60°C в течение 90 мин. Токсигенность

определяли путем внутрибрюшинного и перорального введения стерильного фильтрата культуральной жидкости трехсуточных и семисуточных культур бактерий. При этом контрольной группе животных вводили стерильную жидкую питательную среду. Наблюдение за животными осуществляли на протяжении 30 суток. Из каждой опытной группы были отобраны случайным образом по три мыши. Животных усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения р-ра хлоральгидрата из расчета 8 мг/0.1 мл на 20 г массы животного. В асептических условиях производили забор образцов тканей. Внутренние органы обследовали на выявление патологий. Производили посев крови, взятой из сердца, печени и селезенки на питательную агаризованную среду LB.

Все эксперименты с животными проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета по защите животных, используемых для научных целей (2010/63/ЕС). Протоколы экспериментов одобрены Комитетом по содержанию и использованию животных ФНИЦ “Казанский научный центр РАН” (протокол № 2 от 09.06.2022).

Статистический анализ. Статистический анализ результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали 95%-й доверительный интервал для средних величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фунгицидная активность штаммов *Pantoea brenneri*

Изучаемые штаммы *P. brenneri* обладали способностью ингибировать рост исследуемых фитопатогенных микромицетов (рис. 1, а, б; табл. 1). Максимальный антагонизм отмечен в отношении *Fusarium sambucinum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* и *Ascochyta kamchatica*, где степень ингибирования роста фитопатогена находилась в среднем в пределах 70–85%. При этом наиболее высокие показатели коэффициента ингибирования *Fusarium sambucinum* отмечены у штаммов *Pantoea brenneri* 3.1 ($88.8 \pm 4.4\%$), 3.2 ($89.8 \pm 4.7\%$) и 3.6.1 ($87.8 \pm 4.3\%$); *Fusarium solani* — у штаммов *Pantoea brenneri* 3.5.2

