

ПЛАТОНОВ ВЛАДИСЛАВ АНДРЕЕВИЧ

**БАКТЕРИИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ГРИБАМИ,
ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ**

4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в агробиотехнологическом департаменте аграрно-технологического института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

- Научный руководитель:** **Чудинова Елена Михайловна**
кандидат биологических наук, доцент
агробиотехнологического департаamenta аграрно-технологического института РУДН
- Официальные оппоненты:** **Джалилов Февзи Сеид-Умерович**
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой защиты растений института агробиотехнологии ФГБОУ ВО «РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева»
- Степанов Алексей Львович**
доктор биологических наук, заведующий кафедрой Биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха»

Защита диссертации состоится «27» мая 2026г. в часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 8 корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) по адресу: 117198 ул. Миклухо-Маклая, д. 6, и на сайте: <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2026 г

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 2021.002,
кандидат сельскохозяйственных наук

Е.В. Романова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Картофель – значимая культура для продовольственного обеспечения населения. Из-за высокого содержания питательных веществ и воды растения картофеля подвержены многочисленным грибным и бактериальным заболеваниям. Многие десятилетия считалось, что заболевания растений вызываются каким-то конкретным видом или даже штаммом микроорганизма. В рекомендациях по защите растений предполагается борьба с отдельными возбудителями. Однако с развитием технологий диагностики в последнее время было обнаружено, что во многих случаях поражения вызваны комплексами микроорганизмов (Lamichhane, Venturi, 2015; Bastias et al., 2020). Ассоциированные бактерии могут оказывать влияние на развитие заболевания и агрессивность фитопатогенных грибов. В работе Dung et al. (2014) показано, что тяжесть заболевания растений картофеля увеличивалась при совместном заражении бактерией *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* и грибом *Verticillium dahliae*. Биологические свойства микроорганизмов как компонентов сообществ могут сильно отличаться от свойств тех же микроорганизмов в монокультуре. Физиологическое значение присутствия бактерий, находящихся в тесной ассоциации с грибами, неясно, и может отличаться в различных случаях. Бактерии могут влиять на патогенез, увеличивая тяжесть заболевания (Dung et al., 2014) или наоборот, способствовать снижению агрессивности грибных штаммов (Venkatesh et al., 2021). Бактерии могут стимулировать образование хламидоспор у грибов и переносить в этих образованиях неблагоприятные условия внешней среды (Spraker et al., 2016). Значение бактериального компонента в грибах и его роль в этиологии и патогенезе болезней растений к настоящему времени изучены недостаточно. Необходим качественно новый подход к защите растений, ориентированный на борьбу с комплексами возбудителей и ассоциированными с ними микроорганизмами. Этот подход сейчас активно разрабатывается в медицине. Пришло время применить его и для защиты растений. Это может существенно повысить эффективность проводимых защитных мероприятий.

Степень разработанности темы. Изучение бактерий, ассоциированных с грибами, как и изучение сообществ микроорганизмов в целом – один из трендов современной микробиологии. Проведено большое международное исследование, в котором приняли участие 26 исследователей из США, Швейцарии и Бразилии. Проверка чистых культур грибов, депонированных в ведущих мировых коллекциях, показала, что ассоциированные бактерии присутствуют у большинства из более 700 протестированных штаммов грибов (Robinson et al., 2021). Исследования влияния бактериального компонента фитопатогенного сообщества на этиологию и патогенез болезней растений и

на жизнедеятельность гриба проводятся в разных лабораториях мира (Venkatesh et al., 2021; Spraker et al., 2016; Napo et al., 2025; Piontkivska et al., 2025). Исследований, касающихся изучения комплексов микроорганизмов, вызывающих заболевания картофеля, крайне мало. Можно упомянуть работу американских исследователей из Университета Вашингтона (Dung et al., 2014), в которой показано положительное влияние симбиотической бактерии на поражаемость картофеля вертициллезом. В работе другой группы исследователей из США (Spraker et al., 2016) изучено взаимодействие опасного патогена картофеля бактерии *Ralstonia solanacearum* с разными группами фитопатогенных и сапротрофных грибов. Из российских работ обращают на себя внимание работы исследователей из Казанского федерального университета (Mardanova et al., 2019), посвященные анализу микробиома корней картофеля.

Цель исследований - изучение биологических, экологических особенностей и разнообразия бактерий, ассоциированных с грибами, выделенными из растений картофеля.

Задачи исследований:

1. Определить наличие и таксономическую принадлежность бактериального компонента культур грибов молекулярными методами без выделения чистых культур.

2. Выделить аксеничные культуры бактерий из культур фитопатогенных грибов, определить их видовую принадлежность.

3. Охарактеризовать выделенные бактерии по способности к пектолитическому разложению тканей клубней картофеля.

4. Сравнить пектолитические флюоресцентные *Pseudomonas*, выделенные из мицелия грибов, со свободноживущими пектолитическими фитопатогенными флюоресцентными *Pseudomonas*, выделенными из пораженных клубней.

5. Оценить способность бактерий, выделенных из мицелия гриба, подавлять рост некоторых патогенных грибов.

6. Оценить частоту развития бактериозов при хранении клубней картофеля, обработанных химическими и биологическими фунгицидами перед закладкой на хранение.

Объект исследования. Культивируемые бактерии и грибы, выделяемые из пораженных грибными болезнями растений картофеля.

Научная новизна. Впервые проанализирован бактериальный компонент грибов, выделенных из растений картофеля и получены новые данные о видовом разнообразии бактерий, ассоциированных с культурами грибов: *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Delftia* sp., *Enterobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Kosakonia* spp., *Lacrimispora* sp., *Lelliottia*

sp. *Luteolibacter* sp., *Paenibacillus* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* spp., *Rahnella* sp., *Stenotrophomonas* sp.

Впервые обнаружены фитопатогенные бактерии вида *Pseudomonas fluorescens*, поражающие клубни картофеля и выявлена тесная ассоциация *Pseudomonas palleroniana* с фитопатогенными грибами, которая может увеличивать патогенность грибов. Непатогенные штаммы бактерий, выделенные из грибов, могут использоваться для создания биопестицидов или росторегулирующих препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы

В исследовании получены новые данные о видовом разнообразии бактерий, ассоциированных с культурами грибов, выделенными из растений картофеля. Собрана коллекция бактерий, выделенных из мицелия грибов. Из мицелия грибов, относящихся к видам *Fusarium torulosum* и *Trichocladium solani* были выделены бактерии, способные разрушить ткань клубней картофеля в течение 24 часов. На основании анализа последовательности гена рибосомной РНК 16S, участка гена гиразы субъединицы В (*gyrB*) и участка гена Сигма фактора ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoD*) эти бактерии были отнесены к *Pseudomonas palleroniana*. Показано, что ассоциация *Pseudomonas palleroniana* с грибами может увеличивать патогенность грибов.

Выделенные из мицелия грибов *Pseudomonas palleroniana* существенно отличались по исследованным последовательностям ДНК от свободноживущих фитопатогенных пектолитических бактерий, относящихся к группе видов *Pseudomonas fluorescens*, найденных на клубнях картофеля той же партии. *P. palleroniana* и *P. fluorescens* впервые отмечены как патогены клубней картофеля.

Показано, что обработка картофеля фунгицидами перед закладкой на хранение может усугубить развитие бактериальных инфекций при высоком исходном уровне бактериальной заражённости. Полученные данные могут стать основой для разработки мероприятий для защиты картофеля от грибо-бактериальных гнилей, что позволит сократить экономические потери и повысить устойчивость сельского хозяйства.

Методология и методы исследования основывалась на обобщении научных работ отечественных и зарубежных авторов, выполнении фитопатологических, микологических и микробиологических методов исследований (полевые сборы, инкубация растительного материала во влажных камерах, тестирование патогенности, оценка лёжкости клубней при хранении), а также молекулярных методов диагностики и идентификации видовой принадлежности (ПЦР, секвенирование и анализ последовательностей ДНК).

