

УДК 579.22,579.64

Штаммы PGPR *Pseudomonas*, перспективные для создания биопрепаратов для защиты и стимуляции роста растений

© 2017 г. Т.В. СИУНОВА^{1,*}, Т.О. АНОХИНА^{1,**}, О.И. СИЗОВА¹, С.Л. СОКОЛОВ¹, О.И. САЗОНОВА¹, В.В. КОЧЕТКОВ¹, А.М. БОРОНИН¹, S.G. PATIL², A.V. CHAUDHARI²

¹ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» Российской академии наук, Московская обл., Пушкино 142290

²School of Life Sciences, North Maharashtra University, Jalgaon 425001 MS, India

*e-mail: siunova@mail.ru

Поступила в редакцию 19.09.2016

Принята в печать 17.10.2016

Из ризосферы растений, произраставших в различных климатических зонах России, изолированы 12 штаммов бактерий р. *Pseudomonas*, способных к биоконтролю фитопатогенов и стимуляции роста растений. Штаммы синтезировали антибиотики феназинового ряда, цианид водорода, ауксины, поверхностно-активные вещества, солибилизировали фосфаты и подавляли рост фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* и бактерий *Pectobacterium carotovorum*. На основании анализа последовательности гена 16S рРНК выделенные штаммы PGPR *Pseudomonas* отнесены к шести видам: *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. protegens*, *P. lurida* и *P. brassicacearum*. У двух штаммов *P. fluorescens* IC7 и A1, выделенных из ризосферы нефтезагрязненных почв, обнаружены плазмиды биодеградации ПАУ размером около 80 тпн, относящиеся к группе несовместимости Р-9. Изученные в настоящей работе новые штаммы PGPR *Pseudomonas* могут быть рекомендованы в качестве продуцентов биопрепаратов для защиты и стимуляции роста растений и использованы в фиторемедиационных технологиях.

Ключевые слова: ауксины, биоконтроль фитопатогенов, биопрепараты, ПАВ, ризосферные бактерии, феназиновые антибиотики, PGPR р. *Pseudomonas*.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-2-56-67

Влияние бактерий р. *Pseudomonas* на растения весьма разнообразно – от нейтрального и стимулирующего до фитопатогенного и агрессивного [1]. Механизмы положительного эффекта бактерий на растения можно условно разделить на два типа: 1) прямая (непосредственная) стимуляция роста растений за счет синтеза фитогормонов и улучшения минерального питания растений; 2) опосредованная стимуляция роста растений за счет вытеснения и подавления развития почвенных фитопатогенных грибов и бактерий, угнетающих рост растений [2]. Псевдомонады группы PGPR являются ключевыми ризосферными бактериями в микробных ценозах, определяя супрес-

сивные свойства почв, в которых растения практически не подвержены заболеваниям корневой системы [3]. Применение биопрепаратов на основе природных бактерий-антагонистов не вызывает нарушений в экосистеме, а их действие на почвенные фитопатогены является специфичным и пролонгированным за счет способности штаммов PGPR колонизовать корни растений. Биопрепараты на основе PGPR р. *Pseudomonas* получают все большее практическое применение в растениеводстве для предпосевной инокуляции семян и обработки растений в период вегетации [4–7].

В последние десятилетия при разработке подходов к фиторемедиации почв особое внима-

Список сокращений: ИУК – индолил-3-уксусная кислота; КЖ – культуральная жидкость; КОЕ – колониеобразующая единица; ПАВ – поверхностно-активное вещество; ПАУ – полиароматические углеводороды; ПЦР – полимеразная цепная реакция; среда LB – среда Лурия–Бертани; тпн – тысяч пар нуклеотидов; ТСХ – тонкослойная хроматография; ФКА – феназин-1-карбоксамид; ФКК – феназин-1-карбоновая кислота; PGPR (Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria*) – ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений; PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar) – агаровая среда для выделения бактерий р. *Pseudomonas*.

ние уделяется полифункциональным штаммам PGPR р. *Pseudomonas*, сочетающим фитостимулирующие свойства, устойчивость к тяжелым металлам и способность к биodeградации органических поллютантов [8, 9].

Целью данной работы являлось выделение и характеристика новых штаммов PGPR р. *Pseudomonas* как продуцентов биопрепаратов для стимуляции роста растений, защиты растений от грибных и бактериальных патогенов и использования в фиторемедиационных технологиях.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Среды и культивирование микроорганизмов

Для культивирования бактерий использовали полноценные среды: LB [10] (г/л: бакто-триптон (Difco, США) – 10, дрожжевой экстракт (Difco) – 5, хлористый натрий («Реахим», Россия) – 10); PIA (Sigma, США); Кинга Б [11] (г/л: бакто-пептон (Helicon, Россия) – 20, глицерин (Panreac, Германия) – 10, K_2HPO_4 («Реахим») – 1,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ («Реахим») – 1,5, бакто-агар (Panreac) – 15) и минеральную среду М9 [10] (г/л: $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ – 17,9, KH_2PO_4 – 3,0, NaCl – 0,5, NH_4Cl – 1,0 (все соли производства «Реахим»); после автоклавирования в среду добавляли 1 мл 1 М $MgSO_4$ и 0,5 мл 1 М $CaCl_2$

Для культивирования грибов использовали среду Каннера [12], содержащую, г/л: Na_2HPO_4 – 4, KH_2PO_4 – 1,5, NH_4Cl – 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 (все соли производства «Реахим»), декстрозу (USB, США) – 10 и картофельный бульон – 200 мл (для приготовления картофельного бульона 200 г мелко нарезанного очищенного картофеля кипятили в 800 мл воды в течение 20 мин, затем раствор фильтровали). В готовую среду добавляли 8 мл стокового раствора микроэлементов следующего состава: $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ – 200 мг/л, H_3BO_3 – 6 мг/л, $ZnSO_4$ – 2 г/л, Na_2MoO_4 – 30 мг/л, $CaCl_2$ – 1 г/л, $NiCl_2$ – 50 мг/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2 г/л (все соли производства «Реахим»).

В минеральных средах в качестве источника углерода и энергии использовали глюкозу, глицерин и салицилат натрия (1,0 г/л) (Panreac).

