

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 632.3.01/08+582.475+571.53

СОСТАВ И ФИТОПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОРАЖЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВОДЯНКОЙ ДРЕВЕСИНЫ СОСНЫ СИБИРСКОЙ В ПРИБАЙКАЛЬЕ

И. Д. Гродницкая¹, В. А. Сенашова¹, М. Ю. Трусова²,
О. Э. Пашкеева¹, Ю. Н. Баранчиков¹

¹ Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

² Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: igrod@ksc.krasn.ru, vera0612@mail.ru, mtrusova@ibp.krasn.ru,
koeandkoe@mail.ru, baranchikov_yuri@yahoo.com

Поступила в редакцию 29.06.2022 г.

В настоящее время в темнохвойных лесах Прибайкалья распространено заболевание бактериальная водянка (bacterial wetwood), вызывающее ухудшение санитарного состояния древостоев и приводящее к гибели значительных лесных массивов. Несмотря на то что оно известно еще с начала прошлого века, вопрос о его истинном возбудителе до сих пор остается открытым. Полагают, что в развитии патогенеза могут принимать участие ассоциации различных эндофитных микроорганизмов. В связи с этим представляется актуальным исследование состава эндофитного комплекса микроорганизмов древесины больных водянкой лесных пород для установления типов взаимоотношений между эндофитами и проверки их способности инициировать патологический процесс у хвойных. Сделана попытка выявить основных представителей эндофитного микробиома «мокрой древесины» сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour), пораженной бактериальной водянкой, оценить их фитопатогенные свойства и типы взаимоотношений между ними. Исследования проводились в Слюдянском лесничестве Иркутской области. В работе использованы стандартные микробиологические и фитопатологические методы для выделения чистых культур бактерий и изучения их особенностей (в том числе вирулентности), а также молекулярно-генетические методы для идентификации бактерий. Из «мокрой древесины» пораженных бактериальной водянкой деревьев сосны кедровой сибирской впервые выделен комплекс чистых культур эндофитных микроорганизмов. Среди них к условно-патогенным штаммам относятся *Rouxiiella chamberiensis* и *Ewingella americana*, *Stenotrophomonas rhizophila* и *Bacillus pumilis*, проявляющие выраженные вирулентные свойства по отношению к индикаторным растениям и неоднозначно влияющие на рост и развитие семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). В эндофитном микробиоме пораженной древесины кедра кроме взаимодействия с растением отмечено и взаимное влияние бактерий. Выраженные антагонистические свойства проявляли бактерии р. *Bacillus*. В основном в эндофитном сообществе преобладали взаимоотношения симбиотического характера, с возможными синтрофными связями.

Ключевые слова: заболевание хвойных, бактериальная водянка, сосна сибирская кедровая, прокариотный микробиом, семена и проростки сосны обыкновенной, вирулентность штаммов, реакция сверхчувствительности.

DOI: 10.15372/SJFS20230107

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная водянка (bacterial wetwood) лесных пород – широко распространенное заболевание, протекающее обычно в хронической форме, практически постоянно присутствует в лесных массивах Сибири. Это системный сосудисто-паренхиматозный бактериоз, связанный с обводнением тканей древесины стволов, ветвей и рядом других специфических симптомов, поражает как лиственные, так и хвойные лесные, декоративные и садовые древесные породы, развивается в хронической и острой форме, приводя деревья к гибели (Гвоздяк, Яковлева, 1979; Ward, Pong, 1980; Рыбалко, Гукасян, 1986; Johnson, Riffle, 1986; Смирнов, Котов, 2005; Moorman, 2008; Шеховцов, 2009; Татаринцев, 2014; Tatarintsev, 2014).

