УДК 635.21:632.3/.4:632.9:579.64 doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.116rus

ПСИХРОФИЛЬНЫЕ ПСЕВДОМОНАДЫ-ЭНДОФИТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ В БИОКОНТРОЛЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ И ГНИЛОСТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ХОЛОДИЛЬНОМ ХРАНЕНИИ КАРТОФЕЛЯ*

А.В. ЩЕРБАКОВ[1], Е.Н. ЩЕРБАКОВА[1], С.А. МУЛИНА[1, 2], П.Ю. РОЦ[1, 2], Р.Ф. ДАРЬЮ[3], Е.И. КИПРУШКИНА[4], Л.Н. ГОНЧАР[5], В.К. ЧЕБОТАРЬ[1]

При хранении продовольственного и семенного картофеля существенные потери обусловлены высоким фитопатогенным фоном семян и клубней. В связи с этим внимание исследователей привлекают биологические средства защиты на основе биоконтрольных микроорганизмов. Род *Pseudomonas* бактерий, относящихся к группе PGPR (plant-growth promoting rhizobacteria), включает виды, наиболее эффективно колонизирующие высшие растения и используемые в биопрепаратах. Нами впервые исследованы особенности влияния психрофильного штамма бактерий *Pseudomonas* sp. RF13H на сохранность клубней холодоустойчивых промышленных сортов картофеля, рекомендованных для выращивания в Ленинградской области, определена эффективность защиты клубней от ряда фитопатогенных организмов в условиях холодильного хранения, оценена динамика численности интродуцируемого штамма на поверхности клубней в период хранения. С помощью флуоресцентной in situ гибридизации и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии впервые изучена локализация клеток бактерий и колонизация ими поверхности клубней при нормальной и пониженной температуре, указывающая на взаимовыгодные условия растительно-микробных отношений. Определив таксономическое положение ряда штаммов псевдомонад методами молекулярно-генетического анализа и охарактеризовав их хозяйственно ценные физиологические свойства (фунгицидная и бактерицидная активность, скорость роста в диапазоне пониженных температур, продукция ауксиноподобных фитогормонов), мы выявили перспективный психрофильный штамм *Pseudomonas* sp. RF13H и изучили возможности его применения для повышения сохранности и оптимизации биохимических процессов в клубнях картофеля при низкотемпературном хранении. Так, обнаружено снижение частоты фитопатогенных микроорганизмов на поверхности клубней при их обработке *Pseudomonas* sp. RF13H. Среднее число клубней, пораженных всеми типами инфекций, при такой обработке снизилось более чем на 50 % в сравнении с контролем. Тенденция сохранялась на протяжении 3 мес: в контрольных образцах доля пораженных клубней достигала 30 %, в то время как интродукция биоконтрольного штамма позволила уменьшить этот показатель до 10-13 %. При температуре 4 °С численность биоконтрольного штамма бактерий на поверхности клубней оставалась достаточно стабильной на протяжении 5 мес, существенно снизившись к концу хранения до следовых количеств. Отмечено формирование микроколоний бактерий, которые часто локализованы в углублениях и нишах на поверхности клубня. Кроме того, высокая плотность бактерий была обнаружена на границе между клетками перидермы клубней и в местах экссудации биохимических веществ, которые служат питанием для бактерий. При сравнительном изучении функции ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы) установлено, что интродукция *Pseudomonas* sp. RF13H способствует активации окислительно-восстановительных процессов, повышая устойчивость клубней к заражению. Показано, что изучаемый штамм положительно влияет на состав микробиома эпидермиса картофеля. В итоге вследствие индукции собственного иммунитета и создания барьера для проникновения болезнетворного организма заражение клубня снижается.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, картофель, биоконтроль фитопатогенов, флуоресцентная in situ гибридизация.

В последние годы отмечается быстрый рост резистентности фитопатогенов и появление их новых видов, в том числе распространяющихся вместе с импортируемыми семенами (1, 2). В картофелеводстве с инфицированностью клубней связаны как потери при хранении, так и угроза повторного заражения вегетирующих растений. По данным ФАО ООН, в России среднедушевое потребление картофеля одно из самых больших в мире — 130 кг в год (3). Картофель относится к культурам с высоким потенциалом урожайности, но из-за преимущественно вегетативного размножения он

* Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-16-00146. Исследования выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Геномные технологии и клеточная биология» (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии).

крайне восприимчив к грибным, бактериальным и вирусным патогенам.

Рост устойчивости возбудителей и вспышки заболеваний приводят к увеличению применяемых доз химических препаратов, что, в свою очередь, индуцирует новое повышение устойчивости патогенов. Поэтому для экологической стабильности растениеводства актуальны подходы, предполагающие использование средств защиты на основе биоконтрольных микроорганизмов — естественных обитателей экосистемы (4), которые обладают избирательностью действия и позволяют избежать нежелательных изменений в биоценозах, а также сохранить полезные свойства продукции (5). Большинство таких микроорганизмов синтезируют различные метаболиты, индуцирующие в растении каскад защитных реакций (6). Кроме того, при взаимодействии с растением бактерии могут повышать его жизнеспособность, тем самым регулируя численность фитопатогенов. В результате формируются несколько уровней защиты, включающих прямую конкуренцию с фитопатогеном, продукцию биопленок и антибиотических веществ, а также индукцию собственного иммунитета растения.

Особый интерес представляют эндофитные бактерии (7, 8), обитающие в растительных тканях, что делает их менее зависимыми от внешних факторов. Однажды внедрившись в ткани растения, эндофиты с комплексом хозяйственно полезных признаков могут способствовать формированию длительной защиты макроорганизма от стрессовых факторов (9).

Изучение микробиома у картофеля (*Solanum tuberosum* L.) касалось как ризосферы, так и эндосферы (10-12), при этом показано, что биоразнообразие микроорганизмов часто зависит от сорта и фазы развития растения. В основном подобные исследования проводились на вегетирующих частях (13-15), но не клубнях после сбора урожая. В одной из работ, оценивая динамику микробных популяций в клубнях при хранении, авторы ограничились несколькими бактериальными таксонами (16). Среди недавних заслуживающих внимания публикаций следует отметить сообщение об анализе эндофитного миробиома клубней в процессе хранения с использованием как классических методов выделения и идентификации микроорганизмов, так и при помощи высокопроизводительного NGS (next generation sequencing) (17). Отметим, что для отнесения изолята к эндофитам недостаточно выделить его из тканей после поверхностной стерилизации. Необходима визуализация бактерий внутри растения — например, с помощью флуоресцентных маркеров (зондов или белков) (18, 19).