Способность к росту на полиароматических углеводородах оценивали, выращивая бактерии на агаризованной среде М9 в парах нафталина (Sigma, США) или фенантрена (Sigma). Температура культивирования бактерий и грибов составляла 28°C и 22°C, соответственно.

Выделение ризосферных штаммов бактерий

Отбор 44 образцов дикорастущих растений проводили в различных климатических зонах: Московская обл. (Пушино) – 10 образцов, Орловская обл. (дер. Снецкая Лука) – 5 образцов, республика Татарстан (Нижнекамск) – 3 образца, Краснодарский край (Краснодар, НИИ БЗР, станции Северская и Хадьженская) – 17 образцов, Кольский полуостров (Апатиты) – 7 образцов и Тюменская обл. – 2 образца.

Схема отбора бактерий была следующей: 1) посев смывов с корней растений на селективную среду PIA для выделения псевдомонад; 2) отбор флуоресцирующих псевдомонад, подавляющих рост фитопатогенных грибов и бактерий; 3) видовая идентификация отобранных штаммов бактерий на основе определения последовательности гена 16S рРНК; 4) исследование свойств, характерных для бактерий группы PGPR.

Определение антагонистической активности

Анализ проводили при совместном культивировании тестируемых штаммов и фитопатогенов согласно [13]. В качестве индикаторных фитопатогенов использовали грибы *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (штамм Ggt 1818) и *Rhizoctonia solani*, а также бактерии *Burkholderia caryophylli* ВКМ В-1296 и *Pectobacterium carotovorum* В15 (коллекция лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН).

Определение феназиновых антибиотиков

Указанные вещества выделяли согласно методике, описанной в [14]; пробы растворяли в ацетонитриле. Разделение феназинов проводили при помощи ТСХ на силикагелевых пластинах с флуоресцентным анализатором (Fluka, Германия) в системе хлороформ–этилацетат–муравьиная кислота (5:4:1) (все компоненты производства «Экос-1», Россия). Для идентификации феназиновых производных в препаратах проводили визуальное определение подвижности (R_f) и цвета флуоресценции разделившихся соединений. В качестве стандартов сравнения использовали феназин-1-карбоновую кислоту (ФКК) и феназин-1-карбоксамид (ФКА) (Sigma, США).

Концентрацию индолил-3-уксусной кислоты определяли в КЖ с помощью реактива Сальковского по стандартной методике [15].

Продукция цианида водорода

Бактериальные штаммы засеивали уколом петли в микропробирки с LB-агаром. Сверху место посева накрывали фильтровальным диском, обработанным реагентом Feigl–Anger [16] (5 мг этилацетоацетата меди(II) и 5 мг 4,4'-метиленис-(N,N-диметиланилина) (оба компонента производства Sigma), растворенные в 2 мл хлороформа («Экос-1»). Продукцию цианида водорода оценивали по появлению синего окрашивания фильтровальных дисков после инкубации бактерий при 28°C в течение 18 ч.

Продукция поверхностно-активных веществ

Данную активность оценивали по снижению поверхностного натяжения бактериальной культуры в минеральной среде М9 с глицерином (Panreac) по сравнению с контролем (среда без бактерий) согласно [17].

Способность к растворению фосфатов

Растворяющую активность исследовали на минеральной агаризованной среде следующего состава, г/л: MgSO₄·7H₂O – 2; NaCl – 1; NH₄Cl – 10; трис ((гидрокси)метиламинометан) (Sigma) – 1; глюкоза (Panreac) – 10, агар (Panreac) – 15. Стоковую суспензию Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ (Calcium phosphate hydroxide, type 3) (Sigma), отмытую деионизованной водой 10–15 раз, добавляли в среду до конечной концентрации 5%. Отмытые 0,89% раствором хлористого натрия («Реахим») суспензии бактерий (10⁸ КОЕ/мл) с помощью репликатора помещали на агаризованную среду с последующей инкубацией при 28°C в течение 1–3 сут. Способность к растворению фосфатов оценивали по появлению прозрачных областей вокруг бактериальной реплики.

Выделение плазмидной ДНК

Процедуру осуществляли методом щелочного лизиса согласно рекомендациям [10]. Группы несовместимости плазмид определяли с помощью ПЦР фрагмента *rep*-области со специфическими праймерами [18].

Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

Фрагмент 16S рДНК получали с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к генам 16S

рРНК эубактерий: 8f: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и 1492r: 5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Реакцию проводили в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) в стандартных условиях при конечной концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов 200 мкМ и MgCl₂ 1,5 мМ. ДНК очищали из геля, используя Qiaex II Agarose Gel Extraction System (Qiagen GmbH, Германия) по протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидную последовательность определяли с помощью секвенатора ABI GeneAnalyser 3130 (Applied Biosystems, США).

Исследование эволюционных расстояний бактерий р. *Pseudomonas*

Эволюционные расстояния изучали методом максимального правдоподобия на основе модели Tamura–Nei [19]. Исходные дендрограммы для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Joining и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием метода максимального правдоподобия (MCL). Эволюционный анализ и конструирование филогенетического дерева были проведены с использованием программы MEGA v. 7.0 [20].

Определение колонизирующей способности ризосферных бактерий

Анализ проводили в стерильных условиях. Семена пшеницы и горчицы после двухчасовой стерилизации в 2%-ном растворе гипохлорита натрия (Panreac) и 5-кратной отмытки стерильной дистиллированной водой инкубировали на LB-агаре в течение 18 ч и затем отбирали стерильные семена. 18-часовую бактериальную культуру разводили в 100 раз в 10 мМ растворе сульфата магния (конечная концентрация клеток ~ 10⁸ КОЕ/мл). Семена (10 шт.) инокулировали бактериальной суспензией в течение 30 мин и высевали в пластиковые сосуды Magenta (77 мм × 77 мм × 97 мм) (Sigma Chemical Co, США) с песком (200 г), увлажненным средой Мурашиге-Скуга (Sigma) (влажность 15%). Растения выращивали в программируемой камере (Binder, Германия) с 12-часовым световым периодом при 20°C и 12-часовым темновым периодом при 10°C в течение 7 сут.

Влияние ризосферных бактерий на рост корней растений

Инокуляцию стерильных семян пшеницы проводили, как описано выше. Семена проращивали в 10 мМ растворе $MgSO_4$ в чашках Петри стерильно в течение 3 сут в термостате при 22°C. Суммарную длину корней инокулированных и контрольных (необработанных) проростков измеряли и сравнивали. Опыт проводили в трехкратной повторности.