По данным ФГУ «Рослесозащита», уже к 2009 г. на землях лесного фонда Российской Федерации бактериозы были выявлены в насаждениях 24 регионов на площади 37.8 тыс. га. Иркутская область, занимающая значительную часть территории Восточной Сибири, относится к числу наиболее многолесных субъектов Российской Федерации с площадью лесного фонда около 70 млн га, представленного преимущественно хвойными массивами. Кедрово-пихтовые леса составляют здесь 18 % от общей площади кедровых лесов страны, наиболее ценные из которых выделены в орехопромысловую зону (Справочные материалы..., 2018). Однако в последние годы ухудшение санитарного состояния темнохвойных лесов Прибайкалья вызывает серьезные опасения. В 2012 г. в Слюдянском, Усольском и Шелеховском лесничествах Иркутской области впервые было зафиксировано массовое усыхание высокопродуктивных кедровых сосен (*Pinus sibirica* Du Tour) и пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) с типичными признаками опасного инфекционного заболевания лесных пород – бактериальной водянки, очаг которого разрастался и к концу 2018 г. составил 3455 га (Бубнова, 2020). В настоящее время существенная по площади территория Слюдянского и Шелеховского лесничеств поражена бактериальной водянкой, которая быстро распространяется и ведет к гибели древостоев.

В разной степени леса повреждены почти по всей кедровой ленте России, протянувшейся по Хамар-Дабану и Саянам от Бурятии до Хакасии (Морозова, Сурдина, 2013; Гродницкая и др., 2018). По данным на 2018 г. площадь насаждений, поврежденных бактериальной водянкой на

Байкальской природной территории, составляла около 60 тыс. га, в том числе погибшие насаждения занимали 5.8 тыс. га (Воронин и др., 2013; Справочные материалы..., 2018). Болеют высокопродуктивные кедровники 150–200-летнего возраста. Кроме кедра (сосны сибирской) водянкой поражаются пихта сибирская, ель сибирская (*Picea obovata* Ledeb.), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) (Горовик и др., 2012; Черпаков, 2012; Kovaleva et al., 2015). Лесные массивы, где отмечено это заболевание, являются источником инфекции для соседствующих с ними лесов других регионов Сибири.

Важная роль в усыхании лесов Сибири отводится изменению климата. Многие авторы считают, что первопричиной усыхания является возрастание засушливости климата, частоты и интенсивности засух. Особую опасность представляет существенное снижение уровня атмосферного увлажнения этих лесов, приводящее к водному стрессу. В свою очередь, водный стресс у древесных растений способствует быстрому освоению их фитопатогенами и насекомыми-вредителями, синергизм указанных воздействий влечет за собой усыхание и гибель древостоев (Mattson, Naack, 1987; Naavik et al., 2015; Kharuk et al., 2017). Также среди возможных причин заражения кедровников бактериозом называют общее ослабление деревьев вследствие повреждения стволов травмирующими способами (околотами) добычи кедрового ореха.

Одним из признаков бактериальной водянки у хвойных является изменение окраски хвои – сначала она желтеет, затем становится оранжево-красной и сероватой, после чего опадает. Симптоматика бактериоза связана с обводнением ядровой и заболонной древесины стволов, с трещинами и раковыми ранами стволов и ветвей; для хвойных характерна также засмоленность пораженных тканей (Черпаков, 2012, 2017). Древесина стволов и ветвей пораженных деревьев мокрая, с характерным кислым запахом. На поперечном срезе стволов любого возраста видно мокрое ложное ядро, часто темное – «темный водослой», почти всегда с неровными более темными краями. В стволе деревьев образуется большое количество жидкости и газа. Под давлением газа происходит разрыв годичных колец древесины и коры. Деревья могут усохнуть быстро, в течение одной весны, или медленно – в течение 10 лет и более, при этом они обычно «сухостойшатся». Ослабленные бактериальной водянкой деревья заселяются стволовыми вредителями, в частности у сосны – шести-

зубчатым короедом (*Ips sexdentatus* (Börner)), у пихты – хвойным усачем (*Monochamus urusovi* (Fischer von Waldheim)), после чего окончательно усыхают (Исаев и др., 1988). Исключительную опасность для ослабленных пихтарников Прибайкалья представляет уссурийский полиграф (*Polygraphus proximus* Blandford) – дальневосточный короед-инвайдер, стремительно расширяющий свой вторичный ареал в Сибири (Уссурийский полиграф..., 2015) и вместе с ассоциированными с ним фитопатогенами начавший осваивать пихту на юге Хамар-Дабана (Быстров, Антонов, 2019; Bystrov, Antonov, 2019; Пашенова и др., 2019).