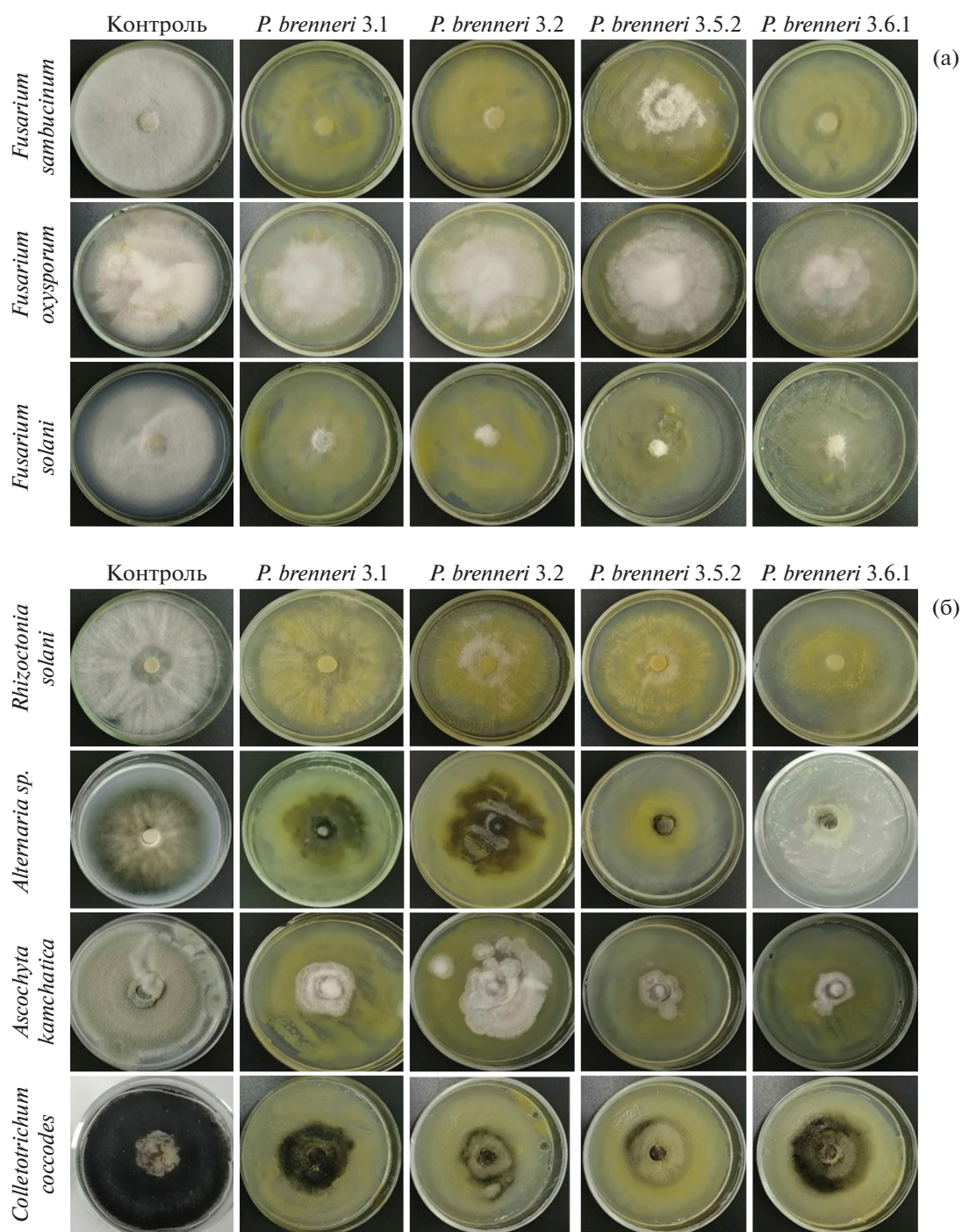


Рис. 1. Антагонистическая активность штаммов *Pantoea brenneri* в отношении фитопатогенных микромицетов *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. solani* (а) и *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Ascochyta kamchatica*, *Colletotrichum coccodes* (б).

(85.3 ± 4.0%) и 3.6.1 (77.9 ± 3.9%); *Ascochyta kamchatica* — у штаммов *Pantoea brenneri* 3.5.2 (82.2 ± 3.9%) и 3.6.1 (86.6 ± 3.8%). Все исследуемые штаммы *P. brenneri* имели схожие значения степени ингибирования роста *Rhizoctonia solani* (от 85.8 ± 4.2 до 86.8 ± 4.1%) (табл. 1).

Для изучения природы антагонистической активности почвенных изолятов, оценивали жизне-

способность микромицетов в присутствии бактериальных штаммов. Жизнеспособность мицелия при совместном росте с бактериальными штаммами (опыт) и без (контроль) оценивали путем окрашивания и дальнейшего микроскопирования культур. В качестве красителя, избирательно окрашивающего лишь жизнеспособные клетки, использовали нейтральный красный. Данный агент