В настоящее время мировая практика использования бактериальных препаратов для хранения картофеля только начала формироваться, в связи с чем возникает множество вопросов о механизмах взаимодействия в сложной системе растение—патоген—антагонист: что происходит с индуцируемым штаммом после нанесения на клубни и в процессе хранения, как изменяется его численность и распределение на поверхности клубней, как температура хранения влияет на эти процессы. Выяснение этого позволит прогнозировать эффект и корректировать применение бактериальных препаратов, а вовлечение в исследования местных сортов — создать полноценную практически значимую модель.

Научная новизна представляемой работы заключается в том, что впервые исследованы особенности влияния психрофильного штамма бактерий *Pseudomonas* sp. RF13H на сохранность клубней холодоустойчивых сортов картофеля, рекомендованных для выращивания в Ленинградской области (Невский и Сударыня). Определена эффективность защиты клубней от ряда фитопатогенов при холодильном хранении, оценена динамика численности интродуцируемого штамма на поверхности клубней на про-

тяжении всего строка хранения. С помощью современных методов визуализации впервые изучена колонизация *Pseudomonas* sp. RF13H поверхности клубней, характер которой указывает на взаимовыгодные растительно-микробные отношения. На основании этих результатов, полученных с использованием промышленных сортов, могут разрабатываться рекомендации для практического применения психрофильного штамма *Pseudomonas* sp. RF13H в технологиях производства, хранения и репродукции картофеля.

Цель работы — уточнить таксономическую принадлежность психрофильного штамма *Pseudomonas* sp. RF13H и изучить его биоконтрольную эффективность (сохранность клубней картофеля и происходящие в них биохимические процессы), а также локализацию бактерий на поверхности клубней в условиях низкотемпературного хранения.

Методика. Объектом изучения биоконтрольного эффекта штаммов был картофель (*Solanum tuberosum* L.) сортов Невский (среднепоздний) и Сударыня (среднеранний). Партии сортового картофеля были получены из Ленинградского НИИ сельского хозяйства «Белогорка».

Штаммы псевдомонад, включая *Pseudomonas* sp. RF13H, ранее были выделены из тканей сфагнового мха *Sphagnum fallax* в составе экстремофильного эндофитного сообщества (20). Культуру выращивали 48 ч при температуре 28 °С, используя жидкую среду TSB (Tryptic Soy Broth, «Scharlab, S.L.», Испания), после чего готовили рабочую суспензию (10^8 КОЕ/мл). Клубни картофеля опрыскивали бактериальным препаратом (в контроле — водой), подсушивали на воздухе и закладывали на хранение при комнатной температуре и 4 °С. Использовали тест-культуры основных возбудителей заболеваний вегетативных органов растений семейства пасленовых при холодильном хранении (*Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). Микромицеты культивировали на картофельно-декстрозном агаре PDA («BD», США), фитопатогенные бактерии — на голодном картофельном агаре (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии — ВНИИСХМ). Штаммы фитопатогенных грибов и бактерий получены из коллекции лаборатории технологии микробных препаратов (ВНИИСХМ).

Для анализа вариабельности V3-V6 участков гена 16S рРНК из чистых 24-часовых культур исследуемых штаммов бактерий выделяли ДНК стандартным методом (лизис клеток с применением лизоцима, протеиназы К и SDS и экстракция смесью фенола с хлороформом). ПЦР проводили в термоциклере Bio-Rad C1000 («Bio-Rad», США). ДНК гена 16S-рРНК амплифицировали с использованием праймеров BD1/FD1 в предусмотренном для них режиме (21). После очистки из геля соответствующие фрагменты секвенировали с внутренними праймерами fD1/rD1, охватывающими вариабельные области V3-V6 гена 16S-рРНК, согласно протоколу фирмы «Beckman Coulter, Inc.» (США) для 8-канального секвенатора SEQ8000 с коммерческим набором SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) with Quick Start Kit («Beckman Coulter, Inc.», США).

Видовую принадлежность изолятов определяли с помощью программ BLAST (GenBank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) и Ribosomal Database Project (http://rdp.cme.msu.edu/). Выравнивание установленных нуклеотидных последовательностей с референсными последовательностями из базы GenBank и построение филогенетических деревьев проводили с использованием UGENE («UniPro», Россия).

При изучении физиологических свойств штаммов сравнивали их фунгицидную и бактерицидную активность, скорость роста в диапазоне пониженных температур (4-10 °С) и продукцию ауксиноподобных фито-

гормонов. Фунгицидную активность определяли методом колодцев (22), бактерицидную — методом агаровых блоков (23). Численность интродуцированных и аборигенных микроорганизмов на поверхности клубней учитывали при микробиологических посевах (24, 25). Состав ауксинов в экстрактах культуральной жидкости анализировали с помощью системы высокопроизводительной жидкостной хроматографии (ВЖХ, HPLC) Waters ACQUITY UPLC H-class с флуоресцентным детектором («Waters», США).

Активность системы антиоксидантной защиты в клубнях определяли по содержанию в проростках малонового диальдегида (МДА) и пероксидазы (ПО). Перекисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации окрашенного комплекса, образуемого МДА в кислой среде при температуре около 100 °С (26), активность каталазы (КАТ) — по скорости деградации перекиси водорода, активность ПО — по оптической плотности продуктов окисления гваякола за определенный промежуток времени (27). За единицу активности СОД принимали 50 % ингибирования при образовании формазана в реакции с нитросиним тетразолием (28).

Дизайн олигонуклеотидного зонда для мишени при FISH (флуоресцентная in situ гибридизации) осуществляли с помощью интернет-ресурса IDT (28). Разработанный зонд был маркирован флуорохромом 6FAM. Режим гибридизации зонда — 60 °С, 90 мин. Подготовку растительных тканей и гибридизацию проводили по описанным процедурам (29, 30). Препараты анализировали с применением конфокального микроскопа Leica TCS SPE («Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH», Германия). Для детекции флуоресценции олигонуклеотидного зонда использовали лазер (λ = 488 нм), флуоресценцию регистрировали в диапазоне 508-566 нм. Изображения визуализировали в программе Leica Confocal Software («Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH», Германия).

Каждый из показателей (фунгицидная и бактерицидная активность, скорость роста колоний при пониженных температурах, активность ферментов и численность микроорганизмов на поверхности клубней) оценивали в трех независимых экспериментах. Анализ содержания ауксинов проводили в 3-кратной повторности. Статистическую обработку числовых значений выполняли с помощью программы DIANA (ВНИИСХМ) при уровне значимости $p = 0,05$.

Результаты. Таксономия исследуемых изолятов. Род *Pseudomonas* очень разнообразен, и его таксономия до сих пор претерпевает уточнения (31, 32). На основании полученных морфологических и физиолого-биохимических характеристик 10 изучаемых штаммов из лабораторной коллекции были отнесены в группу «*P. fluorescens–P. asplenii–P. poae*».