На фоне слабой изученности лесных бактерий бактериальная водянка лесных пород – пример недооценки лесным хозяйством бактериальных инфекций в лесных экосистемах. Несмотря на то что по степени лесохозяйственной вредности бактериальную водянку относят к бактериозу № 1 в лесах России, вопрос об истинном возбудителе этого заболевания до сих пор остается открытым как в России, так и за рубежом (Shink et al., 1981; Bull et al., 2010; Alizadeh et al., 2017). Из мокрой древесины и потеков слизи выделяют представителей родов *Erwinia*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter* (Гвоздяк, Яковлева, 1979), в других наборах – *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Acinetobacter* и *Enterobacter cloacae* (*Erwinia nimipressuralis*) (Shink et al., 1981). В самых разных сочетаниях упоминаются *Corynebacterium* spp., *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Methanobacter arbo-philicum*, *Corynebacterium humiferum*, *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*), *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus* spp., *Serratia fonica*, *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Edwardsiella* spp. (Johnson, Riffle, 1986; Moorman, 2008; Черпаков, 2017).

Различные ассоциации бактерий часто упоминаются в «привязке» к конкретным породам. Например, согласно новейшему исследованию бактериальной водянки ильмовых пород в Иране, в качестве наиболее вероятных возбудителей заболевания у вязов (*Ulmus* L.) названы 4 вида бактерий – *Brevundimonas bullata*, *Paracoccus alcaliphilus*, *Par. marcusii*, *Luteimonas aestuarii* (Alizadeh et al., 2017).

Подобный подход позволил предполагать комплексную причину бактериальной водянки древесных пород. Однако лишь некоторые из приведенных бактерий (например, *Erwinia*

nimipressuralis и *Corynebacterium humiferum*) имеют фитопатогенные свойства, доказанные экспериментально. Основная же масса представляет конгломерат большей частью сапротрофных видов, влияние которых на патогенез заболевания весьма спорно. Возможно даже, что некоторые микроорганизмы, наоборот, благотворно влияют на рост и развитие растений, несмотря на их присутствие в пораженных тканях. Таким образом, главный вопрос лесопатологической диагностики – какой вид (виды) участвует в патологическом процессе «бактериальная водянка» у древесных растений – на сегодняшний день требует более глубокого изучения. Некоторые исследователи считают, что в развитии патогенеза могут принимать участие ассоциации различных микроорганизмов-эндофитов, в том числе и непатогенных (Nair, Padmavathy, 2014; Черпаков, 2017).

В информационном потоке по данной проблеме есть общая особенность – обычно изучают лесохозяйственные аспекты бактериальной водянки, однако фитобактериологические исследования практически отсутствуют, исследователи не работают с выделенными чистыми культурами бактерий и, следовательно, не отражают бактериологическую природу симптомов, особенности патогенеза, доказательность истинности патогенов.

В связи с этим представляется актуальным исследование состава комплекса микроорганизмов древесины больных водянкой лесных пород для установления типов взаимоотношений между ними и проверки их возможности инициации патологического процесса у хвойных.

В настоящей работе сделана попытка выявить основных представителей прокариотного микробиома «мокрой древесины» сосны кедровой сибирской, пораженной бактериальной водянкой, оценить их фитопатогенные свойства и типы взаимоотношений между ними.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты и методы исследования. Объектами исследований были микроорганизмы, выделенные из древесины (кernов и спилов) сосны кедровой сибирской с «мокрым ядром» (рис. 1, а). Образцы древесины и kernов отбирали в августе 2017 г. в Слюдянском лесничестве Иркутской области в 200-летних кедрово-пихтовых древостоях, имеющих классические признаки поражения бактериальной водянкой.

Получение накопительных культур бактерий и изучение их морфологических особенностей. В лабораторных условиях получали накопительные культуры бактерий. Для этого небольшие кусочки древесины с образцов спилов (8 шт.) и кернов (10 шт.) пораженных «водянкой» кедров помещали в пробирки с картофельным бульоном (КБ) и со стерильной водой для контроля (рис. 1, б). Пробирки инкубировали в течение 1.5–2 нед в термостате при температуре 25 °С.

Для изучения выделившихся изолятов бактерий из накопительной питательной среды делали посев на чашки Петри с картофельным агаром (КА). Посевы инкубировали в термостате при температуре 27 °С в течение 3–7 дней.

Методом пересевов выделяли чистые культуры изолятов бактерий, которые затем отсеивали в пробирки со скошенной агаризированной средой (КА) и помещали в холодильник для дальнейших опытов (Практикум..., 2005).