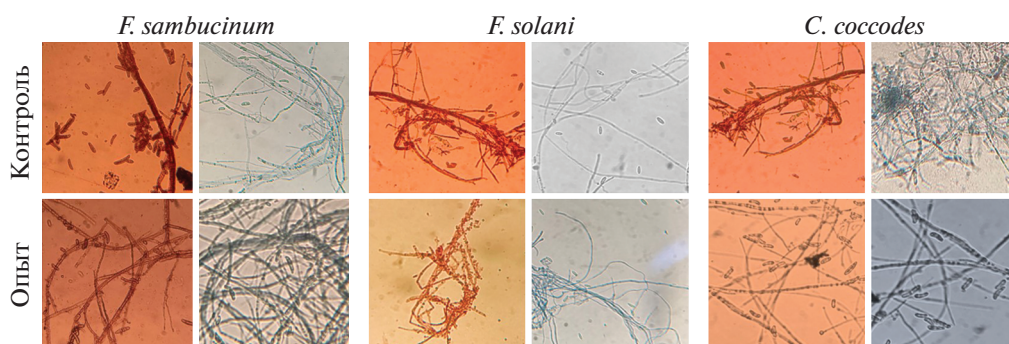


Рис. 2. Эффект взаимодействия штамма *Pantoea brenneri* 3.2 с фитопатогенными микромицетами *Fusarium sambucinum*, *F. solani* и *Colletotrichum coccodes*. Мицелий окрашивали красителями Эванс голубым (мертвые клетки окрашиваются в синий цвет) и нейтральным красным (жизнеспособные клетки окрашиваются в красный цвет). Опыт — мицелий гриба, растущего совместно с бактериальным штаммом, контроль — мицелий, растущий без бактериального штамма. Световая микроскопия, $\times 40$.

ввиду липофильной природы проходит через клеточную мембрану (непротонированная форма), а в кислых компартментах присоединяет протон (протонированная форма) и окрашивает их в малиновый цвет (Dubrovsky et al., 2006). Краситель Эванс голубой был использован для обнаружения поврежденных или мертвых клеток, плазматическая мембрана которых легко пропускает крупные анионы данного красителя и клетки окрашиваются в синий цвет (Evans, Schulemann, 1914).

Совместное культивирование штамма *Pantoea brenneri* 3.2 с микромицетами *Fusarium sambucinum*, *F. solani*, и *Colletotrichum coccodes* приводило к окрашиванию мицелия в темно-синий (при использовании красителя Эванс голубого) и светло-красный цвет (при использовании красителя нейтрального красного), тогда как для мицелия с контрольных чашек показана слабая синяя окраска и яркая красная, соответственно (рис. 2). Повидимому, присутствие бактериальных клеток в бинарной культуре вызывало разрушение грибных гиф, указывая на фунгицидную природу антагонистического действия штамма *Pantoea brenneri* 3.2 в отношении микромицетов *Fusarium sambucinum*, *F. solani* и *Colletotrichum coccodes*.

Аналогичная противогрибная активность представителей рода *Pantoea* установлена в ряде исследований. Так, штамм *Pantoea* sp. OXWO6B1, выделенный с поверхности семени дикого овса, ингибировал рост возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* в условиях *in vitro* и *in vivo* (Town et al., 2016). Показаны эффективные фунгицидные свойства штаммов *Pantoea dispersa* RO-18, RO-20, RO-21 и SO-13 по отношению к фитопатогену *Ceratocystis fimbriata*, являющемуся возбудителем черной гнили на сладком картофеле. Суспензия клеток ингибировала рост *C. fimbriata* в среднем до 70%, а супернатант культуральной жидкости ингибировал прорастание спор на 36%. При этом наблюдались аномальные изменения в

морфологии грибных гиф, включая их набухание, лизис клеточной стенки, разрыв, грануляцию и вакуолизацию. С другой стороны, штаммы *Pantoea ananatis* SH-9 и SH-3 обладали не фунгицидной, а фунгистатической активностью в отношении *Ceratocystis fimbriata* (Jiang et al., 2019). Полученные нами результаты показали, что штамм *Pantoea brenneri* 3.2 обладает фунгистатическим механизмом действия в отношении микромицетов *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp. и *Ascochyta kamchatica*, поскольку существенных различий в окраске мицелия, растущего в контрольных и в опытных чашках, выявлено не было, тогда как ингибирование роста фитопатогенов наблюдалось (рис. 1).