Микровегетационные эксперименты

Пластиковые сосуды для выращивания растений (Magenta Vox) (Ranreas, Германия) наполняли 100 г грунта для рассады «Богатырь» (ООО «Лама торф», Россия). Мицелий фитопатогенного гриба *R. solani*, выращенный на агаризованной среде Каннера в течение 10 сут, суспендировали в среде Мурашиге-Скуга. В грунт путем полива вносили суспензию мицелия до влажности 60% и тщательно перемешивали. Фитопатогенная нагрузка составляла 2 г мицелия на 100 г грунта. Пророщенные в течение 18 ч семена огурца сорта «Изящный» («СеДек», Россия) обрабатывали в течение 30 мин бактериальной культурой, разведенной в 100 раз. В каждый сосуд высевали по 5 семян. Растения выращивали в программируемой камере (Binder) в режиме свет/темнота 12 ч/12 ч при 22°C в течение 3 нед. Среднюю массу корня и надземной части растения (\pm стандартное отклонение) определяли с помощью программы Excel. В качестве контроля использовали неинокулированные проростки, выращенные в чистом (естественный фон) и зараженном *R. solani* (фитопатогенный фон) грунте. Все варианты эксперимента проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация новых штаммов PGPR р. *Pseudomonas*

Из ризосферы растений, растущих на почвах России различных типов (см. «Условия эксперимента»), было выделено и проанализировано 477 бактериальных изолятов. Из 65 штаммов, культивируемых на селективной среде для выде-

ления псевдомонад, были отобраны пятьдесят штаммов флуоресцирующих бактерий. Основным критерием дальнейшего отбора являлась способность штаммов к подавлению роста фитопатогенных грибов *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (штамм Ggt 1818) и *Rhizoctonia solani*, а также бактерий *Burkholderia caryophylli* ВКМ В-1296 и *Pectobacterium carotovorum* В15. В результате было отобрано 12 новых штаммов с различной степенью антагонистической активности по отношению к фитопатогенам, характеристики которых, а также еще пяти ранее выделенных штаммов приведены в табл. 1.

Отобранные штаммы по результатам анализа последовательности гена 16S рНК были отнесены к 6 видам: *P. chlororaphis* – 4 штамма Р4-1 (GenBank KT215475), Or3-3 (KT215481), Kr31 (KT215483) и IG1 (KT215484); *P. fluorescens* – 3 штамма Р2-1 (KT215474), А1 (KT215480) и IC7 (KT215485); *P. putida* – 2 штамма Р8-2 (KT215478) и О9-10 (KT215479); *P. protegens* – штамм Р4-2 (KT215476); *P. lurida* – штамм Р6-1 (KT215477); *P. brassicacearum* – штамм Kr21 (KT215482)¹.

Для филогенетического сравнения изучаемых в данной работе штаммов были выбраны последовательности генов 16S рНК эффективных PGPR бактерий р. *Pseudomonas*. Как видно из рисунка, все проанализированные штаммы формируют четыре достоверных кластера: кластер *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. protegens* и *P. putida/aeruginosa*. Кластер *P. fluorescens* подразделяется на три подкластера, два из которых составляют штаммы видов *P. brassicacearum* и *P. lurida*.

Виды псевдомонад *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* часто встречаются в ризосфере, хорошо изучены и используются для разработки биопрепаратов. Вид *P. protegens* был отделен от *P. fluorescens* сравнительно недавно, представители этого вида известны как активные агенты биоконтроля фитопатогенов [21]. Виды *P. brassicacearum* и *P. lurida* определены в 2000 и 2007 г., соответственно [22, 23]. Описано положительное [24, 25], нейтральное [26] и патогенное [27, 28] влияние представителей этих видов на растения. В связи с этим представляло интерес выяснить, обладают ли свойствами PGPR выделенные штаммы *P. protegens* Р4-2, *P. lurida* Р6-1 и *P. brassicacearum* Kr21.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Таблица 1

Характеристика ризосферных штаммов бактерий
Characteristic of rhizosphere bacteria strains