Форму и размеры клеток изучали на односуточных культурах, выращенных на КА, с помощью фазово-контрастного микроскопа «ЛОМО Микмед-2». Культуральные свойства эндофитных бактерий изучали на твердых и жидких питательных средах (Практикум..., 2005), характер движения клеток, их внешнюю морфологию

и принадлежность к грамотрицательным и грамположительным формам определяли в односуточных культурах (Gregersen, 1978).

Молекулярно-генетические исследования. Идентификацию бактерий до их видовой принадлежности определяли с помощью молекулярно-генетических методов.

Выделение ДНК. Выделение бактериальной геномной ДНК чистых культур изолятов проводили с использованием набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit компании Axygen (производства КНР). Полученную ДНК амплифицировали с использованием специфических праймеров к последовательности 16S рРНК.

Проведение ПЦР. Фрагменты гена 16S рРНК длиной 586 п. н. амплифицировали из бактериальной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными праймерами GC-341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', на 5'-конце присоединен "GC-clamp" 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C-3') и 926R (5'-CCG TCA ATT CA/CT TTG AGT TT-3'). Условия амплификации приведены в (Колмакова, Трусова, 2011; Kolmakova, Trusova, 2011). Анализ ПЦР-продуктов проводили при помощи электрофореза в 1.2%-м агарозном геле. Продукты ПЦР экстрагировали от белков хлороформом, пересаживали этанолом и

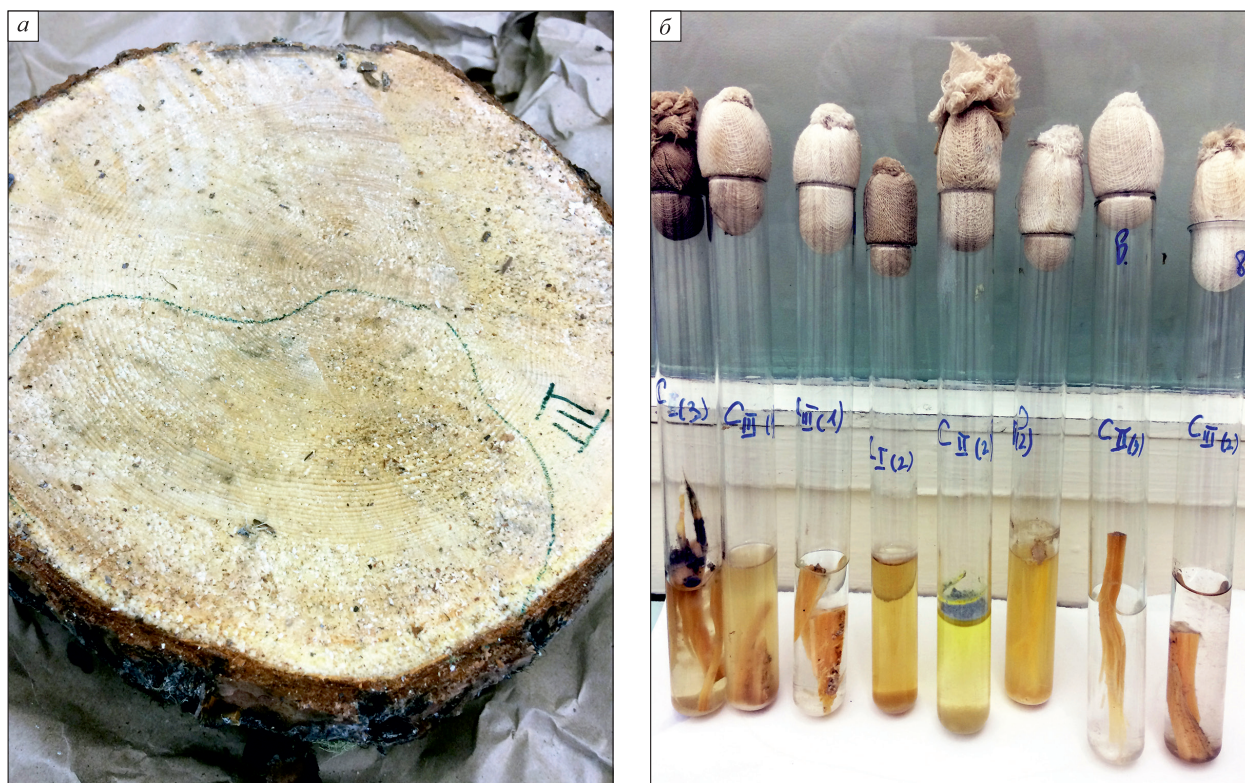


Рис. 1. Спил ствола сосны сибирской с «мокрым ядром» (а) и накопительные культуры из спилов и кернов стволов пораженных деревьев (б).