Способность штаммов *Pantoea brenneri* к подавлению фузариозов на клубнях картофеля

Помимо лабораторных исследований фунгицидной активности штаммов *P. brenneri*, проводили дополнительные эксперименты на клубнях картофеля. Инфицирование клубней микромицетами *Fusarium oxysporum* и *F. sambucinum* привело к обширному некрозу тканей (рис. 3). Бактериальные штаммы, как и контроль со стерильной дистиллированной водой, не вызывали заражение клубней, некроза тканей не наблюдали. Бактериальные штаммы проявили сильную ингибирующую активность: рост фитопатогенных микромицетов был подавлен. Показано, что при профилактической обработке клубней суспензией бактериальных штаммов за 24 ч перед заражением микромицетами *F. oxysporum* и *F. sambucinum* ингибирование роста гриба на клубнях составило от $44.7 \pm 2.3\%$ до $50.3 \pm 2.4\%$ и от $43.6 \pm 2.1\%$ до $59.2 \pm 2.9\%$ соответственно (табл. 2). В случае терапевтической обработки бактериальными суспензиями уже зараженных микромицетами клубней картофеля ингибирование роста *F. oxysporum* состави-

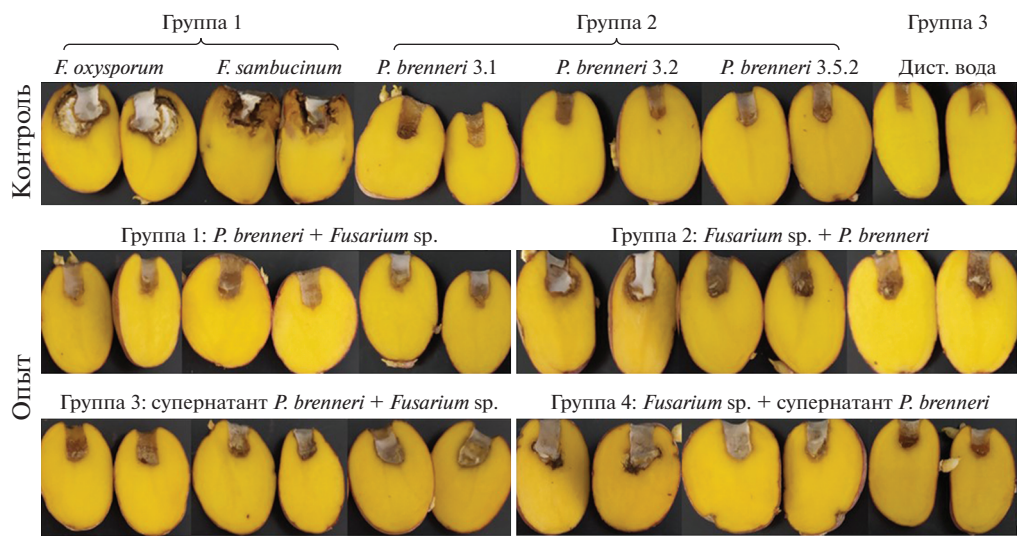


Рис. 3. Результат обработки клубней картофеля суспензией клеток и супернатантов культуральной жидкости штаммов *Pantoea brenneri* до и после заражения фитопатогенными микромицетами *Fusarium oxysporum* и *F. sambucinum*.

ло от $38.8 \pm 1.8\%$ до $50.7 \pm 2.5\%$, а *F. sambucinum* — от $40.8 \pm 1.9\%$ до $50.7 \pm 2.5\%$.

Эксперименты при использовании супернатанта культуральной жидкости для профилактики и терапии клубней картофеля показали в среднем более высокие значения ингибирования роста фитопатогенов в отличие от использования бактериальной суспензии. В случае профилактической обработки, ингибирование роста патогена *F. sambucinum* составило от 50.7 ± 3.2 до $56.3 \pm 2.8\%$, в случае терапевтической — от $33.8 \pm 3.1\%$ до $57.3 \pm 2.8\%$ (табл. 2). Во всех случаях максимальное ингибирование отмечено при обработке штаммом *Pantoea brenneri* 3.2 (табл. 2).