Положения, выносимые на защиту

1. Присутствие прокариотического компонента у изучаемых штаммов грибов и корреляция между видом гриба и видом бактерии.
2. Пектолитическая активность бактерии *Pseudomonas palleroniana* по отношению к ломтикам картофеля.
3. Влияние ассоциации патогенных грибов с патогенными бактериями на тяжесть болезни растения.
4. Характеристика пектолитических бактерий вида *Pseudomonas palleroniana* и вида *Pseudomonas fluorescens*, найденных на клубнях картофеля той же партии.
5. Активность штамма *Serratia plymuthica*, выделенный из мицелия гриба, относительно некоторых фитопатогенных грибов.
6. Эффективность обработки картофеля фунгицидами перед закладкой на хранение на развитие бактериальных инфекций.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов основана на использовании общепризнанных микологических, микробиологических и молекулярных методов. Результаты работы были представлены на заседании Агробиотехнологического департамента АТИ РУДН, на XIV Молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (г. Москва, 2024), 4-ом Микологическом форуме (г. Москва, 2024), XV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Инновационные процессы в сельском хозяйстве» (г. Москва, 2023), XXX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (г. Москва, 2023), на Международной научно-практической конференции «Биологизация землепользования: почва, технологии, продукция достижения и перспективы развития» (Москва, 2023.), на XVIII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – сельскому хозяйству» (2023 г.).

Публикация результатов исследования. Основные результаты, выводы и рекомендации диссертационного исследования отражены в 17 работах, в том числе в 4 статьях в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science и в 2 статьях в журналах из перечня ВАК.

Структура и объем диссертации. Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы. Общий объем диссертации составляет 111 страниц. Основной текст работы включает 25 рисунков и 7 таблиц. Список литературы содержит 128 источников, из которых 122 на иностранных языках.

Личный вклад автора. Результаты данной работы получены при выполнении работ диссертантом лично и в рамках совместной деятельности. Автор принимал непосредственное участие в исследовании чистых культур

грибов, выделении бактерий, тестировании патогенности штаммов, анализе и интерпретации данных секвенирования, планировании и постановке экспериментов, систематизации и представления результатов, написании текстов статей и материалов конференций.

Благодарности. Благодарен научному руководителю Елене Михайловне Чудиновой за чуткое руководство и консультации в процессе работы, профессору Сергею Николаевичу Еланскому, а также сотрудникам лаборатории Денису Скокову, Арчилу Цинделиани, Александру Еланскому за помощь в работе с коллекцией и в идентификации штаммов грибов.

Содержание диссертации

1. Обзор литературы

В обзоре литературы обсуждается значимость картофеля для продовольственной безопасности. Описываются заболевания, возбудителями которых являются грибы и бактерии, причём подробно рассмотрены как широко распространенные грибные и бактериальные патогены, так и редко встречающиеся виды. Проанализированы грибо-бактериальные ассоциации, связанные с растениями, обсуждена их роль в развитии патогенеза.

2. Материалы и методы

В работе анализировали грибы из коллекции агробиотехнологического департамента АТИ РУДН (табл. 1) и выделенные автором самостоятельно. Всего проанализировано 100 штаммов грибов из 37 видов 23 родов. Образцы растительных тканей, из которых проводили выделение, были отобраны в России (Архангельская, Астраханская, Московская, Костромская, Магаданская, Саратовская области, Камчатский, Приморский, Краснодарский края, республика Татарстан) и в зарубежных странах (Гамбия, Уганда, Таджикистан, Узбекистан).

Таблица 1. Характеристика грибов, используемых в данной работе

Вид гриба	Число проанализированных штаммов	Растение-хозяин, орган	Места сбора образцов
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	3	КК	Московская обл., 2018, 2021
<i>Alternaria alternata</i>	4	КК	Гамбия, 2019; Уганда, 2020; Московская обл., 2021
<i>Alternaria solani</i>	1	КК	Уганда, 2020
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	КК	Таджикистан, 2023
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	КК	Костромская обл., 2021

Вид гриба	Число проанализированных штаммов	Растение-хозяин, орган	Места сбора образцов
<i>Bjerkandera adusta</i>	1	ТП	Московская обл., 2018
<i>Boeremia exigua</i>	1	КК	Магаданская обл., 2017
<i>B. eupyrena</i>	3	КК	Магаданская обл., 2017
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	ТП	Уганда, 2020
<i>Clonostachys solani</i>	2	КК	Московская обл., 2021
<i>Colletotrichum coccodes</i>	5	КК, КС	Приморский край, 2018; Татарстан, 2018; Уганда, 2020
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	ТП	Уганда, 2020
<i>Fusarium acuminatum</i>	1	КМ	Костромская обл., 2023
<i>Fusarium avenaceum</i>	4	КК	Камчатский край, 2022
<i>F. equiseti</i>	13	ТП, ТЛ, КК	Краснодарский край, 2018; Астраханская обл., 2019; Уганда, 2020
<i>F. graminearum</i>	2	КК	Уганда, 2020
<i>F. merismoides</i>	1	КК	Камчатский край, 2022
<i>F. merkxianum</i>	1	КС	Астраханская обл., 2019
<i>F. oxysporum</i>	16	КК, ТП, КС, ТопК	Московская обл., 2020; Уганда, 2020; Костромская обл., 2021; Архангельская обл., 2021; Узбекистан, 2022
<i>F. sporotrichioides</i>	1	КК	Московская обл., 2017
<i>F. sporotrichioides</i>	1	ССК	Краснодарский край, 2017
<i>F. sporotrichioides</i>	2	ПП, КК	Костромская обл., 2021; Московская обл., 2017
<i>F. sambucinum</i>	1	КК	Московская обл., 2017
<i>F. solani</i>	6	КК	Астраханская обл., 2019; Московская обл., 2020, 2021; Уганда, 2020
<i>F. torulosum</i>	2	КК	Камчатский край, 2022, 2023
<i>Geotrichum candidum</i>	2	КК	Московская обл., 2021 Камчатский край, 2023
<i>Helminthosporium solani</i>	6	КК	Магаданская обл., 2017; Приморский край, 2018; Камчатский край, 2022; Уганда, 2020
<i>Ilyonectria crassa</i>	2	КС, ТопС	Московская обл., 2017; Костромская обл., 2022
<i>Irpex lacteus</i>	1	ТП	Краснодарский край, 2018
<i>Microdochium sp.</i>	1	КК	Уганда, 2020
<i>Orbilia oligospora</i>	1	КК	Камчатский край, 2022
<i>Plectoshaerella cucumerina</i>	1	КК	Московская обл., 2021
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	1	КК	Калужская обл., 2018
<i>Remotididymella destructiva</i>	1	КК	Уганда, 2020
<i>Rhizoctonia solani</i>	1	КК	Московская обл., 2019

Вид гриба	Число проанализированных штаммов	Растение-хозяин, орган	Места сбора образцов
<i>Trichocladium solani</i>	7	КК	Камчатский край, 2023
<i>Volutella</i> sp.	1	КК	Камчатский край, 2022

Прим.: КК – клубень картофеля, КС – стебель картофеля, ТП – плод томата, ТЛ – лист томата, ТопК – клубень топинамбура, ССК – корнеплод сахарной свёклы, ПП – плод перца болгарского.

Большинство грибов было выделено из клубней картофеля с признаками грибного, бактериального или смешанного грибо-бактериального поражения. После поверхностной стерилизации из пораженных органов растений выделяли чистые культуры прямым посевом пораженной ткани на питательную среду картофельно-глюкозный агар (КГА). Через три-пять суток инкубации при комнатной температуре колонию гриба пересаживали на другую чашку с той же средой для достижения морфологической однородности колонии.

Бактерии выделяли на среды КГА и LB. На границе больной и здоровой ткани клубня касались микробиологической петлей ткани картофеля. Петлю помещали в микропробирку с 1 мл стерильной воды, далее 10 мкл полученного раствора ресуспендировали по питательной среде. При выделении бактерий из мицелия гриба выращивали на гороховой среде в течение 5 дней. Затем мицелий помещали в стерильную ступку и растирали стерильным пестиком. 10 мкл разбавленного в 1000 раз гомогената растирали шпателем по питательной среде СРГ с добавлением фунгицида тиабендазол. Через 36 часов выделяли индивидуальные колонии на другую чашку Петри с той же средой с тиабендазолом. Бактерии из каждой колонии размножали в жидкой среде LB в течение 24 часов и замораживали на -75°C с добавлением 15% глицерина.

Наличие бактериальных симбионтов в культурах грибов определяли с помощью метода ПЦР. Матрицей служила ДНК, выделенная из мицелия грибов, реакцию ставили по бактериальным праймерам 27fa и 519r (таблица 2). Наличие ампликона определяли электрофоретическим методом. В случае обнаружения ампликона нужного размера его вырезали из геля, очищали с помощью набора CleanUpStandart и секвенировали в компании Евроген.