Чтобы получить более полное представление о таксономическом положении изучаемых штаммов, провели анализ вариабельных участков V3-V6 гена 16S-рРНК. Наибольшую вариабельность отмечали на участках в позициях 557-586 и 624-685, соответствующих нуклеотидным позициям в гене 16S-рРНК *Escherichia coli* (рис. 1, А). Полученные последовательности были выравнены с доступными референсными последовательностями из базы GenBank. В качестве референсов использовали консенсусные выравнивания для каждого предполагаемого вида — *P. fluorescens*, *P. poae*, *P. asplenii*, *P. koreensis*, *P. moraviensis*. Филогенетическое дерево (см. рис. 1, Б), построенное на основе анализа указанных участков, отражало таксономическое положение изученных изолятов следующим образом: штаммы AF12F, RM13D, AF24C оказались более тесно связаны с подгруппой *P. koreensis*, *P. moraviensis*, в то время как RM11C, RM14B располагались ближе к виду

P. asplenii. Штаммы RF14J, RF12C, RF14H, RM13C, RF13H, вероятно, следует рассматривать как представителей еще не описанных видов.

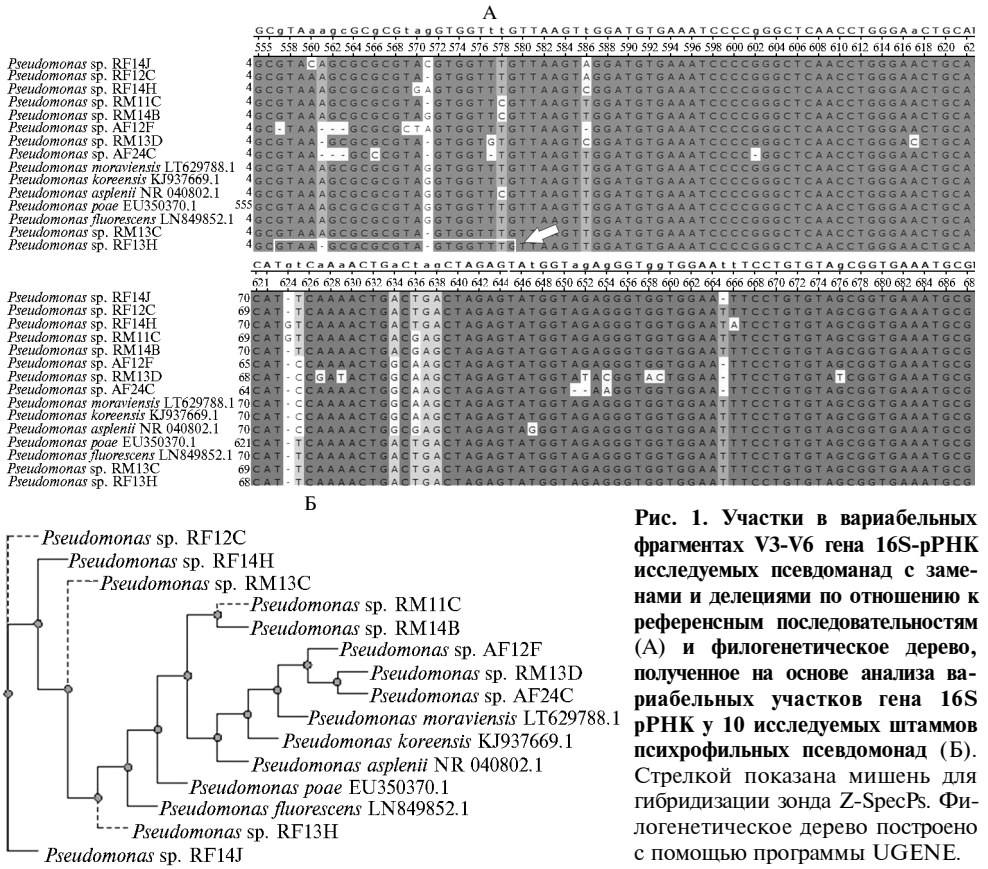


Рис. 1. Участки в вариабельных фрагментах V3-V6 гена 16S-рРНК исследуемых псевдоманад с заменами и делециями по отношению к референсным последовательностям (А) **и филогенетическое дерево, полученное на основе анализа вариабельных участков гена 16S рРНК у 10 исследуемых штаммов психрофильных псевдомонад** (Б). Стрелкой показана мишень для гибридизации зонда Z-SpecPs. Филогенетическое дерево построено с помощью программы UGENE.

У всех штаммов мы изучили способность к психрофильному росту и развитию (в диапазоне температур 0-10 °С), подавлению фитопатогенных и гнилостных микроорганизмов, продукцию ауксиноподобных фитогормонов (индолил-3-уксусной, индолил-3-карбоновой, индолил-3-молочной кислот). Как было показано, штаммы псевдомонад различались по скорости роста при пониженных температурах: у большинства он существенно замедлялся при 6-7 °С и полностью подавлялся при 5 °С. Однако в диапазоне 7-10 °С все штаммы в течение 7 сут культивирования на агаре R_2A формировали колонии диаметром 3-4 мм. Рост штаммов RF13H и RM14B наблюдался в диапазоне положительных температур, близких к нулю (интервал 2-4 °С): через 7 сут низкотемпературного роста бактерии формировали на поверхности питательной среды колонии диаметром 1-2 мм.

Оценка антагонистической активности в отношении фитопатогенных и гнилостных микроорганизмов картофеля (рис. 2, А) показала, что у ряда штаммов (RF13H, RF14J, RM14B, RF12C) она явно выражена (подавление развития возбудителей, вызывающих порчу картофеля при низкотемпературном хранении). По совокупности физиологических свойств мы отобрали штамм *Pseudomonas* spp. RF13H, который обладал более выраженной активностью в отношении грибов и бактерий, образуя оптически чистые зоны (без включений мицелия тест-культуры фитопатогена) и продуцировал ауксиноподобные фитогормоны (см. рис 2, Б). У этого штамма как перспективного для практического применения мы изучили физиоло-

гическую активность при колонизации поверхностных структур клубня.