Рассчитывали коэффициент поражения фузариозной гнилью клубней картофеля, с помощью которого оценивали тяжесть заболевания (табл. 3). Установлено, что при профилактической обработке клубней бактериальными штаммами за 24 ч до инфицирования *Fusarium oxysporum* коэффици-

ент поражения был в среднем ниже по сравнению с обработкой после заражения патогеном. Максимальным фунгицидным действием при всех способах обработки обладал штамм *Pantoea brenneri* 3.2 (табл. 3).

Более эффективное защитное действие штаммов *Pantoea brenneri* отмечено при инфицировании картофеля *Fusarium sambucinum* — пораженность клубней фузариозной гнилью снизилась почти вдвое (табл. 3). Также показано, что при профилактической обработке клубней суспензией клеток и супернатантом за 24 ч перед заражением *F. sambucinum* интенсивность поражения была ниже, по сравнению с обработкой клубней после инфицирования. Максимальным фунгицидным действием обладал штамм *Pantoea brenneri* 3.2 — при профилактической обработке клубней этим штаммом коэффициент поражения *Fusarium sambucinum* был снижен почти вдвое относительно контроля (табл. 3).

Таблица 2. Ингибирование роста фитопатогенов *Fusarium oxysporum* и *F. sambucinum* при профилактической и терапевтической обработке клубней картофеля суспензией клеток и супернатантом культуральной жидкости бактериальных штаммов *Pantoea brenneri* (%)

Действие	<i>P. brenneri</i> 3.1	<i>P. brenneri</i> 3.2	<i>P. brenneri</i> 3.5.2
<i>F. oxysporum</i>			
Профилактика (суспензия клеток)	44.7 ± 2.3	50.3 ± 2.4	44.7 ± 2.4
Терапия (суспензия клеток)	38.8 ± 1.8	50.7 ± 2.5	40.3 ± 2.0
<i>F. sambucinum</i>			
Профилактика (суспензия клеток)	43.6 ± 2.1	59.2 ± 2.9	43.7 ± 2.1
Терапия (суспензия клеток)	42.3 ± 2.4	50.7 ± 2.5	40.8 ± 1.9
Профилактика (супернатант)	54.8 ± 3.6	56.3 ± 2.8	50.7 ± 3.2
Терапия (супернатант)	33.8 ± 3.1	57.3 ± 2.8	51.7 ± 2.8

Таблица 3. Коэффициент поражения фузариозной гнилью клубней картофеля (мм) при обработке штаммами *Pantoea brenneri* до и после заражения фитопатогенными микромицетами *Fusarium oxysporum* и *F. sambucinum*

Действие	<i>P. brenneri</i> 3.1	<i>P. brenneri</i> 3.2	<i>P. brenneri</i> 3.5.2	<i>F. oxysporum</i> (контроль)
Профилактика (суспензия клеток)	40 ± 1	39 ± 1	41.5 ± 2	44.5 ± 2
Терапия (суспензия клеток)	43 ± 2	42 ± 2	43 ± 2	
				<i>F. sambucinum</i> (контроль)
Профилактика (суспензия клеток)	38.5 ± 2	34 ± 1	44 ± 2	71 ± 3
Терапия (суспензия клеток)	39 ± 2	39.5 ± 1	60.5 ± 3	
Профилактика (супернатант)	38 ± 2	33.5 ± 1	38 ± 1	
Терапия (супернатант)	63 ± 3	38 ± 1	51 ± 3	