использовали 800 нг полученной ДНК для анализа методом ДГГЭ.

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ). ДГГЭ выполняли на приборе DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, США) в 6 % полиакриламидном геле с градиентом денатурирующего фактора от 30 до 70 % (100%-й денатурирующий фактор представлял собой смесь 7М раствора мочевины и 40%-го деионизованного формамида). Электрофорез проводили при 60 °С в однократном ТАЕ-буфере (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота и 1 мМ ЭДТА) при напряжении 100 В в течение 16 ч. По окончании электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и получали цифровые изображения в проходящем УФ свете (302 нм) на приборе AlphaImager (Alpha Innotech Corp., США).

Элюция и секвенирование ДНК. Для выделения ДНК из полиакриламидного геля применяли метод элюции, максимально сохраняющий качество и количество ДНК для последующей реамплификации. Для этого кусочки геля, содержащие ДНК, заливали 100 мкл стерильного ТЕ-буфера (10 мМ Tris-HCl pH 8.0, 2 мМ ЭДТА), инкубировали 15 мин при 37 °С для отмывки геля от возможных загрязнений и излишков мочевины (ингибитор ПЦР), затем буфер удаляли, а фрагмент геля заливали стерильным двукратным буфером для ДНК-полимеразы и инкубировали 90 мин при 94 °С. Проводили реамплификацию ДНК, затем ПЦР-продукты очищали набором QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Все вышеуказанные исследования проводили в лаборатории экспериментальной гидроэкологии Института биофизики СО РАН.

Секвенирование ДНК. Секвенирование ДНК и идентификация изолятов проведены по методу Сэнгера в Центре коллективного пользования (ЦКП) «Геномика» ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск).

Определение вирулентных свойств бактерий по реакции сверхчувствительности на индикаторном растении. Патогенные свойства бактерий по отношению к определенному кругу хозяев изучали с использованием индикаторных растений. Симптомы поражения (некрозы и др.) индикаторных растений (фасоль (*Phaseolus* L.), табак (*Nicotiana* L.)) могут вызывать только фитопатогенные бактерии, демонстрируя на листьях реакцию сверхчувствительности (СР) (Klement, 1963; Кирай и др., 1974; Методы..., 1974; Основные методы..., 1974; Гвоздяк и др., 2009).

Для быстрого определения вирулентности выделенных изолятов бактерий использовали метод инъекций-инфильтраций. Индикаторным растением служила фасоль. Бактериальную суспензию (10^7 – 10^8 кл/мл) вводили тонкой иглой в межклеточное пространство листьев. В качестве контроля в листья были сделаны инъекции стерильной водой. Водная фаза суспензии после введения испарялась. В каждый лист было сделано по 3 инъекции суспензии одного штамма бактерий. Кроме этого, использовали метод заражения растений с предварительным поранением: на нижнюю поверхность листовой пластинки наносили по капле бактериальной взвеси исследуемых бактерий (титр 10^7 кл/мл). Затем на месте этой капли делали несколько легких уколов шприцем. Если в инокуляте содержались фитопатогенные бактерии, то через 24–48 ч после инъекции инфицированные участки отмирали, а через 3–4 дня становились сухими и белыми (Klement, 1963; Кирай и др., 1974; Методы..., 1974; Основные методы..., 1974).

Влияние метаболитов бактерий на рост и развитие семян сосны обыкновенной. *Вегетационные эксперименты (in vitro).* Из литературы известно, что фитопатогенные бактерии способны выделять не только токсины, но также и фитогормоны, стимулирующие рост растений. В ходе биологических испытаний на растениях было показано, что микробные фитогормоны оказывают благоприятное воздействие при бактерилизации семян растений культурами и/или суспензиями микроорганизмов-продуцентов. При этом ускорение роста растений коррелировало с увеличением колонизирующей способности бактерий, а также с количеством образующих ими фитогормонов (Яковлева и др., 2002; Yakovleva et al., 2002; Цавкелова и др., 2006; Tsavkelova et al., 2006).