А

Штамм	Рост при низких температурах, °С													Антагонизм				АУ
	15	12	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	*PS*	*CM*	*FS*	*AA*	
Pseudomonas sp. RM13C														10	12	17	22	-
Pseudomonas sp. RF13H														12	10	22	27	+
Pseudomonas sp. RF14J														7	8	13	15	-
Pseudomonas sp. AF12F														12	10	10	12	-
Pseudomonas sp. AF24C														5	2	7	8	-
Pseudomonas sp. RM13D														10	12	15	17	-
Pseudomonas sp. RM11C														8	12	22	22	-
Pseudomonas sp. RM14B														14	17	17	12	+
Pseudomonas sp. RF12C														1	3	4	4	-
Pseudomonas sp. RF14H														1	2	2	5	-

Б

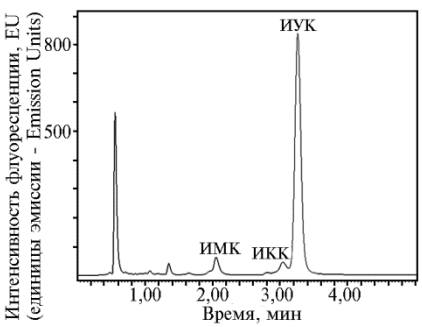
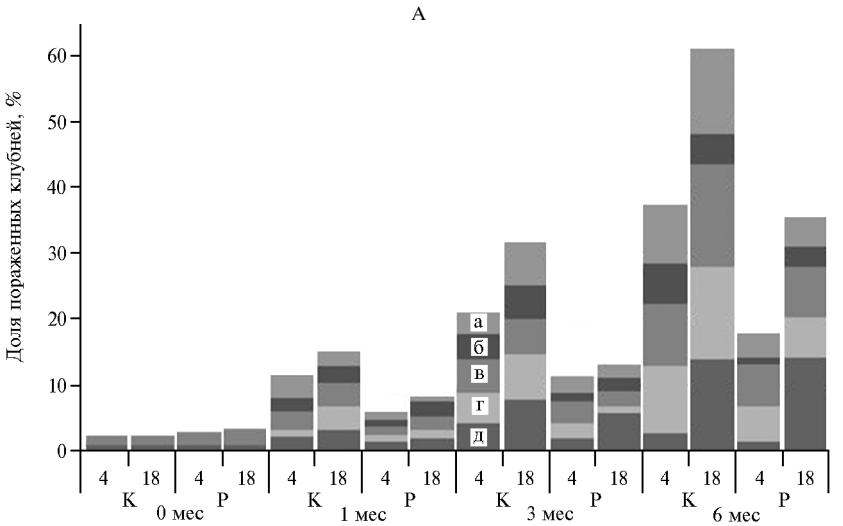


Рис. 2. Физиолого-биохимические (потенциально адаптивные) свойства изучаемых штаммов псевдомонад: А — психрофильный рост, диаметр (мм) зон задержки роста *Pseudomonas solanacearum* (*PS*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*CM*), *Fusarium solani* (*FS*), *Alternaria alternata* (*AA*) и продукция акусинов (АУ, наличие или отсутствие); Б — результаты анализа культуральной жидкости штамма RF13H, выращенного на среде с L-триптофаном, методом высокопроизводительной жидкостной хроматографии (Waters ACQUITY HPLC H-class с флуоресцентным детектором, «Waters», США): ИМК — индолил-3-молочная кислота, ИКК — индолил-3-карбоновая кислота, ИУК — индолил-3-уксусная кислота.

Динамика численности интродуцированного штамма *Pseudomonas* sp. RF13H и его влияние на процессы хранения. Чтобы создать благоприятные условия для адаптации бактерий-антагонистов и проявления их активности, клубни инокулировали монокультурой опытного штамма псевдомонад в послеуборочный (лечебный) период. Его продолжительность по общепринятой технологии хранения картофеля — 14 сут, в течение которых клубни выдерживают при температуре 18 °С. Этот режим также обеспечивает активную суберенизацию в местах механических повреждений и укрепление покровных тканей.

Общая численность мезофильной сапротрофной микрофлоры на единице поверхности клубней в процессе хранения колебалась в пределах 10^3-10^4 КОЕ/см^2. Интродукция штамма *Pseudomnas* sp. RF13H повлияла на фитопатогенный фон (рис 3, А), а также соотношение и динамику численности сапрофитной микрофлоры (см. рис. 3, Б) при длительном хранении (в течение 6 мес). Исследуемый микроорганизм достаточно хорошо приживался на поверхности клубней и поддерживал свою численность в течение всего времени эксперимента. Можно отметить, что низкотемпературное хранение в целом положительно сказывалось на штамме RF13H в силу как его физиологических свойств, так и особенностей бактериальной популяции в целом. Известно, что при температуре 4 °С на поверхности твердых питательных сред бактерии разных видов длительно (до полугода) сохраняют жизнеспособность (33). Лимитирующим фактором служит пересыхание питательной среды, вызывающее гибель популяции. То же, вероятно, происходит на поверхности клубней и при нормальной температуре хранения: снижение численности интродуцированного штамма здесь было наиболее выражено, и через 6 мес его находили в остаточных количествах. Численность *Pseudomnas* sp. RF13H при температуре 4 °С поддерживалась достаточно стабильно на протяжении 5 мес, существенно снизившись только к концу хранения, когда этот штамм обнаруживался в следовых количествах.



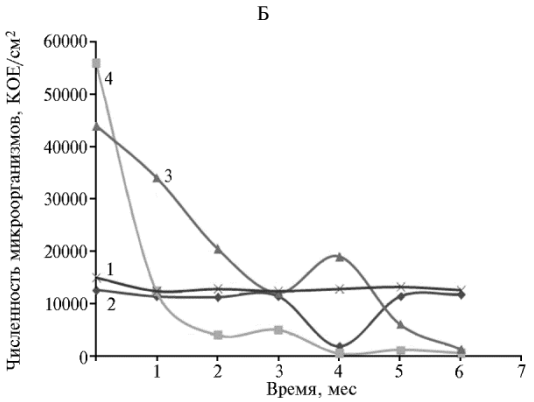


Рис. 3. Фитопатогенная нагрузка на поверхности клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский под влиянием интродуцированного штамма *Pseudomnas* sp. RF13H (А) **и его численность на фоне аборигенной микрофлоры в зависимости от температуры** (Б) **при хранении:** а — *Penicillium* spp., б — *Rhizoctonia* spp., в — *Fusarium* spp., г — *Phytophtora* spp., д — *Phoma exiqua*; К и Р — соответственно контроль (необработанные клубни) и интродукция псевдомонад; 1 — контроль, 2 — посторонние микроорганизмы, 3 и 4 — численность штамма *Pseudomnas* sp. RF13H при хранении соответственно при 4 °С и 18 °С.

Тем не менее, влияние штамма на состав и численность фитопатогенных грибов (см. рис. 3, А) оказалось довольно значительным, на что указывали результаты фитопатологического анализа. Установлено, что при хранении картофеля наиболее выраженным было развитие фитопатогенных микромицетов — *Rizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Phytophthora* spp., *Phoma exiqua*. Уже через 30 сут хранения их частота в популяции снижалась (в наибольшей степени при холодильном хранении). Средняя доля клубней, пораженных всеми типами инфекций, при обработке бактериальной культурой через 30 сут снизилась с 11,5 до 5,9 % (при холодильном хранении) и с 15,0 до 8,3 % (при комнатной температуре). Эта тенденция сохранялась на 3-й мес: в контрольных образцах количество пораженных клубней достигало 30 %, в то время как интродукция биоконтрольного штамма позволила снизить показатель до 10-13 %. Через 6 мес при комнатной температуре наблюдалось значительное (до 60,0 %) поражение клубней, при пониженной — примерно вдвое меньшее (37,4 %).