Видовая принадлежность грибов определялась по морфологическим признакам и по видоспецифичным последовательностям, содержащим внутренний транскрибируемый участок 1 (ITS1) ген, кодирующий 5,8S рибосомной РНК и внутренний транскрибируемый участок 2 (ITS2) (праймеры ITS4, ITS5).

Таксономическая принадлежность бактерий устанавливалась на основании секвенирования участка гена, кодирующего 16S рибосомную РНК (праймеры 27fa, 519r, 1492r), участок гена гиразы субъединицы В (gyrB) (праймеры gyrB-F, gyrB-R) и участок гена Сигма фактора ДНК-зависимой РНК-полимеразы (rpoD) (праймеры PsEG30F, PsEG790R, табл. 2.).

Для выделения ДНК мицелий лизировали и гомогенизировали с корундом в буфере СТАВ, после чего очищали хлороформом, осаждали смесью изопропанола с цитратом калия и промывали 70% спиртом. Осадок высушивали и ресуспендировали в 50 мкл стерильной деионизированной воды. ДНК из бактерий выделяли с помощью коммерческого набора для выделения геномной ДНК из бактерий EasyPure согласно протоколу. Хранили ДНК в стерильной деионизированной воде при -20°C . Для ПЦР брали 2 мкл суспензии ДНК в воде в качестве матрицы.

ПЦР проводили по праймерам, указанным в таблице 2, согласно рекомендациям авторов праймеров.

Таблица 2. Праймеры, используемые в работе

Название праймера	Последовательность праймера	Температура отжига, $^{\circ}\text{C}$	Источник
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55	White et al., 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	55	White et al., 1990
27fa	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	51-52	Lane, 1991
519r	GTATTACCGCGGCTGCTGG	51-52	Lane, 1991
1492r	CGGTTACCTTGTACGACTT	52	Lane, 1991
gyrB-F	AGCATTYAARTGCTGAARGG	52	Agaras and Valverde, 2018
gyrB-R	GGTCATGATGATGATGTTGTG	52	Agaras and Valverde, 2018
PsEG30F	ATYGAAATCGCCAARCG	50	Mulet et al., 2009
PsEG790R	CGGTTGATKTCCTTGA	50	Mulet et al., 2009

Патогенность бактерий оценивали по способности бактерий мацерировать ломтики картофеля. На дно чашки Петри помещали влажную фильтровальную бумагу, поверх нее – предметное стекло, на которое помещали ломтик картофеля. Бактерии выращивали в течение 48 часов при комнатной температуре на среде Кинга Б (King et al. 1954) или на среде LB. При помощи микробиологической петли готовили водную суспензию бактерий так, чтобы оптическая плотность достигала $\text{OD}=0,9$, при длине волны 600нм, измерение проводили спектрофотометром “Genesis 10s Vis”. Патогенность бактерий оценивали через 24 часа. Для совместного заражения бактериями и грибами в центр ломтика картофеля, наносили одновременно 10 мкл водной суспензии бактерий с оптической плотностью $\text{OD}=0,2$ и $0,6$ и блок агара с мицелием гриба. Результаты фиксировали через 5-7 дней. Рост грибов на ломтике

картофеля в присутствии бактерий сравнивали с ростом гриба на ломтике клубня картофеля без бактерий.

Тест на образование левана и тест на гиперчувствительность табака проводили как описано в статье Лелиотта с соавторами (Lelliott et al., 1966). Тест на образование левана проводили на среде СМЗ с добавлением 5% сахарозы.

Тест на растениях табака проводили в теплице ВНИИФ, в третий и четвертый лист растения табака с помощью шприца закалывали суспензию бактерий в концентрации 10^8 КОЕ/мл, приготовленную из 48-часовой культуры, выращенной на питательном агаре Кинга Б.

Тест на присутствие оксидазы, уреазы, орнитин декарбоксилазы, лизин декарбоксилазы, аргинин дегидролазы, образование индола и ферментацию сахарозы, глюкозы, мальтозы, маннозы, инозитола, маннита, аргининдигидролазы проводили с помощью набора реагентов №1 «Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов» (АО «НПО» «Микроген»).

Оценку антагонистических свойств проводили с помощью метода двойной культуры (Ali et al., 2020). В чашку Петри с картофельно-глюкозным агаром (КГА) помещали агаровый блок (5×5 мм) с мицелием гриба. На расстоянии 20 мм от агарового блока штрихом наносили бактерии (рис. 1). Для контроля штаммы грибов высаживали в центр свободной чашки Петри, которую инкубировали при тех же условиях (в темноте, $+25$ °С, 7 суток), что и чашки с попарным сращиванием. Антагонистическую активность оценивали по ширине зоны ингибирования роста мицелия между колонией гриба и бактерией.

Список сред, использованных в работе.

СМЗ с 5% сахарозы: сахароза 50 г, триптон 1г, дрожжевой экстракт 2г, пептон 5г, NaCl 5 г, агар-агар 15г., вода до 1 л.

Среда Кинга Б: пептон 20 г, K_2HPO_4 1.5г, $MgSO_4$ 1.5; глицерин 10 мл., агар-агар 15 г, вода до 1 л.

Картофельно-глюкозный агар (КГА): картофель 200 г; глюкоза 20 г; агар-агар 15 г; дистиллированная вода до 1 л.

Lysogeny broth (LB): триптон 10 г, дрожжи 5г, NaCl 10г; дистиллированная вода до 1 л. , агар-агар 15 г.

CPG: кислый казеин 1 г , пептон 10 г , глюкоза 5 г, агар 11 г, тиабендазол 100 мг/л, вода до 1 л.

Все среды автоклавировали 30 мин при 1 атм.

Исследования по влиянию химических и биологических препаратов на развитие бактериальных болезней проводили на базе «Коренево» Московской области. Опыт проводили в 2020, 2021 и 2022 годах. 5 кг картофеля

(приблизительно 100 клубней) сорта Сантэ обрабатывали 50 мл препаратов Максим (флудиоксонил 2252 мг/л), Кагатник (бензойная кислота 9000мг/л), Картофин ($3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл *Bacillus subtilis*), или водой. Все разведения фунгицидов сделаны согласно рекомендациям Государственного каталога агрохимикатов и пестицидов (2020). После чего картофель запаковывали в сетки и взвешивали с точностью до 5 грамм и помещали в насыпь хранилища. Каждый вариант проводили в 4-х кратной повторности. Хранилище закрывного типа вместимостью 500 т картофеля с высотой насыпи 2,5 м, вентиляция активная, в хранилище поддерживался следующий температура в сентябрьный режим: в октябре (лечебный период) температура составляла 13-14°C, в ноябре 10°C, с декабря по март от 1,5 до 4°C, в апреле от 4 до 6°C. Относительная влажность воздуха 85-95%.. Сетки картофеля закладывали в сентябре, учет бактериозов осуществляли в апреле. Каждую сетку картофеля взвешивали и сравнивали с исходным весом. Клубни мыли, сушили и делали учет клубней с признаками заболевания мокрой и сухой гнили.

Для опыта использовали картофель сорта Сантэ, выращенного на полях ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха (Красково). Средняя температура воздуха за вегетационный период составила в 2020 г. – 17,1 °С, в 2021 – 19,7 °С, в 2022 – 17,8 °С при норме 16,5 °С. Всего осадков за вегетационный период выпало в 2020 г. – 427,1 мм, в 2021 – 258,0 мм, в 2022 – 260мм (норма 260,5 мм). Сумма эффективных температур (выше 10 °С) составила в 2020 г. – 1980,04°, в 2021 2354,61°, 2022 г. – 2126,18°. Метеорологические условия отличались значительной вариабельностью: были как относительно благоприятные (2020 г.), так и значительно менее удачные (2021, 2022 гг.) с точки зрения оптимальных условий произрастания картофеля. Почва опытного поля дерново-подзолистая супесчаная.