Таким образом, из всех изучаемых штаммов *Pantoea brenneri* наиболее высокой активностью подавления фузариоза клубней картофеля, вызванного фитопатогенными микромицетами *Fusarium oxysporum* и *F. sambucinum*, обладал штамм *Pantoea brenneri* 3.2. При этом наибольший эффект достигался при использовании супернатанта культуральной жидкости. Вероятно, наибольшей фунгицидной активностью обладают именно экзометаболические продукты *P. brenneri*, что согласуется с данными литературы. Так, одним из свойств стимулирующих рост растений микроорганизмов является их способность угнетать патогенную флору путем продукции биологически активных соединений, в частности, аммиака, синильной кислоты, множества ферментов (Khan et al., 2018). Имеются данные о продукции бактериями биосурфактантов с выраженными мультифункциональными свойствами. По химическому строению они разнообразны, но имеют общее преимущество — безопасность с экологической точки зрения. Микробные сурфактанты могут изменять физико-химические свойства среды обитания и оказывать влияние на структуру развивающегося микробного сообщества, предотвращая бактериальные эпидемии и грибные заболевания, являясь фактором биоконтроля среды (Chernyavskaya et al., 2016). К синтезу биосурфактантов способен штамм *P. ananatis* BRT175, в геноме которого идентифицированы гены *rhlA* и *rhlB*, участвующие в биосинтезе биосурфактанта рамнолипида, оказывающие цитотоксическое действие (Smith et al., 2016). Бактерии рода *Pantoea* способны к синтезу бацилломицина и итурина, подавляющих возбудителей коричневой гнили плодов — *Monilinia fructigena* и *M. laxa* (Lahlali et al., 2018). Штамм *Pantoea* sp. продемонстрировал способность к синтезу биосурфактанта гликолипида ананатозидов А и рамнолидов, обладающих поверхностно-активными свойствами, низкой токсичностью, высокой стабильностью и биоразлагаемостью (Tan, Li, 2018).

Антибактериальная активность штаммов *Pantoea brenneri*

При исследовании антагонистической активности штаммов *P. brenneri* в отношении фитопатогенной бактерии *Erwinia amylovora* наблюдали зоны подавления роста тест-культуры на питательных средах R2A и 925. В обоих случаях наибольший диаметр зон сдерживания роста отмечен для штаммов *Pantoea brenneri* 3.2 (17–24 мм), 3.5.2 (17–23 мм) и 3.6.1 (20–22 мм). При этом на остальных питательных средах антагонизма не наблюдали. Вероятно, состав среды определяет антагонистическую активность бактерий. Ранее было показано, что при использовании в лабораторных экспериментах различных питательных сред наблюдалось как ингибирование, так и стимуляция роста патогена *Erwinia amylovora* штаммами *Pseudomonas vancoverensis*, *P. congelans*, *P. protegens*, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, *Enterobacter ludwigii* (Mikiciński et al., 2020).

Вирулентность, токсичность и токсигенность штаммов *Pantoea brenneri*

Важным этапом при разработке экологических биоудобрений является изучение их биобезопасности. По результатам проведенных экспериментов с использованием белых мышей показано, что исследуемые штаммы *P. brenneri* являются безопасными для жизнедеятельности животных: в течение эксперимента животные оставались активными, физиологические отправления и поведенческие реакции сохранялись без изменений. Вирулентность, токсигенность и токсичность бактериальных штаммов не обнаружена.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что изучаемые бактериальные штаммы *P. brenneri* характеризуются высокой антагонистической активностью в отношении широкого спектра фитопатогенных микромицетов, в частности *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Ascochyta kamchatica*, *Colletotrichum coccodes*, являющихся