Особую роль в регуляции клеточной активности играют ферменты антиоксидантной защиты (АОЗ), действие которых сводится не только к контролю образования свободных радикалов, но и к выполнению в клетках важных сигнальных функций (как при стрессе, так и в норме) (34-36). Окислительно-восстановительные процессы рассматриваются как одна из основ физиолого-биохимических механизмов, определяющих жизнеспособность и сохранность клубней картофеля. При длительном хранении или неблагоприятных условиях накапливаются продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижается функция антиоксидантной системы (37).

При обработке полезными бактериальными культурами, которая усиливает эту функцию, вследствие повышения собственного иммунитета растения и создания барьера, препятствующего проникновению болезнетворного организма, происходит рост устойчивости к заражению патогенами. Известно, что микроорганизмы, заселяя поверхность картофеля, индуцируют генерацию активных форм кислорода (АФК), поэтому полезную микрофлору можно использовать для реализации защитных ответов растительной клетки при заражении. В этой связи представлялось важным изучить влияние штамма *Pseudomonas* sp. RF13H на образование АФК и функционирование ферментов антиоксидантной защиты (38).

Продолжительное хранение приводило к резкому подавлению активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и накоплению продуктов ПОЛ (табл.), в частности малонового диальдегида (МДА). Активность пероксидазы не изменялась при хранении. Повышенная температура способствовала активации свободно-радикальных реакций и ПОЛ, приводящих к снижению жизнеспособности и качества картофеля. В течение 3 мес активность ферментов колебательно уменьшалась во всех образцах. При этом рост активности ферментов коррелировал с усилением ПОЛ. После 6 мес хранения увеличивалась активность как ферментов, так и ПОЛ, что связано с началом выхода картофеля из физиологического покоя. При обработке биоконтрольным штаммом все исследуемые ферменты заметно активировались, что свидетельствует о повышении защитного потенциала клубней при длительном хранении.

Показатели активности про- и антиоксидантной системы клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский при обработке биоконтрольным штаммом *Pseudomonas* sp. RF13H в зависимости от температуры хранения

Срок хранения, мес	Контроль (обработка водой)				Опыт			
	ПОЛ	СОД	КАТ	ПО	ПОЛ	СОД	КАТ	ПО
Хранение при 4 °С								
0	8,4	0,05	0,51	60,8	8,6	0,57	0,57	69,4
1	6,7	0,03	0,34	74,5	6,3	1,61	0,56	104,8
3	6,3	0,07	0,13	50,1	5,8	1,23	0,43	112,6
6	9,8	0,05	0,36	84,3	6,8	1,83	0,78	120,1
Хранение при 18 °С								
0	8,7	0,05	0,54	60,2	8,5	0,74	0,56	106,4
1	9,4	0,04	0,38	79,3	6,9	1,83	0,66	120,5
3	10,1	0,06	0,25	67,2	6,2	1,98	0,71	110,3
6	12,3	0,08	0,41	88,9	7,3	2,11	0,84	124,7
$НСР_{05}$	0,80	0,01	0,50	5,40	2,10	0,30	0,10	7,10

Примечание. СОД — супероксиддисмутаза, ед.; ПОЛ — перекисное окисления липидов, мкмоль/г; КАТ — каталаза, ммоль/(мин·г); ПО — пероксидаза, мкмоль/(мин·г). Активность ПОЛ, КАТ и ПО указана в расчете на 1 г сырой массы.

Стратегия колонизации штаммом *Pseudomonas* sp. RF13H поверхности клубней картофеля. Для изучения приживаемости интродуцированного штамма RF13H в условиях холодильного хранения картофеля мы разработали олигонуклеотидный зонд Z-SpecPs (5′→3′: CAAACCACTACGCGCGCTTAC), который специфически связывался с соответствующей уникальной мишенью при флуоресцентной FISH-гибридизации in situ (см. рис 1, А). Через 24 ч после инокуляции клубней особенностью локализации биоконтрольного микроорганизма бактерий, визуализированного при помощи зонда Z-SpecPs и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии, было неупорядоченное и неравномерное распределение на наружном слое покровных тканей (рис. 4, А, Б). В перидерме покровных тканей наблюдали нескольких рядов живых (феллоген и феллодерма) и омертвевших клеток (феллема); они очень плотно упакованы, имеют прямоугольную форму, встречаются изодиаметрические (округлые) и вытянутые клетки. Покровный опробковевший слой защищает клубни

от потери влаги, проникновения фитопатогенных микроорганизмов и от других неблагоприятных внешних воздействий. Большинство клеток штамма RH13H в течение первых суток после интродукции не занимали определенных ниш на поверхности, и только незначительная часть локализовалась в местах нарушения верхних слоев перидермы.

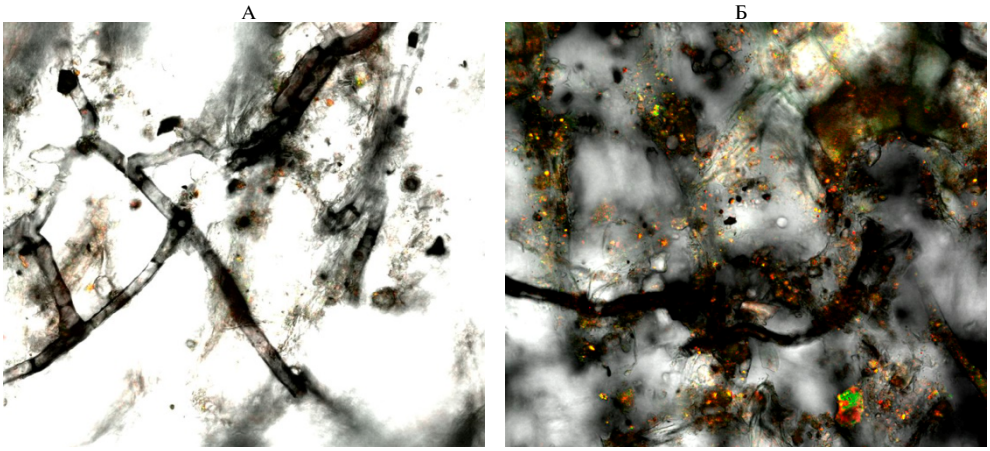


Рис. 4. Локализация интродуцированных бактерий *Pseudomonas* sp. RF13H на поверхности клубней картофеля сорта Сударыня через 24 ч после инокуляции: А — грибной мицелий, флуоресценция указывает на скопления клеток штамма RF13H; Б — разрозненные неупорядоченно локализованные микроколонии бактерий по поверхности клубня, высокая численность бактерий на единице площади. FISH-гибридизация (флуорохром 6FAM, Cy3) с конфокальной микроскопией (Leica TCS SPE, «Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH», Германия).