Штамм (место выделения)	Зона подавления фитопатогена, мм			Фенотип штамма	КОЕ/г корней пшеницы/ горчицы	L _{сум} корней пшеницы, % от контроля*
	<i>R. solani</i>	<i>B. caruorphylli</i> B-1296	<i>P. caroto</i> <i>vorum</i> B15			
<i>P. chlororaphis</i> P4-1 (МО)	8 ± 2	12 ± 2	4 ± 1	(ФКК/ОН-ФЕН) ⁺ HCN ⁺ ПАВ(31 ± 0,4) ⁺ ИУК(12,6 ± 1,5) ⁺ (РСА/ОН-РHZ) ⁺ HCN ⁺ SAC(31 ± 0,4) ⁺ IAA(12,6 ± 1,5) ⁺	5,3 × 10 ⁸ / 4,6 × 10 ⁸	87
<i>P. chlororaphis</i> IG1 (Т)	7 ± 2	6 ± 1	3 ± 1	(ФКК/ОН-ФЕН) ⁺ HCN ⁺ ПАВ(29 ± 0,5) ⁺ ИУК(13,4 ± 1,2) ⁺ (РСА/ОН-РHZ) ⁺ HCN ⁺ SAC(29 ± 0,5) ⁺ IAA(13,4 ± 1,2) ⁺	3,8 × 10 ⁸ / 1,0 × 10 ⁸	100
<i>P. chlororaphis</i> K31 (КК)	6 ± 2	12 ± 2	3 ± 1	(ФКК/ОН-ФЕН) ⁺ HCN ⁺ ИУК(17,6 ± 2,2) ⁺ (РСА/ОН-РHZ) ⁺ HCN ⁺ IAA(17,6 ± 2,2)	2,3 × 10 ⁸ / 3,3 × 10 ⁸	70
<i>P. chlororaphis</i> Or3-3 (ОО)	6 ± 1	6 ± 1	?	ФКА ⁺ HCN ⁺ ИУК(11,2 ± 1,5) ⁺ PCN ⁺ HCN ⁺ IAA(11,2 ± 1,5) ⁺	1,5 × 10 ⁸ / 2,7 × 10 ⁸	94
<i>P. fluorescens</i> P2-1 (МО)	≤ 2	–	–	ГАП ⁺ ПАВ(40 ± 4) ⁺ ИУК(≤ 10) ⁺ НАР ⁺ SAC(40 ± 4) ⁺ IAA(≤ 10) ⁺	5,0 × 10 ⁷ / 1,0 × 10 ⁷	76
<i>P. fluorescens</i> A1 [#] (МО)	7 ± 2	–	–	ФКК ⁺ ИУК(≤ 10) ⁺ РСА ⁺ IAA(≤ 10) ⁺	2,2 × 10 ⁷ / 2,4 × 10 ⁶	94
<i>P. fluorescens</i> IC7 [#] (ТО)	< 2	–	–	ФКК ⁺ ИУК(≤ 10) ⁺ РСА ⁺ IAA(≤ 10) ⁺	5,1 × 10 ⁹ / 1,2 × 10 ⁹	120
<i>P. putida</i> P8-2 (МО)	< 2	–	–	ГАП ⁺ ИУК(12,6 ± 1,4) ⁺ НАР ⁺ IAA(12,6 ± 1,4) ⁺	1,2 × 10 ⁷ / 3,0 × 10 ⁷	120
<i>P. putida</i> O9-10 (МО)	5 ± 1	5 ± 1	6 ± 2	(ФКК/ФКА) ⁺ HCN ⁺ ГАП ⁺ ИУК(≤ 10) ⁺ (РСА/PCN) ⁺ HCN ⁺ НАР ⁺ IAA(≤ 10) ⁺	3,4 × 10 ⁸ / 5,0 × 10 ⁸	110
<i>P. protegens</i> P4-2 (МО)	≤ 2	6 ± 1	3 ± 1	HCN ⁺ ГАП ⁺ ПАВ(30 ± 0,4) ⁺ ИУК(≤ 10) ⁺ HCN ⁺ НАР ⁺ SAC(30 ± 0,4) ⁺ IAA(≤ 10) ⁺	3,3 × 10 ⁸ / 1,2 × 10 ⁹	100

<i>P. lurida</i> P6-1 (MO)	≤ 2	5 ± 1	–	–	–	ГАП ⁺ ИУК(≤10) ⁺ НАР ⁺ IAA(≤10) ⁺	3,1 × 10 ⁷ / 4,3 × 10 ⁷	112
<i>P. brassicacearum</i> Kr21 (КК)	≤ 2	≤ 2	–	–	–	НСН ⁺ ГАП ⁺ ИУК(≤10) ⁺ НСН ⁺ НАР ⁺ IAA(≤10) ⁺	4,5 × 10 ⁸ / 9,8 × 10 ⁸	120
Коллекционные штаммы ИБФМ ГРАН								
<i>P. chlororaphis</i> BS1393	11 ± 3	7 ± 2	10 ± 2	3 ± 1	–	(ФКК/ОН-ФЕН) ⁺ НСН ⁺ ГАП ⁺ ПАВ(29 ± 0,4) ⁺ ИУК(16,4 ± 2,0) ⁺ (РСА/ОН-РНЗ) ⁺ НСН ⁺ НАР ⁺ SAC(29 ± 0,4) ⁺ IAA(16,4 ± 2,0) ⁺	1,0 × 10 ⁹ / 2,3 × 10 ⁹	100
<i>P. chlororaphis</i> OV17 [#]	4 ± 1	4 ± 1	10 ± 2	3 ± 1	–	(ФКК/ОН-ФЕН) ⁺ НСН ⁺ ПАВ(32 ± 2,6) ⁺ ИУК(14,0 ± 1,6) ⁺ (РСА/ОН-РНЗ) ⁺ НСН ⁺ SAC(32 ± 2,6) ⁺ IAA(14,0 ± 1,6) ⁺	3,1 × 10 ⁹ / 5,0 × 10 ⁹	128
<i>P. chlororaphis</i> 16H	4 ± 2	2 ± 1	6 ± 1	≤ 2	–	(ФКК/ОН-ФЕН) ⁺ НСН ⁺ ГАП ⁺ ИУК(10,2 ± 1,2) ⁺ (РСА/ОН-РНЗ) ⁺ НСН ⁺ НАР ⁺ IAA(10,2 ± 1,2) ⁺	5,0 × 10 ⁸ / 5,5 × 10 ⁹	123
<i>P. fluorescens</i> OV29 [#]	≤ 2	–	–	–	–	ГАП ⁺ ПАВ(33 ± 1,3) ⁺ ИУК(≤10) ⁺ НАР ⁺ SAC(33 ± 1,3) ⁺ IAA(≤10) ⁺	7,2 × 10 ⁸ / 2,0 × 10 ⁹	112
<i>P. protegens</i> 38a	4 ± 1	3 ± 1	10 ± 2	3 ± 1	–	PLT ⁺ НСН ⁺ ГАП ⁺ ПАВ(30 ± 0,5) ⁺ ИУК(≤10) ⁺ PLT ⁺ НСН ⁺ НАР ⁺ SAC(30 ± 0,5) ⁺ IAA(≤10) ⁺	1,4 × 10 ⁹ / 3,0 × 10 ⁹	100

Примечания: МО – Московская обл., Т – Татарстан, ОО – Орловская обл., КК – Краснодарский край, ТО – Томенская обл. ПАВ – поверхностно-активные вещества (в скобках даны значения поверхностного натяжения (ПН) бактериальной культуры, мН/м; значения ПН, близкие к контролю (72±0,3 мН/м) не приведены. Контроль – среда М9 без бактерий. ГАП⁺ означает растворение гидроксиапатита кальция в агаризованной среде.

*Контроль – суммарная длина корней трехуточных проростков пшеницы без инокуляции штаммами (34±6 мм).