возбудителями множества серьезных заболеваний растений. При этом, суспензия клеток и супернатант культуральной жидкости штаммов *Pantoea brenneri* подавляли фузариозы на клубнях картофеля при его хранении. Штаммы проявляли антагонистическую активность в отношении фитопатогенной бактерии *Erwinia amylovora*, вызывающей бактериальный ожог плодовых культур. Установлено, что бактериальные штаммы являются безопасными для модельных животных. На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что по основным характеристикам и биобезопасности штаммы *P. brenneri* обладают высоким практическим потенциалом и могут служить основой для разработки экологически безопасных средств защиты растений от фитопатогенов.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансирована грантами РНФ № 21-76-00017 и РНФ № 19-76-00020. Авторы выражают благодарность З. Сташевски и ФИЦ КазНЦ РАН за предоставление клубней картофеля для эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barbetti M.J., Khan T.N., Pritchard I. et al. Challenges with managing disease complexes during application of different measures against foliar diseases of field pea. *Plant Dis.* 2021. V. 105. P. 616–627. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1470-RE>
- Chernyavskaya M.I., Sidorenko A.V., Golenchenko S.G. et al. Ecological microbiology: textbook.-method. allowance. Izdatelstvo BGU, Minsk, 2016. (in Russ.)
- Dubrovsky J.G., Guttenberger M., Saralegui A. et al. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. *Ann. Bot.* 2006. V. 97. P. 1127–1138. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl045>
- Egorov N.S. Fundamentals of the doctrine of antibiotics. Nauka, Moscow, 2004 (in Russ.).
- Etesami H., Jeong B.R., Glick B.R. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to p uptake by plant. *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. Art. 699618. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>
- Evans H.M., Schulemann W. The action of vital stains belonging to the benzidine group. *Science.* 1914. V. 39. P. 443–454. <https://doi.org/10.1126/science.39.1004.443>
- Förster H., McGhee G.C., Sundin G.W. et al. Characterization of streptomycin resistance in isolates of *Erwinia amylovora* in California. *Phytopathology.* 2015. V. 105. P. 1302–1310. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-15-0078-R>
- Itkina D.L., Suleimanova A.D., Sharipova M.R. *Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 as potential biocontrol and plant growth-promoting agents. *Mikrobiologiya.* 2021. V. 90. P. 204–214 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0026365621020063>
- Jiang L., Jeong J.C., Lee J.S. et al. Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 16354. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52804-3>
- Johnson K.B. Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology.* 1993. V. 83. P. 995–1002.
- Khan A., Singh P., Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – siderophore: a review. *Microbiol. Res.* 2018. V. 212. P. 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Lahlali T., Berke J. M., Vergauwen K. et al. Novel potent capsid assembly modulators regulate multiple steps of the hepatitis B virus life cycle. *Agents Chemother.* 2018. V. 62. P. 672–615. <https://doi.org/10.1128/AAC.00835-18>
- Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D. et al. The effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and salicylic acid on some resistance and quality traits of stored *Solanum tuberosum* L. tubers infected with *Fusarium* dry rot. *Plants.* 2020. V. 9. Art. 738. <https://doi.org/10.3390/plants9060738>
- Li D., Li S., Wei S. et al. Strategies to manage rice sheath blight: lessons from interactions between rice and *Rhizoctonia solani*. *Rice (NY).* 2021. V. 14. Art. 21. <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00466-z>
- Mejdoub-Trabelsi B., Aydi Ben Abdallah R., Ammar N. et al. Antifungal potential of extracellular metabolites from *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. naturally associated to potato against *Fusarium* species causing tuber dry rot. *J. Microb. Biochem. Technol.* 2017. V. 9. P. 181–190. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000364>
- Mikiciński A., Puławska J., Molzhigitova A. et al. Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Eur. J. Plant Pathol.* 2020. V. 156. P. 257–272. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01885-x>
- Netrusov F.I. Workshop on microbiology. Moscow, 2005 (in Russ.).
- Ordax M., Piquer-Salcedo J.E., Santander R.D. et al. Medfly *Ceratitis capitata* as potential vector for fire blight pathogen *Erwinia amylovora* : survival and transmission. *PLOS One.* 2015. V. 10. Art. e0127560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127560>
- Rochlani A., Dalwani A., Shaikh N.B. et al. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers: application in agricultural sustainability. *Acta Scientific Microbiology.* 2022. V. 5. P. 12–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00003-3>
- Santoyo G., Guzman-Guzman P., Parra-Cota F.I. et al. Plant growth stimulation by microbial consortia. *Agronomy.* 2021. V. 11. Art. 219. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>
- Sellem I., Triki M.A., Elleuch L. et al. The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum*. *J. Basic Microbiol.* 2017. V. 57 (5). P. 393–401. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600604>
- Smith D.D.N., Nickzad A., Stavriniades J. A novel glycolipid biosurfactant confers grazing resistance upon *Pantoea ananatis* BRT175 against the social amoeba *Dictyostelium*