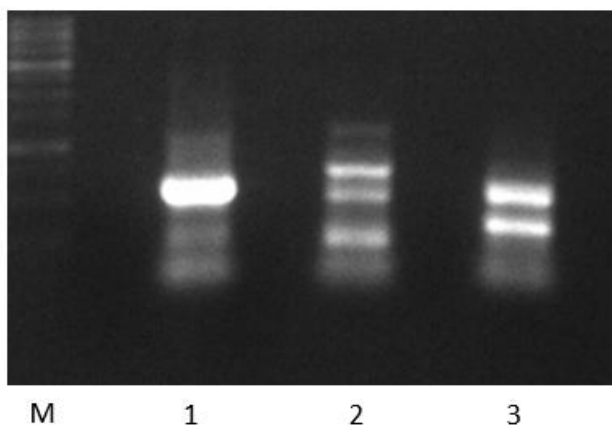
3. Результаты и обсуждение

Идентификация бактериального компонента в культурах грибов молекулярными методами без выделения чистых культур

Обнаружение присутствия бактериального компонента в чистых культурах грибов проводили с помощью получения ПЦР-продукта по бактериальным праймерам и его последующего секвенирования. Присутствие прокариотического компонента выявлено у 36% изучаемых штаммов грибов. При постановке ПЦР по бактериальным праймерам мы столкнулись со следующей проблемой: только у половины исследованных таким образом грибов удалось получить четко выраженный ПЦР-продукт, хорошо детектируемый при электрофоретическом разделении (рис. 1). Но даже при получении такого ПЦР-продукта прочитать нуклеотидную последовательность удавалось не всегда из-за неоднородности ПЦР-продукта,

которая возникает в том случае, если в мицелии гриба содержалось сразу несколько видов бактерий. В видах *Acrostalagmus luteoalbus*, *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum coccodes*, *H. solani*, *Geotrichum candidum*, *Irpex lacteus*, *Juxtiphoma eupyrena* в результате ПЦР по бактериальным праймерам образовывалось несколько ампликонов разного размера. При секвенировании некоторых ампликонов подходящего размера оказалось, что ПЦР-продукт образовался в результате неспецифического взаимодействия бактериальных праймеров с грибным геном. В некоторых штаммах грибов ПЦР-продукт по бактериальным праймерам не синтезировался. Расшифровать таксономическую принадлежность бактериального компонента грибов удалось в 30 штаммах грибов. Эти бактерии принадлежали к следующим таксономическим единицам: *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Delftia* sp., *Enterobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Kosakonia* spp., *Lacrimispora* sp., *Lelliottia* sp., *Luteolibacter* sp., *Paenibacillus* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* spp., *Rahnella* sp., *Stenotrophomonas* sp. (табл. 3).

Зависимости между видом бактерии и видом гриба не было выявлено. Бактерия *Pantoea* sp. встречалась как в мицелии *F. oxysporum*, так и в *Plectoshaerella cucumerina*. *Stenotrophomonas* sp. была найдена в трех разных видах фузариума. В штаммах *F. oxysporum* были обнаружены 8 разных таксономических единиц бактерий, в *F. equiseti* – 6 разных видов бактерий (табл. 3). Бактерии, относящиеся к родам *Stenotrophomonas* и *Delftia*, зарегистрированные в разных штаммах грибов, были одинаковыми по изученным последовательностям. Бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas* разделились на три клады и, по-видимому, принадлежали разным видам. По-видимому, между бактериями, грибами и растениями устанавливаются сложные взаимоотношения. Анализ литературных источников показал, что среди обнаруженных в штаммах грибов бактерий имеются как способные стимулировать рост растений, так и потенциально фитопатогенные.



**Рисунок 1. Пример фореза по праймерам к гену 16S рибосомной РНК:
М-маркер, 1, 2, 3 – ПЦР-продукты**

Выделение аксеничных культур бактерий из мицелия грибов и их анализ

Аксеничные культуры бактерий были выделены из мицелиев грибов родов *Acrostalagmus*, *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Ilyonectria*, *Orbilia*, *Trichocladium* (табл. 4). Не удалось выделить бактерии из грибов рода *Alternaria*. Из мицелия штаммов грибов рода *Fusarium*, проявивших агрессивность при искусственном заражении ломтиков картофеля, были выделены бактерии, различающиеся по патогенности. *Achromobacter* spp., *Agrobacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Delftia* sp., *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus* spp., *Serratia* spp., *Stenotrophomonas* sp., *Kosakonia cowanii*, *Pantoea agglomerans* не заразили ломтик картофеля, штамм *L. amnigena* вызывал потемнение в области нанесения суспензии без пектолитического разрушения тканей картофеля. В штаммах *Fusarium sporotrichioides* и *F. torulosum* были обнаружены штаммы, относящиеся к виду *Pseudomonas palleroniana*, обладающие высокой пектолитической активностью на тканях клубней картофеля.

Таблица 3. Список штаммов грибов и найденных в них бактерий (определение с помощью ПЦР и секвенирования ампликона без выделения чистой культуры).

Штамм гриба	Вид гриба	NCBI гриб (ITS)	Вид бактерии	NCBI бактерия (16S)
P1	<i>Ceratobasidium</i> sp.	MW453064	<i>Delftia</i> sp.	OR381573
19GaPT5	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	OR529207	<i>Paenibacillus</i> sp.	OR381570
17KSPT1	<i>Ilyonectria crassa</i>	MH818326	<i>Enterobacter</i> sp.	OR557619
23Kamf1	<i>Fusarium avenaceum</i>	OR591464	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR591467
23Kam18_1	<i>F. avenaceum</i>	OR591465	<i>Rahnella</i> sp.	OR591490
20UgTF1	<i>F. equiseti</i>	OM421611	<i>Pseudomonas</i> sp.	OR470472
20UgTF3	<i>F. equiseti</i>	OM421613	<i>Klebsiella</i> sp.	OR462712
20UgLaTF1	<i>F. equiseti</i>	OM421616	<i>Pseudomonas</i> sp.	OR462688
20UgTF5-1	<i>F. equiseti</i>	OM421614	<i>Pseudomonas</i> sp.	OR462691
20UgLaTF7	<i>F. equiseti</i>	OM421617	<i>Pantoea</i> sp.	OR462708
20UgLaTF9	<i>F. equiseti</i>	OM362480	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR462710
20UgPT198	<i>F. graminearum</i>	OL364746	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR460081
22KamPT3_2	<i>F. merismoides</i>	OR533484	<i>Luteolibacter</i> sp.	OR462725
F20AKPS3	<i>F. merxianum</i>	ON409888*	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR459867
20UgLaTF4	<i>F. oxysporum</i>	OL372284	<i>Kosakonia</i> sp.	OL762470
20UgPT201	<i>F. oxysporum</i>	OM649882*	<i>Achromobacter</i> sp.	OR460082
20UgPT203	<i>F. oxysporum</i>	OL372286	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR460094

Штамм гриба	Вид гриба	NCBI гриб (ITS)	Вид бактерии	NCBI бактерия (16S)
20UgPT205	<i>F. oxysporum</i>	OM649887*	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR460095
20UgPT206	<i>F. oxysporum</i>	OM649873*	<i>Delftia</i> sp.	OR460096
20UgPT217	<i>F. oxysporum</i>	OL372287	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR460097
20UgPT241	<i>F. oxysporum</i>	OL372292	<i>Kosakonia</i> sp.	OR460099
20UgPT242	<i>F. oxysporum</i>	OM649874	<i>Pantoea</i> sp.	OR460188
21KPS4Vo	<i>F. oxysporum</i>	OR528743	<i>Delftia</i> sp.	OR462718
21MPTw1	<i>F. oxysporum</i>	OR528742	<i>Lelliottia</i> sp.	OR462719
21MPTw3b	<i>F. oxysporum</i>	OR528741	<i>Pseudomonas</i> sp.	OR462716
22Kam2-2	<i>F. torulosum</i>	OR555824	<i>Flavobacterium</i> sp.	OR557578
22KamPT3_1	<i>Orbilia oligospora</i>	OR531681	<i>Lacrimispora</i> sp.	OR462720
21MKKK2	<i>Plectoshaerella cucumerina</i>	OR529437	<i>Pantoea</i> sp.	OR462717
18KPTFan2/1	<i>Pyrenochaeta</i> sp	OR528638	<i>Herbaspirillum</i> sp	OR381483
19Chash_bf	<i>Rhizoctonia solani</i>	OR531680	<i>Achromobacter</i> sp.	OR459849

Были проанализированы бактерии, ассоциированные со штаммами фитопатогенного гриба *T. solani*. При искусственном заражении клубней разные штаммы *T. solani* показывали различную степень агрессивности, размер поражения варьировал от 1 мм до 7 мм (рис. 2).