Для подтверждения или опровержения данного факта нами проведены лабораторные исследования с семенами сосны обыкновенной. Поскольку виды сосны обыкновенной и сибирской таксономически близки, то в экспериментах мы пользовались семенами сосны обыкновенной. Кроме того, из-за своей плотной оболочки семена сосны сибирской не пригодны для кратковременных лабораторных опытов.

В экспериментах использовали выделенные из «мокрой древесины» сосны сибирской штаммы бактерий, которым для удобства работы были присвоены номера: 1 – *Stenotrophomonas rhizophila*, 2 – *Brevibacterium frigoritolerans*, 3 – *Ewingella americana*, 4 –

Rouxiella chamberiensis, 5 – *Bacillus pumilus*, 6 – *Paenibacillus taichungensis*, 7 – *Pseudomonas azotoformans*, 8 – *Ps. paralactis*, 9 – *Bac. amyloliquefaciens*.

Вегетационный эксперимент № 1. Для оценки влияния бактерий на рост и развитие хвойных проведен вегетационный опыт в чашках Петри. Преимуществом данного метода является создание максимально однородных условий для всех вариантов опыта и исключение взаимодействий испытываемых штаммов с посторонней микробиотой, что могло бы отразиться на результатах эксперимента.

Семена сосны обыкновенной 2-го класса качества были предварительно замочены на 30 мин в бактерицидно-фунгицидном растворе (действующее вещество – флудиоксонил, 5 г/л), а затем на 3 ч – в суспензиях (10^7 кл / мл) шести (1–6) изолятов бактерий, выделенных из древесины сосны сибирской. В качестве контроля использовали семена, замоченные на то же время в стерильной воде. Семена проращивали в стерильных влажных камерах. В предварительно подготовленные влажные камеры (стерильные чашки Петри с фильтровальной бумагой на дне, смоченной стерильной водой) раскладывали по 25 семян в трехкратной повторности и следили за динамикой их прорастания в течение 14 дней, периодически проводя учет количества и качества проростков.

Вегетационный эксперимент № 2. Для исследования влияния почвенного микробного сообщества на активность и выживаемость бактерий, а также на прорастание семян сосны обыкновенной, в пластиковых кюветах (с почвой) в течение 30 дней проводили вегетационный эксперимент *in vitro*. Это позволило наблюдать в лабораторных условиях всхожесть семян и развитие проростков в более естественной для них почвенной среде. В экспериментах использовали садово-парковую почву, которую предварительно стерилизовали при 180 °C в течение 3 ч для того, чтобы удалить из нее споры микробов и некоторых групп бактерий.

Перед посевом в почву семена сосны обыкновенной были предварительно замочены на 4 ч в 0.05%-м растворе KMnO_4 , а затем на 3 ч – в суспензиях (10^7 кл / мл) шести (1–6) изолятов бактерий, выделенных из пораженной водянкой древесины сосны сибирской. В качестве контроля использовали семена, замоченные на то же время в стерильной воде. Каждый из 7 вариантов эксперимента (6 опыт + 1 контроль) проводили в трех повторностях, в каждой повторности

использовали по 50 семян сосны. Обработанные микроорганизмами семена сосны и контрольные образцы высевали в две посевные строки в пластиковые кюветы с почвой.

Учитывали всхожесть семян и развитие проростков: вели периодический подсчет числа проростков на протяжении всего опыта; по окончании эксперимента оценивали морфометрические характеристики проростков (длину корня, стебля и мутовки).

Определение типов взаимоотношений между бактериями, выделенными из пораженных водянкой хвойных, оценивали методами подсева к агаровым блочкам (Егоров, 1965). Опыты проводили в чашках Петри с картофельным агаром (КА). На 3-й и 5-й дни инкубации фиксировали наличие зоны отсутствия или задержки роста с замером ее диаметра. В качестве тест-культур использовали 9 изолятов выделенных бактерий (№ 1–9).

Статистический анализ. Результаты, полученные в экспериментах *in vitro* (анализ количества и морфометрических показателей проростков сосны), обрабатывали с использованием программы Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Качественные характеристики выделенных изолятов бактерий. Из накопительных культур образцов кернов и спилов сосны сибирской, поражённой бактериальной водянкой, выделены 25 чистых культур типичных бактерий и геномная ДНК доминантных бактерий, проведены амплификация и секвенирование гена 16S рРНК (рис. 2).