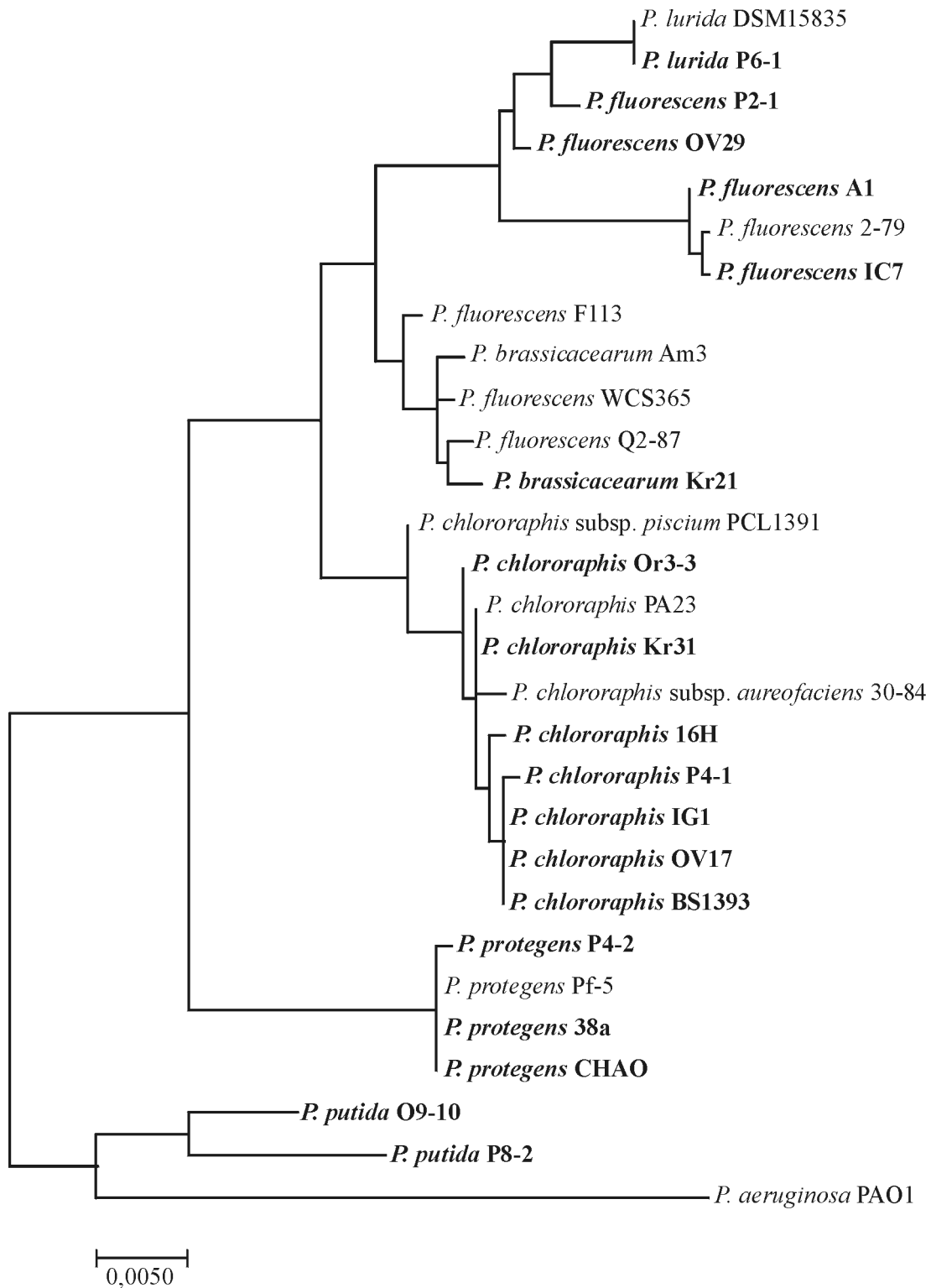
«+» – наличие продукции следующих метаболитов: ФКК (феназин-1-карбоновой кислоты), ФКА (феназин-1-карбоксамид), ОН-ФЕН (оксифеназинов), PLT (пиолотеорина); ИУК (индолил-3-уксусной кислоты (в скобках концентрация ИУК, мкг/мл).

[#]Штаммы, содержащие природные плазмиды биодegradации нафталина.

Footnotes: MO – Moscovskaya Oblast, T – Tatarstan, OO – Orlovskaya Oblast, KK – Krasnodarskiy Krai, TO – Tomenskaya Oblast. SAC – surface active compounds. Surface tension (ST) of bacterial culture in mN/m is given within parentheses. Near-control ST values (72 ± 0.3 mN/m) are not indicated. Control — M9 medium without bacteria. (+) indicates the occurrence of the production of the following metabolites: PCA (phenazine-1-carboxylic acid), PCN (phenazine-1-carboxamide), OH-PHZ (hydroxyphenazines), PLT (pyoluteorine), IAA (indolyl-3-acetic acid) (IAA concentration in µg/mL is given within parentheses)).

*Control, the total length of 3-day wheat seedling roots without inoculation by strains (34±6 mm).

[#]Strains bearing natural plasmids of naphthalene biodegradation.



Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода максимального правдоподобия на основе последовательности гена 16S рРНК штаммов *Pseudomonas* разного географического происхождения. Полуужирным шрифтом выделены изученные в данной работе штаммы PGPR р. *Pseudomonas*

A phylogenetic tree of the 16S rRNA gene nucleotide sequences created on the basis of the Maximum Likelihood method for *Pseudomonas* strains from various geographic origins. The PGPR *Pseudomonas* strains studied in this work are typed bold

Характеристика новых PGPR-штаммов р. *Pseudomonas*

Все штаммы *P. chlororaphis* (P4-1, IG1, Kr31, Or3-3) и штамм *P. putida* O9-10 проявляли наибольшую антагонистическую активность против грибных и бактериальных фитопатогенов (см. табл. 1). Штаммы *P. fluorescens* A1 и *P. lurida* P6-1 подавляли только рост грибов, а штамм *P. protegens* P4-2 – бактерий. Зоны ингибирования роста фитопатогенов при совместном выращивании со штаммами псевдомонад были сравнимы с зонами в положительных контролях (PGPR-штаммы из коллекции ИБФМ РАН).