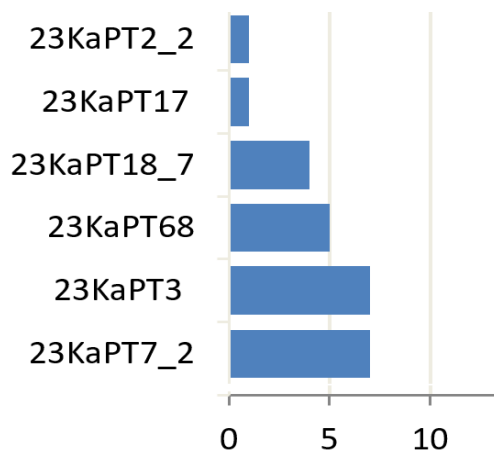


Рис. 2. Патогенность штаммов *T. solani*. Показан диаметр поражения в мм при тестировании штаммов на ломтиках картофеля на 7 сутки инкубации.

Штаммы *T. solani* 23KaPT3 и 23KaPT7_2 при искусственном заражении ломтиков картофеля вызывали одинаковое поражение диаметром 7 мм, но из этих штаммов были выделены разные бактерии. Со штаммом 23KaPT3 были ассоциированы фитопатогенные бактерии *P. palleroniana*, показавшие высокую патогенность на ломтиках клубня картофеля, со штаммом 23KaPT7_2 – непатогенные бактерии *Achromobacter* sp. По-видимому, патогенность

Таблица 4. Анализ чистых культур бактерий, выделенных из мицелия грибов.

Название штамма гриба	Видовое название гриба	Номер в Genbank NCBI (ITS)	Название штамма бактерии	Вид бактерии	Номер в Genbank NCBI (16S)	Способность мацерировать картофель
21MPT11/1	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	OM189521	acrost5.3_zh	<i>Achromobacter sp.</i>	PV190200	–
			Acro5.3br	<i>Serratia marcescens</i>	PV203369	–
18MPT135	<i>A. luteoalbus</i>	OM189523	acrost135_MPK	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	PV203564	–
18MPT92	<i>A. luteoalbus</i>	OM189522	Acro95BZh	<i>Serratia marcescens</i>	PV203383	–
23TaPT78	<i>Aspergillus ochraceus</i>	PV018310	23B78/1	<i>Serratia plymuthica</i>	PQ675617	–
21MKrPT5	<i>Clonostachys sp.</i>	Определено по морфологии	B21MPT5	<i>Pseudomonas koreensis</i>	PV595848	–
23KMin1	<i>Clonostachys sp.</i>	Определено по морфологии	Min1_oblast	<i>Serratia marcescens</i>	PV203439	–
			Min1_kasha	<i>S. marcescens</i>	PV203433	–
20UgLaTF7	<i>Fusarium equiseti</i>	OM421617; TEF: OM362477	B20TF7	<i>Microbacterium oxydans</i>	PV595852	–
20UgPT198	<i>F. graminearum</i>	OL364746	BF20PT198	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	OR460081	–
20UgPT206	<i>F. oxysporum</i>	TEF: OM649873	BF20PT206	<i>Delftia sp.</i>	OR460096	–
21MPTw1	<i>F. oxysporum</i>	OR528742	M12	<i>Lelliottia sp.</i>	OR462719	–
20UgPT242	<i>F. oxysporum</i>	OL372292	BF20PT242	<i>Pantoea sp.</i>	OR460188	–
20UgLaTF4	<i>F. oxysporum</i>	OL372284	BuglaTF4	<i>Kosakonia sp.</i>	OL762470	–
20UgPT217	<i>F. oxysporum</i>	OL372287; TEF: OM649883	BF20PT217	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	OR460097	–
20UgPT197	<i>F. solani</i>		BF197C	<i>Micrococcus sp.</i>	OR460076	–
20UgPT197	<i>F. solani</i>		BF197A	<i>Micrococcus sp.</i>	PV495686	–
21kspep1.2	<i>F. sporotrichioides</i>	PP796763	21kspep1.2 кр	<i>Achromobacter sp.</i>	PV203444	–
18KrSbL17AB	<i>F. sporotrichioides</i>	ON292485; ON292360	18ksbl17_c	<i>Agrobacterium sp.</i>	PV190400	–
			18ksbl17_c2	<i>Agrobacterium sp.</i>	PV495687	–
			18ksbl17_2.2	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	PV202812	+
			18ksbl17_c1	<i>P. palleroniana</i>	PV202812	+
			18ksbl17_cm1	<i>P. palleroniana</i>	PP094238 PP094237	+
			18ksbl17_cm3	<i>P. palleroniana</i>	PV595892	+
			18ksbl17a	<i>Sphingobacterium sp.</i>	PV495694	–

Название штамма гриба	Видовое название гриба	Номер в Genbank NCBI (ITS)	Название штамма бактерии	Вид бактерии	Номер в Genbank NCBI (16S)	Способность мацерировать картофель
			18ksbl17b	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PV495693	–
			18ksbl17e	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PV495695	–
21kspep1.2	<i>F. sporotrichioides</i>	PP796763	21kspep1.2 бел	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PV188019	–
23KMin10	<i>F. acuminatum</i>		23KMin10	<i>Staphylococc</i> sp.	PV195180	–
23KaPT11	<i>F. avenaceum</i>	PP134918 PP130633	23Kam11k	<i>Ochrobactrum</i> sp.	PV190501	–
			23Kam11m	<i>Achromobacter</i> sp.	PV190150	–
			23Kam11y	<i>Achromobacter</i> sp.	PV190152	–
23AluetPT16	<i>F. avenaceum</i>	PQ219939	Aluet16_2_b	<i>Arthrobacter</i> sp.	PV190460	–
23Kamf1	<i>F. avenaceum</i>	OR591464	23kamF1_kr-zhelt	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PV203523	–
			23KamKK_F1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PV203557	–
			B23Kamf1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	OR591467	–
23 Kam 7/1	<i>F. torulosum</i>	PP087416; PP094242	B23kam7_2	<i>P. palleroniana</i>	PP092392	+
			23KA_KK_7_1B	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PV203507	–
17kspt1	<i>Ilyonectria crassa</i>	MH818326	Ilyonectria_crassa_B	<i>Achromobacter</i> sp.	PV190203	–
			B17KSPT1	<i>Enterobacter</i> sp.	OR557619	–
22KTOPS6/2	<i>Ilyonectria</i> sp.		Ktops_6_2_sb	<i>Pseudomonas</i> sp.	PV202815	–
22KamPT3_1	<i>Orbilia oligospora</i>	OR531681	22Kam3_1zh	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	PV595977	–
			22Kam3_1bg	<i>Staphylococcus succinus</i>	PV595976	
23KaPT2-2	<i>Trichocladium solani</i>	PP091310	23kam_2-2Zh	<i>Achromobacter</i> sp.	PV188158	–
			23kam_2-2bel	<i>Microbacterium</i> sp.	PV195174	–
			23kam_2-2krasn	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PV203515	–
23KaPT68	<i>T. solani</i>	PP736398	23PT68	<i>S. maltophilia</i>	PV203563	–
23KaPT3	<i>T. solani</i>	PP091311	23kam_3_2_1_zh	<i>Achromobacter</i> sp.	PV188106	–
			B23kamPT3_2	<i>P. palleroniana</i>	PP346452	+
23KaPT7_2	<i>T. solani</i>	PP091313	B23PT7/2	<i>Achromobacter</i> sp.	PV195177	–
23KaPT17	<i>T. solani</i>	PP091314	23PT17	<i>Serratia marcescens</i>	PV202825	–
23KaPT18_7	<i>T. solani</i>	PP091315	23PT18/7m	<i>Serratia marcescens</i>	PV202818	–

штаммов *T. solani* зависит как от сопутствующей бактерии, так и от индивидуальных свойств штамма.

Ранее нашей группой были впервые выявлены как патогены картофеля виды грибов *Acrostalagmus luteoalbus*, *Aspergillus ochraceus* и *Ilyonectria crassa*. Из них были выделены бактерии, принадлежащих видам *Achromobacter* sp., *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Stenotrophomonas* sp. (табл. 4) Эти бактерии оказались непатогенными для тканей клубня картофеля и не усиливали патогенность *A. luteoalbus*, *A. ochraceus* и *I. crassa* при одновременном нанесении на ломтики культур грибов и бактерий.