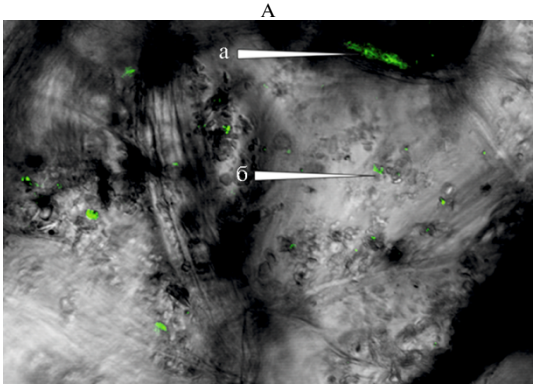
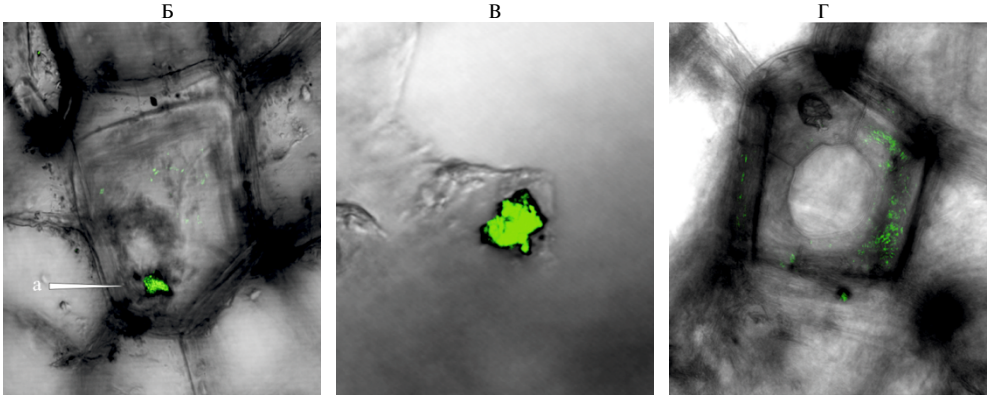


Рис. 5. Локализация интродуцированных бактерий *Pseudomonas* sp. RF13H на поверхности клубней картофеля сорта Невский через 2 мес хранения: А — наиболее распространенная локализация: стыки клеток перидермы (а) и поверхность самих клеток (б); Б, В — формирование микроколоний биоконтролного штамма RF13H в микротрещинах (поранениях), царапинах поверхности; Г — активная колонизация внутреннего пространства чечевичек. FISH-гибридизация (флуорохром 6FAM) с конфокальной микроскопией (Leica TCS SPE, «Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH», Германия).



Конфокальная микроскопия поверхности клубней выявила неравномерность ее рельефа. Через 2 мес холодильного хранения клубней, обработанных суспензией биоконтрольного штамма, наблюдали формирова-

ние его микроколоний, которые часто располагались в различных углублениях и нишах на поверхности, трещинах в кожице, в царапинах, порезах, местах ушибов, механических повреждений (рис. 5, А, Б). По-видимому, вещества, которые накапливаются при механических повреждениях (индолилуксусная, аскорбиновая, хлорогеновая кислоты, гиббереллин, аденозинтрифосфорная кислота) (39) и стимулирующие раневую реакцию (образование раневой перидермы) привлекательны для интродуцированных бактерий.

Кроме того, высокую плотность инокулята отмечали на границе между клетками перидермы клубней (см. рис. 5, А, а), где бактерии обычно располагались вдоль узких удлиненных продольных клеток, дифференцированных в зоне вторичной покровной ткани. Вероятнее всего, небольшие, прямоугольные, слегка утолщенные и плотно сложенные клетки с тонкими оболочками — это метаболически активные клетки феллогена. Они имеют густую вязкую цитоплазму и многочисленные органоиды, связанные с процессами синтеза, которые обеспечивают деление ядра и цитоплазмы (40). Можно предположить, что биохимическая активность в феллогене способствует формированию микроколоний биоконтрольного штамма. В то же время было установлено, что он способен активно колонизировать чечевички — микроскопические щели (отверстия) на поверхности, через которые в клубень поступает кислород воздуха и удаляется углекислый газ и водяной пар (дыхание клубня) (см. рис. 5, Г).

При микроскопировании поверхностных тканей клубня был обнаружен грибной мицелий, занимающий некоторые локальные участки пораженной перидермы. Скопления бактериальных клеток интродуцированных псевдомонад выявлялись в непосредственной близости от мицелия (см. рис. 4, А). Наблюдали раннюю фазу развития гриба на верхнем слое клеток с формированием внутриклеточного (изредка — межклеточного) мицелия. Яйцевидный или лимоновидные зооспорангии, схожие с зооспорангиями *Phytophthora infestans*, имели тонкую гладкую оболочку и хорошо заметный бугорок на вершине, однако на разрезе клубня мы не наблюдали ржаво-бурой окраски, характерной для поражения фитофторозом.

Следует еще раз акцентировать внимание на том обстоятельстве, что существенную роль в обеспечении эффективности интродуцированного штамма, по-видимому, сыграло выдерживание клубней в течение 14 сут при 18 °С. Оно повысило приживаемость и стабильность развития биоконтрольных бактерий, их адаптацию к соответствующей экологической нише. Это важно для успешного вступления в конкурентные взаимоотношения с уже сложившейся аборигенной микрофлорой, для синтеза и накопления антифунгальных метаболитов. Описана корреляция механизмов адаптации и синтеза биоактивных соединений, хемотаксических характеристик клеток популяции с длительностью инкубации (41). Растение-хозяин, со своей стороны, тоже влияет на результат биоконтроля: количественный состав интродуцированных бактерий зависит от физиологического состояния, сорта и вида биологического объекта, а секреция клетками клубней питательных веществ стимулирует хемотаксис микроорганизмов. Всевозможные углубления, микротрещины и ниши обеспечивают физическое обособление бактерий и служат местом скопления и секреции метаболитов, жидкостей и т.д., создавая благоприятные условия для поддержания физиологической активности биоконтрольного штамма.

Визуализация интродуцированных бактерий штамма *Pseudomonas* sp. RF13H in vivo на поверхности клубней в период хранения свидетельствует о высокой адаптивности этих бактерий в условиях пониженных температур, что имеет большое значение при конкуренции за источники питания и сайты локализации в условиях эпифитного микробиома.