- um discoideum*. ASM J. 2016. V. 1. Art. e00075–15.
https://doi.org/10.1128/mSphere.00075-15
- Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L. R. et al. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1. Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 6790–6799.
https://doi.org/10.1128/AEM.01384-15
- Suleimanova A.D., Itkina D.L., Pudova D.S. et al. Identification of *Pantoea* phytate-hydrolyzing rhizobacteria based on their phenotypic features and multilocus sequence analysis (MLSA). Mikrobiologiya. 2021. V. 90. P. 100–109 (in Russ.).
https://doi.org/10.31857/S0026365621010122
- Tan Y.N., Li Q. Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources. Microb. Cell Fact. 2018. V. 17. P. 89–92.
https://doi.org/10.1186/s12934-018-0938-3
- Titova Yu.A., Krasnobaeva I.L. Multiconversion biopreparations for plant protection and the possibility of their use in organic farming. Tekhnologii i tekhnicheskie sredstva mekhanizirovannogo proizvodstva produkcii rastenievodstva i zhivotnovodstva. 2019. V. 2. P. 164–183 (in Russ.).
- Town J., Audy P., Boyetchko S.M. et al. High-quality draft genome sequence of biocontrol strain *Pantoea* sp. Oxwo6b1. Genome Announc. 2016. V. 4. Art. e00582-16.
https://doi.org/10.1128/genomeA.00582-16
- Walterson A.M., Smith D.D.N., Stavrinides J. Identification of a *Pantoea* biosynthetic cluster that directs the synthesis of an antimicrobial natural product. PLoS One. 2014. V. 9. Art. e96208.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096208
- Zhang Y., Sun W., Ning P. et al. First report of anthracnose of papaya (*Carica papaya* L.) caused by *Colletotrichum siamense* in China. Plant Dis. 2021. V. 105. Art. 2252.
https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2154-PDN

Antagonistic Strains of *Pantoea brenneri* as Plant Protectors

D. S. Bulmakova^{a, #}, G. I. Shagieva^{a, ##}, D. L. Itkina^{a, ###}, O. A. Lenina^{b, ####},
M. R. Sharipova^{a, #####}, and A. D. Suleimanova^{a, #####}

^aKazan Federal University, Kazan, Russia

^bInstitute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

[#]e-mail: daria_bulmakova@mail.ru

^{##}e-mail: gulsatsagieva2@gmail.com

^{###}e-mail: laia9301@mail.ru

^{####}e-mail: leninaox@mail.ru

^{#####}e-mail: marsharipova@gmail.com

^{#####}e-mail: aliya.kzn@gmail.com

The antagonistic activity of *Pantoea brenneri* strains against a wide range of phytopathogenic threats was studied. It has been established that the strains are characterized by fungicidal activity against the micromycetes *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Ascochyta kamchatica*, *Colletotrichum coccodes* as well as antibacterial activity against the phytopathogen *Erwinia amylovora*, which causes bacterial burn of fruit trees. It has been shown that the cell suspension and supernatant of the culture liquid of *Pantoea brenneri* strains suppress *Fusarium* on potato tubers during storage. *Pantoea brenneri* strains have been found to be safe for model animals. A conclusion was made about the prospects of using *P. brenneri* strains as objects for the creation of environmentally friendly plant protection products against phytopathogens.

Keywords: biocontrol, biosafety, *Erwinia amylovora*, phytopathogenic microorganisms, rhizospheric bacteria