Также были выделены бактерии из непатогенных штаммов грибов: *Brevundimonas naejangsanensis* и *Staphylococcus succinus* из *Orbilbia oligospora*, *Serratia marcescens* и *Pseudomonas koreensis* из грибов рода *Clonostachys*. Из литературных данных известно, что бактерии, принадлежащие этим видам, могут оказывать ростостимулирующее действие на растения. Грибо-бактериальные комплексы, состоящие из «полезных» для растения микроорганизмов, могут послужить прообразом нового биологического препарата защиты и стимуляции роста растений.

Сравнение бактерий рода *Pseudomonas* из пораженных бактериальной мокрой гнилью клубней картофеля и из мицелия грибов

Чтобы сравнить пектолитических бактерий, ассоциированных с мицелием грибов, со «свободноживущими» пектолитическими бактериями рода *Pseudomonas*, отбирали клубни картофеля с признаками начальной стадии развития бактериальной мокрой гнили. Бактерии рода *Pseudomonas* отбирали на среде Кинга Б по их способности флуоресцировать в ультрафиолетовом свете. Всего было выделено три штамма свободноживущих пектолитических *Pseudomonas* (B23Kam9B, 203_3, 203_4), способных мацерировать клубни картофеля.

Были определены последовательности нуклеотидов участков генов субъединицы В ДНК-гиразы (*gyrB*) и сигма-фактора РНК-полимеразы (*groD*) выделенных фитопатогенных бактерий, относящуюся к роду *Pseudomonas*, все сиквенсы внесены в базу NCBI. *Pseudomonas*, выделенные из мицелия грибов *F. sporotrichioides* (штамм 18KrSbL17AB), *F. torulosum* (23KaPT7_1) и *T. solani* (23KaPT3) были полностью идентичны между собой по всем проанализированным последовательностям. По последовательности 16S они на 100% совпали с последовательностями *P. palleroniana* (CP025494; KY228957; OQ559538) По последовательности участка гена Сигма фактора ДНК-зависимой РНК-полимеразы штаммы были идентичны на 99,85% штаммам *P. palleroniana* (LC799859, CP087111). По последовательности участка гена гиразы наши штаммы были на 99,57% идентичны последовательности *P. palleroniana* CP087111.

Свободноживущие штаммы *Pseudomonas*, выделенные из клубней с мокрой бактериальной гнилью, отличались от штаммов, выделенных из грибов и друг от друга. По всем трем проанализированным генам штамм В23Кам9В (из Камчатки) и штаммы 203_3 и 203_4 (из Костромы) были родственны видовому комплексу *Pseudomonas fluorescens*. Штаммы 203_3 и 203_4 были идентичны друг другу и больше всего похожи по последовательности гена 16S (99,93% идентичности) на штамм *P. fluorescens* VSMKU3054 (МН443348), по последовательностям генов *gyrB* и *groD* – на *P. crudilactis* UCMA 17988 (99,64% идентичности с последовательностью MT080625; 99,55% – с MT080623 соответственно). Штамм В23Кам9В был идентичен более чем на 99% штамму *P. fluorescens* CFBP2392 (полногеномная последовательность CP133209). На основании анализа последовательностей можно отнести выделенные бактерии к группе *P. fluorescens*.

Для дополнительного подтверждения видовой принадлежности чистых культур выделенных фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* был использован тест LOPAT, который является стандартным для этой группы. Полученный профиль (L+O+P+A+T-) соответствует группе IVa фитопатогенных *Pseudomonas* (Lelliott et al., 1966), такие же характеристики были отмечены у *P. marginalis* pv. *marginalis*, вызывающей мягкую гниль картофеля (Li et al, 2007).

Анализ совместного заражения фитопатогенными бактериями и штаммами грибов

Совместное заражение пектолитическими бактериями и штаммами гриба проводили на ломтиках клубней картофеля, инкубируемых во влажной камере при 25°C в течение 7 дней. Для тестирования выбрали 5 штаммов *T. solani*, показавших среднюю или низкую патогенность при искусственном заражении ломтиков картофеля, 2 штамма *F. sporotrichioides*, 1 штамм *F. torulosum* и 1 штамм *G. candidum*. Во всех анализируемых штаммах молекулярным анализом не было обнаружено бактериального компонента.

Для совместного заражения использовали агрессивные бактериальные штаммы В23камРТ3_2 *P. palleroniana* и В23Кам9В *P. fluorescens*. Совместное заражение со штаммом В23камРТ3_2 увеличило размер поражения на ломтике картофеля во всех случаях, кроме *G. candidum*, рост которого не наблюдался ни на здоровой, ни на пораженной бактериями ткани картофеля. Совместное заражение со штаммом *P. fluorescens* В23Кам9В вызывало усиление поражения у штаммов *F. sporotrichioides*, рост штаммов *T. solani* и *F. torulosum* эти бактерии ингибировали (табл. 5).

Таблица 5. Совместное заражение фитопатогенными бактериями *P. palleroniana* (штамм В23kamPT3_2), *P. fluorescens* (штамм В23Кам9В) и штаммами грибов без бактерии.

Штамм гриба	Вид гриба	Диаметр поражения на 7 суток		
		Гриб без бактерии	Гриб совместно с <i>P. palleroniana</i>	Гриб совместно с <i>P. fluorescens</i>
23KaPT2_2	<i>T. solani</i>	2	15	0
23KaPT7_2	<i>T. solani</i>	7	22	0
23KaPT17	<i>T. solani</i>	2	13	0
23KaKK18_7	<i>T. solani</i>	4	11	0
23KaPT68	<i>T. solani</i>	5	15	4
14MPT17AB	<i>F. sporotrichioides</i>	8	21	10
23KaPT10_7	<i>F. sporotrichioides</i>	12	18	17
23KaPT7_1B	<i>F. torulosum</i>	7	16	4
23KaPT7G	<i>G.candidum</i>	0	2	0

Проверка штаммов бактерий, выделенных из грибов, на антагонистическую активность по отношению к другим грибам

На антагонистическую активность в отношении 4 видов грибов (*A. solani*, *C. truncatum*, *F. citri*, *F. oxysporum*) были протестированы штаммы бактерий 23PT17 (*Serratia marcescens*), 23PT18/7m. (*S. marcescens*), Acro5.3br (*S. marcescens*), 23B78/1 (*S. plymuthica*), 22Kam3_1bg (*Staphylococcus succinus*), 22Kam3/1y (*Brevundimonas naejangsanensis*), Aluet16_2_b (*Arthrobacter aurescens*). Штамм 23B78/1 был единственным, который оказал ингибирующее действие на рост всех тестируемых грибов, в связи с чем он был отобран для дальнейших исследований. Этот штамм был дополнительно протестирован на антагонистическую активность по отношению к *A. solani*, *C. truncatum*, *F. citri*, *F. oxysporum* ещё и *B. cinerea*, *F. incarnatum*, *F. duofalcatisporum*, *F. incarnatum*, *S. sclerotiorum* и оомицет *G. ultimum*. Он успешно сдерживал рост всех проанализированных фитопатогенных грибов, ширина зоны ингибирования составила от 2 до 20 мм (рис. 3, табл. 6).

При проращивании семян томата в присутствии бактерий штамма выяснилось, что *S. plymuthica* не угнетают прорастание семян и развитие ростков томата. Данные проведенных анализов позволяют рассматривать штамм 23B78/1 *S. plymuthica* как потенциальный компонент биофунгицида.