Таким образом, интродуцируемые биоконтрольные бактерии, сдерживая развитие патогенного фона и уменьшая потери при хранении, обладают большим потенциалом для обеспечения экологически чистых продуктов питания. Обнаруженная нами способность штамма *Pseudomonas* sp. RF13H колонизировать растения и одновременно защищать их от фитопатогенов делает его перспективным для агротехнологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Phatak H.C. The role of seed and pollen in the spread of plant pathogens particularly viruses. Tropical Pest Management, 2009, 26(3): 278-285 (doi: 10.1080/09670878009414413).
2. Darrasse A., Arnaud Darsonval A., Boureau T., Brisset M.-N., Durand K., Jacques M.-A. Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. Appl. Environ. Microbiol., 2010, 76(20): 6787-6796 (doi: 10.1128/AEM.01098-10).
3. Russian Federation. Режим доступа: http://www.fao.org/faostat/en/#country/185. Без даты.
4. Bale J.S., van Lenteren J.S., Bigler F. Biological control and sustainable food production. Phil. Trans. R. Soc. B, 2008, 363(1492): 761-776 (doi: 10.1098/rstb.2007.2182).
5. Vuro M. Enhancing biocontrol agents and handling risks /M. Vurro, J. Gressel, T. Butt, G.E. Harman, A. Pilgeram, R.J. Leger, D.L. Nuss (eds.). IOS Press, Amsterdam, 2001.
6. Rosenblueth M., Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Mol. Plant-Microbe Interact., 2006, 19: 827-837 (doi: 10.1094/MPMI-19-0827).
7. Holliday P. A dictionary of plant pathology. Cambridge University Press, Cambridge, 1989 (doi: 10.1017/S0014479700001393).
8. Schulz B., Boyle C. What are endophytes? In: Microbial root endophytes /B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, T.N. Sieber (eds.). Springer-Verlag, Berlin, 2006: 1-13.
9. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов. Прикладная биохимия и микробиология, 2011, 47: 373-385 (doi: 10.1134/S0003683811040090).
10. Manter D.K., Delgado J.A., Holm D.G., Stong R.A. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. Microb. Ecol., 2010, 60: 157-166 (doi: 10.1007/s00248-010-9658-x).
11. İnceoğlu O., Falcao Salles J., van Elsas J.D. Soil and cultivar type shape the bacterial community in the potato rhizosphere. Microb. Ecol., 2012, 63: 460-470 (doi: 10.1007/s00248-011-9930-8).
12. Weinert N., Piceno Y., Ding G.C., Meincke R., Heuer H., Berg G., Schloter M., Andersen G., Smalla K. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. FEMS Microbiol. Ecol., 2011, 75: 497-506 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01025.x).
13. Andreote F.D., Rocha U.N., Araъjo W.L., Azevedo J.L., van Overbeek L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 97: 389-399 (doi: 10.1007/s10482-010-9421-9).
14. Reiter B., Pfeifer U., Schwab H., Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68: 2261-2268 (doi: 10.1128/AEM.68.5.2261-2268.2002).
15. Garbeva P., Overbeek L.S.S., Vuurde J.W., Elsas J.D.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. Microb. Ecol., 2001, 41: 369-383 (doi: 10.1007/s002480000096).
16. Perombelon M.C.M., Gullings-Handley J., Kelman A. Population dynamics of *Erwinia carotovora* and pectolytic *Clostridium* spp. in relation to decay of potatoes. Phytopathology, 1979, 69: 167-173 (doi: 10.1038/srep11606).
17. Koiv V., Roosaare M., Vedler E., Kivistik P.A., Toppi K., Schryer D.W., Remm M., Tenson T., Mae A. Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. Scientific Reports, 2015, Article number 11606: 1-18 (doi: 10.1038/srep11606).
18. Andreote F.D., de Araújo W.L., de Azevedo J.L., van Elsas J.D., da Rocha U.N., van Overbeek L.S. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol., 2009, 75: 3396-3406 (doi: 10.1128/AEM.00491-09).
19. Verma V.C., Gange A.C. Advances in endophytic research. Springer Science & Business Media, Berlin, 2013 (ISBN 978-81-322-1575-2).
20. Щербаков А.В. Эндофитные сообщества сфагновых мхов как источник бактерий — эффективных ассоциантов сельскохозяйственных культур. Автореф. канд. дис. СПб, 2014.
21. Коростик Е.В., Пинаев А.Г., Ахтемова Г.А., Андронов Е.Е. Универсаль-

ные 16S-рРНК праймеры для описания генетического разнообразия почвенных прокариот. Экологическая генетика, 2006, 4(4): 32-37.
22. Magnusson J., Schnurer, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. App. Envir. Microbiol., 2001, 67(1): 1-5 (doi: 10.1128/AEM.67.1.1-5.2001).
23. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачев А.А., Манучарова Н.А. Практикум по биологии почв. М., 2002.
24. Теппер Е.З., Шильникова В.К. Практикум по микробиологии. М., 2004.
25. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Процессы, препятствующие повышению перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии. Физиология растений, 2011, 58: 875-882.
26. Kumar G.N., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers. Plant Physiol., 1993, 102: 115-124 (doi: 10.1104/pp.102.1.115).
27. Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Демин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Изменения активности изоформ СОД при низкотемпературной адаптации у растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) дикого типа и трансформированных геном 12-ацил-липидной десатуразы. Физиология растений, 2014, 61: 359-366.
28. Integrated DNA Technologies. Режим доступа: https://eu.idtdna.com/calc/analyzer. Без даты.
29. Cardinale M., Vieira de Castro J., Muller H., Berg G., Grube M. In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscular* reveals predominance of *Alphaproteobacteria*. FEMS Microbiol. Ecol., 2008, 66: 63-71 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00546.x).
30. Щербаков А.В., Брагина А.В., Кузьмина Е.Ю., Берг К., Мунтян А.Н., Макарова Н.М., Мальфанова Н.В., Кардинале М., Берг Г., Чеботарь В.К., Тихонович И.А. Эндофитные бактерии сфагновых мхов как перспективные объекты сельскохозяйственной микробиологии. Микробиология, 2013, 82(3): 312-322.
31. Peix A., Ramírez-Bahena M.H., Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infection, Genetics and Evolution, 2009, 9(6): 1132-1147 (doi: 10.1016/j.meegid.2009.08.001).
32. Cornelis P. Pseudomonas: genomics and molecular biology. Horizon Scientific Press, Pool, 2008 (ISBN 978-1-904455-19-6).
33. Toth E.M., Borsodi A.K, Felfoldi T., Vajna B., Sipos R., Marialigeti K. Practical microbiology. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, 2013.
34. Wegener C.B., Jansen G. Antioxidant capacity in cultivated and wild *Solanum* species: The effect of wound stress. Food Funct., 2010, 1: 209-218 (doi: 10.1039/C0FO00063A).
35. Grace S.C. Phenolics as antioxidants. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants /N. Smirnoff (ed.). Blackwall Publishing Ltd, Oxford, 2005.
36. Wegener C.B., Jansen G. Antioxidants in different potato genotypes: effect of drought and wounding etress. Agriculture, 2013, 3: 131-146 (doi: 10.3390/agriculture3010131).
37. Верхотуров В.В., Топорищева В.К. Состояние антиоксидантной системы ячменя при замачивании и солодоращении. Хранение и переработка сельхозсырья, 2003, 9: 26-30.
38. Кипрушкина Е.И. Воздействие низкой температуры на динамику численности и проявление биоконтролирующего эффекта бактериями родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Вестник Международной академии холода, 2007, 3: 34-38.
39. Колодязная В.С., Кипрушкина Е.И. Холодильная технология пищевых продуктов (биохимические и физико-химические основы). СПб, 2008.
40. Паутов А.А. Морфология и анатомия вегетативных органов растений. СПб, 2012.
41. Олескин А.В., Ботвинко И.В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов. Микробиология, 2000, 69: 309-327.