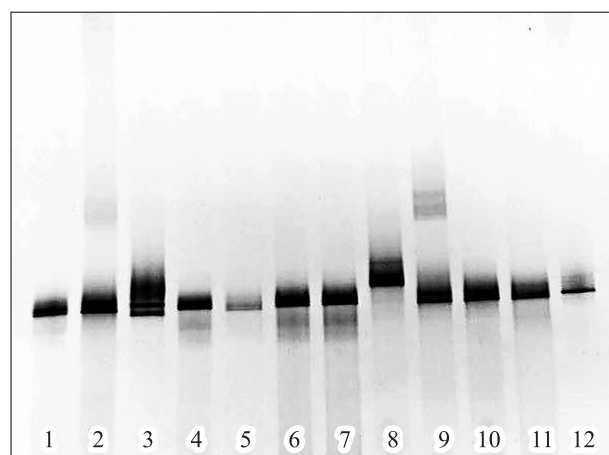


Рис. 2. Выделение доминантных представителей бактериальных культур (1–12) методом ДГГЭ с ампликонами гена 16S рРНК.

Таблица 1. Морфологическая характеристика идентифицированных штаммов бактерий, выделенных из стволов сосны сибирской, пораженной бактериальной водянкой

Штамм	Размеры клеток, мкм	Описание клеток. Грампринадлежность
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0.5 × 1.7	Короткие палочки, спор не образуют. Подвижные. Грам-отрицательные (Гр-)
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	1.2 × 3.0	Палочковидные бактерии, располагаются одиночно или в парах, часто V-образно, т. е. под углом друг к другу, или собираются в цепочки. Спор не образуют, неподвижные. Грамположительные (Гр+)
<i>Ewingella americana</i>	0.6 × 1.6	Короткие палочковидные бактерии, неспорообразующие. (Гр-)
<i>Rouxiella chamberiensis</i>	0.6 × 1.7	
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	0.9 × 3.0	Вегетативные клетки представляют собой относительно длинные тонкие палочки. Образуют эндоспоры, не превышающие размер клетки. (Гр+)
<i>Bacillus pumilus</i>	0.9 × 3.6	
<i>Bac. amyloliquefaciens</i>		
<i>Pseudomonas azotoformans</i> / <i>fluorescens</i>	0.6 × 3.0	Длинные тонкие палочки. Подвижные, аспорогенные. (Гр-)
<i>Pseudomonas paralactis</i>	0.5 × 2.0	Прямые палочковидные бактерии, относительно небольшие для представителей данного рода. Подвижные, спор и капсул не образуют. (Гр-)

Согласно результатам секвенирования по Сэнгеру, идентифицированы следующие бактерии: *Bacillus pumilus*, *Bac. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus taichungensis*, *Rouxiella chamberiensis*, *Ewingella americana*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Pseudomonas azotoformans*, *Ps. paralactis*,

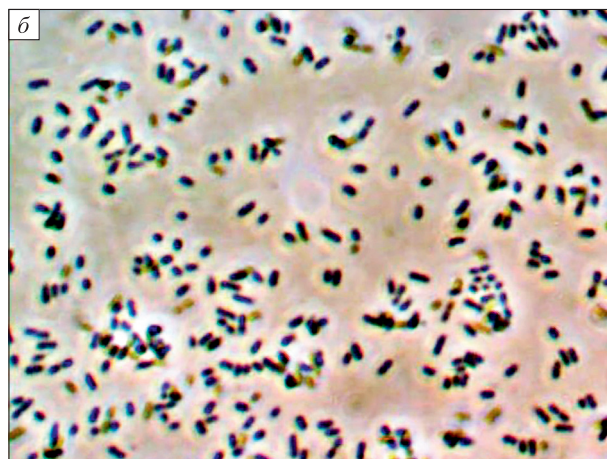
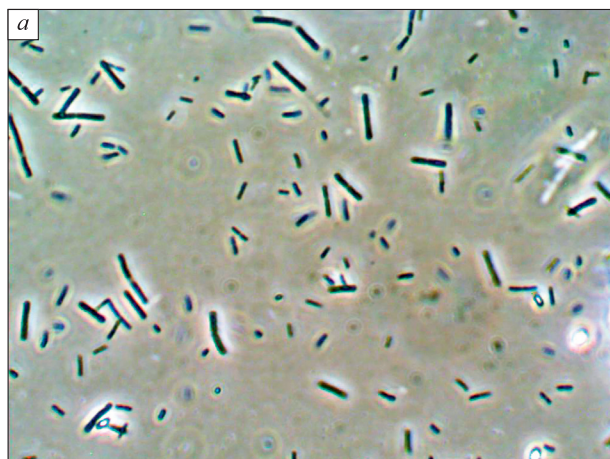
Проведенные тесты показали, что идентифицированные бактерии являются оксидазоотрицательными, кроме представителей р. *Pseudomonas*. К грамположительным относятся роды *Brevibacterium*, *Bacillus* и *Paenibacillus*; представители родов *Rouxiella*, *Ewingella*., *Stenotrophomonas* и *Pseudomonas* – грамотрицательные. Результаты фазово-контрастной микроскопии, проведенной для изучения морфологических особенностей выделенных штаммов, представлены в табл. 1 и на рис. 3.