В экстрактах КЖ новых штаммов-антагонистов с помощью ТСХ были обнаружены соединения феназинового ряда. Штаммы *P. chlororaphis* IG1, P4-1, Kr31, выделяющие в культуральную среду желто-оранжевые пигменты, синтезировали ФКК (Rf 0,8) и 2-оксифеназин (Rf 0,3). В культуральной среде трех штаммов обнаружено по одному из следующих соединений: у *P. fluorescens* A1 и IC7 – ФКК, у *P. chlororaphis* Or3-3 – ФКА (Rf 0,7). В КЖ штамма *P. putida* O9-10 обнаружены оба указанных соединения – ФКК и ФКА. По имеющимся литературным данным, у представителей вида *P. putida* способность продуцировать ФКА до настоящего времени не была обнаружена. Достаточно широкое распространение PGPR-свойств, таких как продукция соединений феназинового ряда, свидетельствует об их важном значении для ризосферных микроорганизмов; при этом отсутствие выраженной видоспецифичности этих признаков говорит об их распространении в микробных популяциях путем горизонтального генетического переноса. Антагонистические свойства бактерий р. *Pseudomonas* могут быть обусловлены также их свойством продуцировать цианид водорода, обладающий высокой проникающей способностью [29]. Все штаммы *P. chlororaphis* (P4-1, Or3-3, Kr31, IG1) и *P. putida* O9-10 помимо феназиновых антибиотиков выделяли также и цианид водорода. *P. protegens* P4-2, не синтезирующий феназиновые антибиотики и выделяющий цианид водорода, в большей степени подавлял рост бактерий, чем грибов (см. табл. 1).

Известно, что экзогенные ауксины, продуцируемые ризосферными бактериями, стимулируют рост и развитие растений [30]. Все исследуемые штаммы синтезировали индольные соединения, в том числе ИУК. Наибольшая концентрация ИУК (10,2–17,6 мкг/мл) обнаружена в КЖ пяти штаммов: *P. chlororaphis* P4-1, Or3-3, Kr31, IG1 и

P. putida P8-2. Следует отметить, что инокуляция семян пшеницы штаммами *P. chlororaphis* с повышенной продукцией ИУК (более 10 мкг/мл) не всегда обеспечивала в наших экспериментах стимуляцию роста корней трехсуточных проростков. Так, суммарная длина корней у проростков, инокулированных новыми штаммами *P. chlororaphis*, составляла 70–100% от контроля (неинокулированные проростки); у коллекционных штаммов *P. chlororaphis* BS1393, OV17 и 16Н эта величина была равна 100%, 128, 123% от контроля, соответственно (см. табл. 1).

Новые штаммы *P. chlororaphis* продуцируют оксипроизводные ФКК; штамм Or3-3 синтезирует ФКА, который более активно подавляет патогены, чем ФКК (см. табл. 1). Ранее было обнаружено, что ФКК ингибирует проростки растений [14]. Возможно, в наших экспериментах на развитие корней проростков пшеницы влияли не только концентрация бактериальных ауксинов (ИУК) и антибиотиков, но и природа феназиновых производных. Достоверное увеличение суммарной длины корней проростков на 10–20% по сравнению с контролем наблюдалось при инокуляции новыми штаммами *P. fluorescens* IC7, *P. putida* P8-2, *P. putida* O9-10, *P. brassicacearum* Kr21, *P. lurida* P6-1 (см. табл. 1, выделены полужирным шрифтом).

Положительное влияние PGPR-штаммов на рост растений связано не только с защитой от фитопатогенов, но и с улучшением питания растений. Поверхностно-активные вещества (ПАВ), продуцируемые почвенными микроорганизмами в ризосфере, делают более доступными для растений необходимые им вещества, в том числе, гидрофобные соединения [31]. У 4 штаммов – *P. chlororaphis* P4-1, IG1, *P. fluorescens* P2-1 и *P. protegens* P4-2 – обнаружена продукция ПАВ. При выращивании штаммов поверхностное натяжение КЖ понижалось в 1,8–2,5 раза относительно контроля (среда без бактерий), что косвенно свидетельствует о высокой концентрации ПАВ.

Многие ризосферные бактерии способствуют растворению малоподвижных форм фосфатов посредством органических кислот, образующихся при микробной утилизации сахаров [32]. Способность к растворению фосфатов является важной характеристикой бактерий группы PGPR. При скрининге бактерий было выявлено пять штаммов – *P. fluorescens* P2-1, *P. putida* O9-10, *P. protegens* P4-2, *P. lurida* P6-1 и *P. brassicacearum* Kr21, которые при росте на минеральной среде, содержащей гидроксипатит кальция, растворяли преципитат, образуя зоны просветления.

Эффективность биопрепаратов на основе живых микроорганизмов во многом зависит от способности штаммов активно колонизовать корни и поддерживать экологически значимую численность популяции в ризосфере. Инокуляция семян однодольных (пшеницы) и двудольных (горчицы) растений исследуемыми штаммами бактерий и выращивание растений в стерильных условиях позволили выявить восемь новых наиболее активных колонизаторов: *P. chlororaphis* P4-1, Kr31, Or3-3 и IG1, *P. fluorescens* IC7, *P. putida* O9-10, *P. protegens* P4-2, *P. brassicacearum* Kr21 (см. табл. 1). Эти штаммы заселяли ризосферу пшеницы и горчицы с высокой плотностью, порядка 10^8 – 10^9 КОЕ/г сырой массы корней, что сопоставимо с литературными данными, полученными для эффективных колонизаторов [33].

Важной характеристикой штаммов является наличие плазмид, контролирующих дополнительные свойства бактерий, такие как конкурентоспособность и жизнеспособность в определенных условиях окружающей среды. Ранее из ризосферы нефтезагрязненных почв были выделены плазмидосодержащие штаммы-деструкторы *P. chlororaphis* OV17 и *P. fluorescens* OV29 (коллекция ИБФМ) [34, 35]. У штаммов *P. fluorescens* IC7 и A1 обнаружены плазмиды размером около 80 тпн Р-9 группы несовместимости, контролирующие биodeградацию нафталина, фенантрена и салицилата (результаты не приведены). Эти штаммы представляют интерес при исследовании взаимодействия систем биodeградации ПАУ и биосинтеза вторичных метаболитов, так как нафталиндиоксигеназа, катализирующая первую стадию окисления нафталина, участвует не только в биodeградации ПАУ, но также в реакциях биосинтеза фитогормона ИУК [36].