[1]ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: microbe-club@inbox.ru, alonagonchar@mail.ru, mulina_sa@mail.ru, vladchebotar@rambler.ru;
[2]Санкт-Петербургский государственный технологический университет,
190013 Россия, г. Санкт-Петербург, Московский просп., 26;
[3]Sup'Biotech private engineering school,
66 rue Guy Môquet, Villejuif , Paris, 94800 France;
[4]Университет ИТМО (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики),
191002 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9;
[5]Національний університет біоресурсів і природокористування України,
03041 Україна, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

Поступила в редакцию 11 декабря 2016 года

PSYCHROPHILIC ENDOPHYTIC *Pseudomonas* AS POTENTIAL AGENTS IN BIOCONTROL OF PHYTOPATHOGENIC AND PUTREFACTIVE MICROORGANISMS DURING POTATO STORAGE

A.V. Shcherbakov[1], E.N. Shcherbakova[1], S.A. Mulina[1, 2], P.Yu. Rots[1, 2], R.F. Daryu[3], E.I. Kiprushkina[4], L.N. Gonchar[5], V.K. Chebotar'[1]

[1]*All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology,* Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail microbe-club@inbox.ru, alonagonchar@mail.ru, mulina_sa@mail.ru, vladchebotar@rambler.ru;
[2]*Saint Petersburg State Technical University*, 26, Moskovskii prosp., St. Petersburg, 190013 Russia;
[3]*Sup'Biotech private engineering school,* 66 rue Guy Môquet, Villejuif, Paris, 94800 France;
[4]*ITMO University (Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics),* 9, ul. Lomonosova, St. Petersburg, 191002 Russia;
[5]*National University of Nature and Bioresources of Ukraine,* 15, vul. Geroiv Oborony, m. Kiev, 03041 Ukraine
ORCID:
Shcherbakov A.V. orcid.org/0000-0001-6638-8595
Shcherbakova E.N. orcid.org/0000-0002-7871-034X
Mulina S.A. orcid.org/0000-0001-6554-4111
Rots P.Yu. orcid.org/0000-0003-0638-7587
Daryu R.F. orcid.org/0000-0003-2516-9200
Kiprushkina E.I. orcid.org/0000-0001-5350-4550
Gonchar L.N. orcid.org/0000-0002-3628-6659
Chebotar' V.K. orcid.org/0000-0001-9762-989X
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Experiments were performed using equipment of the Center of Genome Technologies and Cell Biology (ARRIAM)
Supported by Russian Science Foundation (grant № 14-16-00146)
Received December 11, 2016 doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.116eng

Abstract

Abundant pathogens which attack seed and food potato tubers are a serious problem of the modern potato growing that causes significant losses during storage. Regular use of chemical fungicides and agrochemicals has led to emergence of resistance and an increased aggressiveness of plant pathogenic microorganisms. New fungal and bacterial strains and races are also appearing which spread rapidly and cause great damage to agricultural production. In this regard, the biologicals based on biocontrol microorganisms, instead of chemicals, are considered particularly relevant to protect seed and food potatoes from infectious diseases. A genus *Pseudomonas* belonging to the group of plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) includes species most effectively colonizing higher plants and used as active agents of biological products. Scientific novelty of our work lies in the fact that this study is the first to report the effect of psychrophilic strain *Pseudomonas* spp. RF13H on the storage of potato tubers. The cold resistant commercial varieties recommended for cultivation in the Leningrad region has been involved. For the first time we estimated the efficiency of tubers protection from a number of pathogenic microorganisms under refrigerated storage, assessed the population dynamics of introduced strain, and visualized the pattern of bacteria distribution and localization on the surface, using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. Using molecular genetic analysis, we have clarified the taxonomic position of several *Pseudomonas* strains, including psychrophilic strain *Pseudomonas* spp. RF13H. This strain possessed fungicidal and bactericidal activity against saprogenic and pathogenic microorganisms and was agronomically and physiologically tested. Its growth at low temperatures and production of auxin-like phytohormones were studied. *Pseudomonas* spp. RF13H influenced positively preservation and biochemical processes in potato tubers under refrigerated storage. Its microcolonies were often localized in different cracks, grooves and recesses on the stored tuber surface that indicated beneficial plant-microbial relations and explained a strategy for tuber colonization at room and low temperature during storage. The occurrence of surface phytopathogenic microorganisms decreased in the presence of *Pseudomonas* spp. RF13H, and the average number of all type-infected tubers was about 50 % lower among those treated with *Pseudomonas* spp. RF13H comparing to untreated ones. This trend continued for 3 month storage, i.e. the amount of infected untreated tubers reached 30 % and reduced up to 10-13 %, when treatment with biocontrol strain. At a temperature of 4 °C, the bacterial counts was quite stable for 5 months, and then significantly decreased (up to trace quantities) to the end of storage. The bacteria concentrated at the boundaries between the individual cells of tuber periderm and in the places of exudation of biochemical substances that serves as nutrients for bacteria. Introduction of *Pseudomonas* spp. RF13H was shown to contribute to redox processes (activation of antioxidant protection system enzymes — catalase, peroxidase, superoxide dismutase) thus increasing plant resistance to pathogens. Additionally, this strain has a positive effect on the microbiome composition in potato epidermis. Induction of own immunity and creation of a barrier preventing pathogen penetration helped to reduce infection in the potatoes tuber.

Keywords: *Pseudomonas*, potato, biocontrol of plant pathogens, fluorescence in situ hybridization.