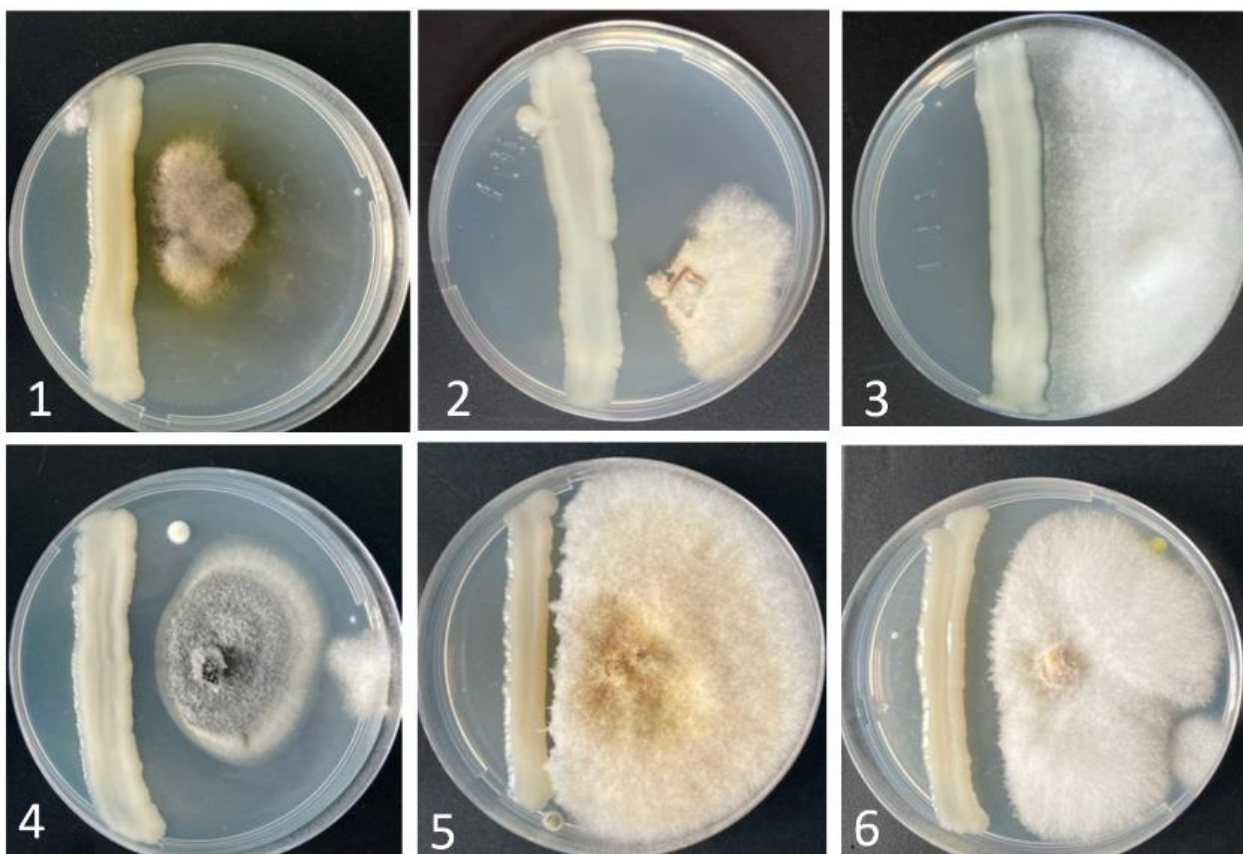


Рис. 3. Оценка антагонистической активности штамма *S. plymuthica* 23B78/1. *Alternaria solani* (1), *Botrytis cinerea* (2), *Globisporangium ultimum* (3), *Colletotrichum truncatum* (4), *Fusarium citri* (5), *Fusarium oxysporum* (6).

Таблица 6. Влияние штамма *S. plymuthica* 23B78/1 на рост фитопатогенных грибов (метод двойных культур, 7 суток инкубации при +25°C, в темноте).

Видовое название	Название штамма	Ширина зоны ингибирования роста мицелия, мм	Диаметр колонии в контроле, мм
<i>Alternaria solani</i>	23MLTF87	5*	55*
<i>Botrytis cinerea</i>	22MOVTL2	20	68
<i>Colletotrichum truncatum</i>	23MLTF62	4	58
<i>Fusarium citri</i>	20UgTF2	5	80
<i>F. incarnatum</i>	20UgTF3	4	71
<i>F. citri</i>	20UgLaTF7	5	80
<i>F. duofalcatisporum</i>	23MLTF61	2	75
<i>F. incarnatum</i>	23MLTF88A	3	70
<i>F. oxysporum</i>	20UgLaTF4	5	80
<i>Globisporangium ultimum</i>	Pyth	3	80
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	21KTOP2	7	80

Примечание. * — среднее из 3 измерений. Усреднено до целого.

Влияние обработки химическими и биологическими средствами защиты растений на развитие бактериальных болезней в процессе хранения клубней

Под влиянием средств защиты растений микробиота клубней может подвергаться значительным изменениям, что влияет на сохранность клубней при хранении. Для изучения влияния химических и биологических пестицидов на качественные показатели клубней при хранении был заложен следующий эксперимент. Клубни картофеля перед закладкой на хранение обрабатывали разрешенными на территории РФ препаратами: Максим, КС (действующее вещество – флудиоксонил), Кагатник, ВРК (бензойная кислота) и биологическим препаратом на основе бактерии *Bacillus subtilis* или водой (контроль). После хранения клубней оценивали потерю массы клубней, количество клубней с проростками, количество клубней, пораженных грибными и бактериальными болезнями.

При хранении масса клубней уменьшилась на 4,3-5,9%. Лучшая сохранность наблюдалась в варианте картофеля, обработанного препаратом на основе *Bacillus subtilis*. В обработанных фунгицидными препаратами клубнях картофеля наблюдалось больше проросших клубней, чем в контроле, что свидетельствует о ростостимулирующем эффекте фунгицидов.

Значительная убыль массы клубней произошла в период хранения 2020-2021 годов в варианте, обработанным Кагатником, из-за массового развития бактериозов. В 2020 году было повышенное количество осадков, в результате чего во всех вариантах наблюдалось повышение количества клубней с признаками мокрой бактериальной гнили. При обработке клубней химическими средствами защиты растений наблюдалось ужесточение протекания мягкой бактериальной гнили. В варианте с обработкой препаратом Максим было 9,8% пораженных бактериальной гнилью клубней, в варианте с препаратом Кагатник 62,2% сгнивших клубней, это в 1,7 и в 10,7 раз больше, чем в контрольном варианте. В варианте с обработкой *B. subtilis* доля пораженных бактериальной гнилью клубней не имела значимых отличий от контроля.

После применения химических фунгицидов происходит резкое снижение численности грибов – как патогенных, так и сапрофитных, которые могут подавлять рост бактерий – возбудителей мягкой гнили. По-видимому, снижение конкуренции со стороны грибов способствовало развитию бактерий и ускорению колонизации ими клубней. В пользу этой теории косвенно свидетельствуют данные о доле пораженных бактериальной гнилью клубней в варианте опыта с обработкой препаратом на основе *B. subtilis*. При высокой доле пораженных бактериозами клубней лучше использовать биологические препараты, способные сдерживать рост как фитопатогенных грибов, так и бактерий.

Проведенные исследования показали, что примерно в 50% случаев в культурах мицелиальных фитопатогенных грибов присутствуют бактерии. В большинстве это непатогенные для растений бактерии, роль которых неясна и требует дальнейшего изучения. Однако встречаются и высокопатогенные виды (в нашем случае – *Pseudomonas palleroniana*). Совместная инфекция *P. palleroniana* с грибами существенно увеличивает их патогенность. Также выявлены виды, обладающие высокой антагонистической активностью и перспективные для использования в качестве агентов биоконтроля.

Присутствие фитопатогенных бактерий в культурах фитопатогенных видов грибов заставляет по-новому взглянуть на систему защиты растений. Большинство из присутствующих на рынке фунгицидов эффективны только против грибов и не наносят вреда бактериям. Вероятно, именно этим объясняются многие случаи изреживаний всходов и загниваний клубней после их обработки широко распространенными препаратами. Для эффективной защиты растений необходим качественно новый подход, ориентированный на борьбу с комплексами возбудителей болезней, включающими разные виды фитопатогенных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ штаммов грибов с помощью праймеров на бактериальный ген 16S выявил присутствие прокариотического компонента у 36% изучаемых штаммов грибов. Таксономическая идентификация прокариотического компонента показала потенциальное присутствие сапротрофных и фитопаразитических видов бактерий. Связи между видом гриба и видом идентифицированной на нем бактерии не выявлено.

2. Анализ чистых культур бактерий показал, что большинство выделенных из грибов штаммов не являются фитопатогенными. Патогенность в отношении тканей клубней картофеля выявлена только у вида *Pseudomonas palleroniana*.

3. Сравнительный анализ изолятов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из мицелия фитопатогенных грибов и из клубней картофеля с симптомами мокрой бактериальной гнили (в т.ч. выделенных из клубней одной партии), показал различия в таксономической принадлежности анализируемых бактерий: все штаммы из мицелия принадлежали виду *Pseudomonas palleroniana*, из больных клубней – *Pseudomonas fluorescens*.