Влияние PGPR-штаммов на рост растений в условиях искусственного фитопатогенного фона

Значительные потери урожая овощей как в защищенном, так и в открытом грунте связаны с поражением растений корневыми гнилями, вызываемыми грибами родов *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria* и *Pythium*. В условиях искусственного фитопатогенного фона (присутствие *R. solani*) были проведены микровегетационные эксперименты с растениями огурца, инокулированными штаммами *P. chlororaphis* Or3-3 и P4-1. Эти штаммы были выбраны для предпосевной обработки семян, поскольку они обладают комплексом

свойств, характерных для бактерий группы PGPR: проявляют высокую антагонистическую активность в отношении *R. solani* за счет продукции феназиновых антибиотиков и цианида водорода, эффективно колонизируют ризосферу растений и синтезируют ИУК; кроме того, *P. chlororaphis* P4-1 продуцирует ПАВ.

В данных условиях негативное влияние *R. solani* проявлялось в виде уменьшения массы корней и надземной части растений огурца на 12% и 22%, соответственно, по сравнению с растениями, выращенными в чистом грунте (табл. 2, естественный фон). В вариантах с чистым грунтом предпосевная обработка семян штаммом *P. chlororaphis* Or3-3 обеспечивала увеличение массы корней и надземной части на 17% и 30%, а штаммом *P. chlororaphis* P4-1 – на 8% и 14%, соответственно, по сравнению с неинокулированными растениями (см. табл. 2). В условиях фитопатогенного фона предпосевная обработка ризосферными штаммами обеспечивала не только защиту растений, но также небольшой прирост их массы по сравнению с контролем. Как видно из табл. 2, масса корней и надземной части растений, инокулированных *P. chlororaphis* Or3-3, увеличивалась примерно на 15%. Инокуляция проростков штаммом *P. chlororaphis* P4-1 обеспечивала более выраженную стимуляцию роста: масса корней и надземной части увеличивалась на 28 и 24%, соответственно (см. табл. 2). Следует отметить, что фитостимулирующее влияние ризосферных штаммов наблюдалось в следующих условиях: в результате предпосевной обработки путем однократного внесения бактерий, на фитопатогенном фоне и в начале вегетационного периода. Таким образом, штаммы *P. chlororaphis* Or3-3 и P4-1 могут быть использованы с целью создания биопрепаратов комплексного воздействия, предназначенных как для защиты сельскохозяйственных растений от грибных заболеваний, так и для улучшения питания и роста растений.

Исследования проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования и Уникальной научной установки ВКМ ИБФМ РАН. Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы Министерства образования и науки Российской Федерации “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (Соглашение № 14.613.21.0016 от 24 сентября 2014 г. “Новое поколение биопрепаратов на основе наноматериалов и ризосферных бактерий, стимулирующих рост растений (PGPR), для улучшения уро-

Влияние предпосевной обработки штаммами *P. chlororaphis* Or3-3 и P4-1 на развитие растений огурца (сорт “Изящный”) в условиях искусственного фитопатогенного фона, создаваемого *R. solani*

Influence of preseedling inoculation by *P. chlororaphis* Or3-3 and P4-1 strains on the development of cucumber plants (a cultivar “Izyashchnyi”) on the artificial phytopathogenic background of *R. solani*

Условия опыта	Корень		Надземная часть	
	Средняя масса, мг	Прирост/убыль массы, %	Средняя масса, мг	Прирост/убыль массы, %
<i>Естественный фон</i>				
Без инокуляции (контроль 1)	111 ± 8	100	1019 ± 100	100
Инокуляция <i>P. chlororaphis</i> Or3-3	130 ± 9	+17*	1331 ± 120	+30*
Инокуляция <i>P. chlororaphis</i> P4-1	120 ± 12	+8*	1158 ± 111	+14*
<i>Фитопатогенный фон</i>				
Без инокуляции (контроль 2)	98 ± 7	-12*	796 ± 45	-22*
Инокуляция <i>P. chlororaphis</i> Or3-3	114 ± 8	+16**	917 ± 70	+15**
Инокуляция <i>P. chlororaphis</i> P4-1	126 ± 10	+28**	986 ± 92	+24**

*Относительно контроля 1, in comparison with control 1

**Относительно контроля 2, in comparison with control 2.

жайности и питания сельскохозяйственных растений”) (Уникальный идентификатор научных исследований (проекта) RFMEFI61314X0016).

ЛИТЕРАТУРА

- Preston G.M. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, 2004, 359(1446), 907–918. doi: 10.1098/rstb.2003.1384
- Glick B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 1995, 41(2), 109–117. doi: 10.1139/m95-015
- Babalola O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.*, 2010, 32(11) 1559–1570. doi: 10.1007/s10529-010-0347-0
- Боронин А.М., Кочетков В.В. Эффективный биофунгицид для защиты растений. *АГРО XXI*, 2003, (1–6), 64–66. (Boronin A.M., and Kochetkov V.V. Effective Biofungicidal Agent for Plant Protection. *AGRO XXI*, 2003, (1–6), 64–66.)
- Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. Москва: Наука, 2005, 1–166. (Loginov O.N. Bacteria *Pseudomonas* and *Azotobacter* as subjects in agricultural biotechnology. Moscow: Nauka, 2005, 1–166.)
- Fravel D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2005, 43, 337–359. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924
- de Souza R., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.*, 2015, 38(4), 401–419. doi: 10.1590/S1415-475738420150053
- Gerhardt K.E., Huang X.-D., Glick B.R., Greenberg B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.*, 2009, 176(1), 20–30. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.09.014
- Siunova T.V., Anokhina T.O., Sizova O.I., et al. Ch. 17: Impact of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas* in phytoremediation process. In: Handbook of Phytoremediation [Ed. I.A. Golubev]. New York: Nova Science Publishers Inc., 2011, 551–572.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984, 5–479. (Maniatis T., Fritch E., and Sambrook J., Methods in Genetic Engineering: Molecular Cloning. Moscow: Mir (Translated into Russian) 1984, 5–479.)
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 1954, 44(2), 301–307.
- Hamdan H., Weller D.M., Thomashow L.S. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57(11), 3270–3277.