4. Совместное заражение тканей клубня штаммами грибов и бактериями *Pseudomonas palleroniana* и *P. fluorescens* показало, что *P. palleroniana* со всеми исследованными видами грибов увеличивала тяжесть поражения, а действие *P. fluorescens* отличалось на разных видах грибов.

5. Штамм *Serratia plymuthica*, выделенный из мицелия гриба, обладает антагонистической активностью против фитопатогенных грибов.

6. Обработка картофеля химическими фунгицидами перед закладкой на хранение может усугубить развитие бактериальных инфекций при высоком исходном уровне бактериальной заражённости.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, входящих в международных базах цитирования за пятилетний период

1. Chudinova E.M. Plant pathogenic pectolytic bacteria in the mycelia of the fungi infecting potato tubers / Chudinova E.M., **Platonov V.A.**, Skokov D.N., Tsindeliani A.A., Elansky S.N. // Journal of Plant Pathology. 2025. V.107. P. 1195-1200. <https://doi.org/10.1007/s42161-025-01838-w> EDN: ICNJIU
2. **Platonov V.A.**, Elansky S.N., Chudinova E.M. Bacteria in fungal cultures isolated from the Solanaceae family plants // Pakistan Journal of Phytopathology. 2024. V.36(1). P. 148–159. <https://pjp.pakps.com/index.php/PJP/article/view/1106> EDN: QSIOXB
3. **Платонов В.А.** Пектолитические бактерии рода *Pseudomonas* из поражённых мокрой гнилью клубней картофеля / **Платонов В.А.**, Хасбиуллина О.И., Андреевская В.М., Филатова Г.Л., Еланский С.Н., Чудинова Е.М. // Вестник защиты растений. 2024. Т. 107(4). С. 165-169. <https://plantprotect.ru/index.php/vizr/article/view/16713> EDN: DUAFRI
4. Chudinova E.M. First report of potato tuber disease caused by *Acrostalagmus luteoalbus* / Chudinova E.M., Vedmedenko D.V., **Platonov V.A.**, Elansky A.S., Belosokhov A.F., Elansky S.N. // Journal of Plant Pathology. 2022. V.104. P.1203. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01173-4> EDN: IJWZMI

Научные работы, опубликованные в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ/РУДН

5. **Платонов В.А.**, Чудинова Е.М., Еланский С.Н. Адаптация технологии защиты растений с учетом грибо-бактериальных ассоциаций // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2024. Т. 19(1). С. 122–127. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2024-19-1-122-127> EDN: AGBXEW2.
6. **Платонов В.А.** Перспективы штамма 23B78/1 *Serratia plymuthica* как агента биоконтроля для защиты томата / **Платонов В.А.**, Нжойа М.Б.Э., Еланский А.С., Скоков Д.Н., Еланский С.Н., Чудинова Е.М. // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2025. Т. 20. No 2. С.253–262. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2025-20-2-253-262> EDN: NRKGKR

Научные работы, опубликованные в материалах симпозиумов и конференции

7. Чудинова Е. М., **Платонов В. А.**, Еланский С. Н. Микробиом грибов, ассоциированных с растениями // Современная микология в России Т. 10. Москва: Национальная академия микологии, 2024. С. 239–240.

8. Чудинова Е. М., **Платонов В. А.**, Еланский С. Н. Грибо-бактериальные комплексы в стимуляции роста растений // Биологизация землепользования: почва, технологии, продукция: материалы международной научно-практической конференции / Под ред. А.В. Яковлева. Т. 1. М: Постер-М, 2023. С. 185–188.
9. **Платонов В.А.**, Еланский С.Н., Чудинова Е.М. Оценка устойчивости новых для картофеля патогенов к некоторым фунгицидам // Инновационные процессы в сельском хозяйстве, 13 научно-практическая конференция. Москва, РУДН, 22-23 апреля 2021 года. С. 83-86
10. **Платонов В.А.**, Еланский С.Н., Чудинова Е.М. Эндобионтные бактерии в чистых культурах патогенных для картофеля грибов // Инновационные процессы в сельском хозяйстве. М.: Издательство РУДН, 2023. С.382-385
11. **Платонов В.А.**, Еланский С.Н., Чудинова Е.М. Разнообразие бактерий в культурах грибов, выделяемых с растений семейства Solanaceae // Аграрная наука - сельскому хозяйству. Сборник материалов XVIII международной научно-практической конференции. В 2-х книгах. Том 1. Барнаул, 2023. С. 276-278.
12. **Платонов В.А.**, Еланский С.Н., Чудинова Е.М. Разнообразие бактерий в культурах грибов, выделяемых с картофеля и томата // XXX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» 2023г.
13. **Платонов В.А.**, Еланский С.Н., Чудинова Е.М. Пектолитические бактерии рода *Pseudomonas* из поражённых клубней картофеля, выращенных на Камчатке // Актуальные аспекты современной микробиологии, 2024, с. 171-172

Участие в написании монографий

14. Сухорученко Г.И., Долженко В.И., Ганнибал Ф.Б., Албантов Г.П., **Платонов В.А.** и др. Резистентность вредных членистоногих, грибов и грызунов к пестицидам и методы ее мониторинга // ООО ИД "Петрополис" С.-Пб., 2024. 672 с. ISBN 978-5-9676-1665-5

Научные работы, опубликованные ранее пятилетнего периода.

15. Chudinova E.M., **Platonov V.A.**, Elansky S.N, Alexandrova A.V., Kokaeva L.Yu., Krutyakov Yu. First report of *Ilyonectria crassa* on potato// J Plant Pathol. 2019. V. 101, P. 1293–1294. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00355-x>
16. Чудинова Е.М., **Платонов В.А.**, Александрова А.В., Еланский С.Н. Биологические особенности и устойчивость к фунгицидам фитопатогенного гриба *Ilyonectria crassa* // Вестник защиты растений. 2020. Т. 103(3). С. 196-201. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-13431>
17. **Platonov V.A.**, Chudinova E.M., Elansky S.N. New fungal potato pathogens: resistance to fungicides// Innovation in agriculture. Conference papers of the XI international scientific and practical conference. М.: Издательство РУДН, 2019. С. 86-89.

АННОТАЦИЯ

Платонов Владислав Андреевич

Работа посвящена грибо-бактериальным сообществам, ассоциированным с растениями картофеля. Изучение бактерий, ассоциированных с грибами, как и изучение сообществ микроорганизмов в целом – один из трендов современной микробиологии. Впервые в России подробно изучены бактерии, ассоциированные с мицелиальными грибами. Более половины проверенных штаммов грибов, выделенных из растений картофеля, содержали бактерии, при этом корреляции между видом гриба и видом бактерии не было выявлено. Выделенные из мицелия грибов бактерии *Pseudomonas palleroniana* проявили пектолитическую активность по отношению к ломтикам картофеля. При совместном заражении грибом и бактерией тяжесть поражения клубней усугублялась. Выделенные из мицелия грибов *P. palleroniana* существенно отличались от фитопатогенных пектолитических бактерий, относящихся к группе видов *P. fluorescens*, найденных на клубнях картофеля той же партии. Был протестирован антагонистический потенциал выделенных из мицелия бактерий по отношению к другим фитопатогенным грибам; отобран штамм бактерии *Serratia plymuthica* с высокой антагонистической активностью. Показано, что обработка клубней химическими фунгицидными препаратами перед закладкой на хранение может усугубить развитие бактериальных инфекций при высоком исходном уровне бактериальной зараженности.

ABSTRACT

Platonov Vladislav Andreevich

This study focuses on fungal and bacterial communities associated with potato plants. The study of bacteria associated with fungi, like the study of microbial communities in general, is a trend in modern microbiology. For the first time in Russia, bacteria associated with filamentous fungi were thoroughly studied. More than half of the tested fungal strains isolated from potato plants contained bacteria, although no correlation was found between the fungal and bacterial species. *Pseudomonas palleroniana* bacteria isolated from the fungal mycelium exhibited pectolytic activity against potato slices. When both the fungus and the bacteria were co-infected, the severity of tuber damage increased. *P. palleroniana* bacteria isolated from the fungal mycelium differed significantly from free-living phytopathogenic pectolytic bacteria belonging to the *P. fluorescens* species group found on potato tubers from the same batch. The antagonistic potential of bacteria isolated from the mycelium against other phytopathogenic fungi was tested; a strain of *Serratia plymuthica* with high antagonistic activity was selected. It was shown that treating tubers with chemical fungicides before storage can exacerbate the development of bacterial infections when the initial bacterial load is high.