13. Ownley B.H., Weller D.M., Thomashow L.S. Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology*, 1992, 82(2), 178–184.
14. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990, 2–264. (Smirnov V.V., and Kiprianova E.A. Bacteria of *Pseudomonas* genus. Kiev: Naukova Dumka, 1990, 2–264.
15. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiol.*, 1951, 26(1). 192–195. doi: 10.1104/pp.26.1.192
16. Feigl F., Anger V. Replacement of benzidine by copper ethylacetate and tetra base as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. *Analyst* (London), 1966(1081), 282–284. doi: 10.1039/AN9669100282
17. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы: учебник для вузов [Под редакцией Ю.Г. Фролова]. Москва: Альянс, 2004, 3–464. (A course of colloid chemistry. Surface phenomena and disperse systems: A high school manual [Yu.G. Frolova, ed.]. Moscow: Alians, 2004, 3–464.)
18. Krasowiak R., Smalla K., Sokolov S., et al. PCR primers for detection and characterisation of IncP-9 plasmids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2002, 42(2), 217–225. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01011.x>
19. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, 10(3), 512–526. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
20. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, 33(7), 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
21. Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., et al. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(3), 180–188. doi: 10.1016/j.syapm.2010.10.005
22. Achouak S., Sutra L.L., T. Heulin, et al. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, 50(1), 9–18. doi: 10.1099/00207713-50-1-9
23. Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., et al. *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57(5), 979–985. doi: 10.1099/ijs.0.64793-0
24. Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can. J. Microbiol.*, 2001, 47(7), 642–652.
25. Selvakumar G., Joshi P., Suyal P., et al. *Pseudomonas lurida* M2RH3 (MTCC 9245), a psychrotolerant bacterium from the Uttarakhand Himalayas, solubilizes phosphate and promotes wheat seedling growth. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 27(5), 1129–1135.
26. Belimov A., Dodd I.C., Safronova V., Davies W.J. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *J. Exp. Bot.*, 2007, 58(6), 1485–1495. doi: 10.1093/jxb/erm010
27. Lee D.W., Jin-Sung Hong J.-S., Sun-Hyung Kim S.-H., et al. First report of *Pseudomonas lurida* causing bacterial leaf spot on *Miscanthus sinensis*. *J. Phytopathology*, 2014, 162(3), 195–200. doi: 10.1111/jph.12176
28. Beiki F., Busquets A., Gomila M., et al. New *Pseudomonas* spp. are pathogenic to citrus. *PLoS One*, 2016, 26(11), e0148796. doi: 10.1371/journal.pone.0148796
29. Blumer C., Haas D. Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 2000, 173(3), 170–177.
30. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2007, 31(4), 425–448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
31. Nielsen T.H., Sorensen J. Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(2), 861–868. doi: 10.1128/AEM.69.2.861-868.2003
32. Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus*, 2013, (2), 587. doi: 10.1186/2193-1801-2-587
33. Chin-A-Woeng T.F., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J., Bloemberg G.V. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2001, 14(8), 1006–1015. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.8.1006
34. Анохина Т.О., Кочетков В.В., Зеленкова Н.Ф., и др. Биодegradация фенантрена ризосферными плазмидоносителями бактериями рода *Pseudomonas* в модельных растительно-микробных ассоциациях. *Приклад. биохим. микробиол.*, 2004, 40(6), 654–658. (Anokhina T.O., Kochetkov V.V., Zelenkova N.F., et al. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* bacteria bearing rhizospheric plasmids in model plant-microbial association. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2004, 40(6), 568–572. doi: 10.1023/B:ABIM.0000046992.01220.35
35. Anokhina T.O., Volkova O.V., Puntus I.F., et al. Plant growth-promoting *Pseudomonas* bearing catabolic plasmids: naphthalene degradation and effect on plants. *Proc. Biochem.*, 2006, 41(12), 2417–2423. doi: 10.1016/j.procbio.2006.06.026
36. Mordukhova E.A., Sokolov S.L., Kochetkov V.V., et al. Involvement of naphthalene dioxygenase in indole-3-acetic acid biosynthesis by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, 190(2), 279–285. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09299.x

PGPR *Pseudomonas* Strains Promising for the Development of Bioformulations for Plant Protection and Stimulation

T.V. SIUNOVA^{1,*}, T.O. ANOKHINA^{1,**}, O.I. SIZOVA¹, S.L. SOKOLOV¹, O.I. SAZONOVA¹, V.V. KOCHETKOV¹, A.M. BORONIN¹, S.G. PATIL², A.B. CHUDHARI²

¹The Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russ. Acad. Sci., 142290, Pushchino, Moscovskaya Oblast Russia

²The School of Life Sciences, North Maharashtra University, Jalgaon – 425 001 (MS), India

*e-mail: siunova@mail.ru

Received September 19, 2016

Accepted October 17, 2016

Abstract—Twelve rhizosphere *Pseudomonas* strains capable of plant pathogens biocontrol and plant growth promoting have been isolated from the plant roots in various climatic zones of Russia. These strains produced a number of compounds, such as phenazine antibiotics, HCN, auxins, and surfactants. They were also able to solubilize phosphates and inhibit the growth of such phytopathogenic fungi and bacteria as *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, and *Pectobacterium carotovorum*. On the basis of 16S rRNA gene sequence analysis, the novel PGPR strains were assigned to six *Pseudomonas* species (*P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. protegens*, *P. lurida*, *P. brassicacearum*). Two *P. fluorescens* strains, IC7 and A1, isolated from the the rhizosphere of oil-contaminated soil, possess an IncP-9 PAH biodegradation plasmid about 80 kb in size. The studied in this work PGPR strains can be a potential source for the bioformulations for the plant growth protection and stimulation and can also be used in phytoremediation technologies.

Keywords: auxins, bioformulations, biological control of phytopathogens, PGPR *Pseudomonas*, phenazine antibiotics, rhizosphere bacteria, surfactants.

Acknowledgements – The investigation was performed using the equipment of the Center for Collective Use and Unique Research Set of VKM IBPM RAN. The work was carried out in the frames of the Ministry of Education and Science of RF Federal Target Program “Investigations and Design in the Prior Directions of the Russian Scientific-Technical Complex Development for 2014–2020” (Agreement 14.613.21.0016, September 24, 2014 “A Novel Generation of Biopreparations on the basis of Nanomaterials and Plant-Growth Stimulating Rhizosphere Bacteria (PGPR) to Improve Yield and Nutrition of Agricultural Plants”) (Unique Scientific Research (Project) Identifier RFMEFI61314X0016).

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-2-56-67