Краткое описание выделенных бактерий.

В литературе немало сведений, что бактерии родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* могут оказывать на растения различные воздействия, проявлять как ростстимулирующие (Боронин, 1998; Яковлева и др., 2002; Yakovleva et al., 2002), так и фитопатогенные свойства (Гвоздяк, Яковлева, 1979; Ryan et al., 2009).

Представители р. *Pseudomonas* – наиболее распространенные и вредоносные фитопатогенные микроорганизмы, поражающие широкий круг сельскохозяйственных, лесных и декоративных культур.

В то же время некоторые штаммы (например *Pseudomonas putida*, *Ps. fluorescens*, *Ps. aureofaciens* (*chlororaphis*) и др.) относятся к группе бактерий, обладающих рядом полезных для растений свойств – PGPR (Plant Growth-

**Рис. 3.** Бактерии *Bacillus pumilus* (а) и *Ewingella americana* (б), ув. 100.

Promoting Rhizobacteria – ризобактерии, способствующие росту растений), и являются потенциальными объектами агробиотехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов (Боронин, 1998; Kuan et al., 2016). Вид *Stenotrophomonas rhizophila* – типичный представитель ризосферы и эндосферы – может населять все части растений. Ряд штаммов представляют высокий биотехнологический интерес как стимуляторы роста растений, особенно в засоленных почвах. *St. rhizophila* производит осмозащитные вещества и обеспечивает защиту ризосферы растений от бактериальных и грибных инфекций. *St. rhizophila* также образует ассоциации с несколькими другими почвенными бактериями, которые участвуют в деградации лигноцеллюлозы (Ryan et al., 2009; Schmidt et al., 2012).

Род *Brevibacterium* относится к группе коринеформных бактерий (тип Actinobacteria), которые играют важную роль в почвенных экосистемах, некоторые из них живут в симбиозе с растениями. У стимулирующих рост растений бактерий из рода *Brevibacterium* обнаружена способность синтезировать абсцизовую кислоту и влиять на ее уровень в растениях. Более 30 видов бактерий-эндофитов, куда входят представители рода *Brevibacterium*, могут служить в качестве основы биофунгицидов (Недорезков, 2003).

Представители семейства Enterobacteriaceae (Yersiniaceae) *Rouxiella chamberiensis* и *Ewingella americana* долгое время считались возбудителями заболеваний человека (Le Fleche-Matéos et al., 2015). Недавние исследования показали, что бактерии *Ewingella americana* могут также вызывать бактериозы лука и тюльпана (Stoyanova et al., 2012).

Большой интерес представляют штаммы *Bacillus pumilus* и *Bac. amyloliquefaciens*, которые потенциально могут использоваться как стимуляторы роста растений (Bashan et al., 2010; Kuan et al., 2016). Активно изучаются антагонистические свойства разных штаммов *Bac. pumilus* и *Bac. amyloliquefaciens* по отношению к фитопатогенным грибам и возбудителям различных бактериозов растений (Ерофеев, Чеботарь, 2016).

Однако на территории Беларуси обнаружены и фитопатогенные штаммы *Bac. pumilus*. Так, за последние годы выделены и идентифицированы более 30 штаммов *B. pumilus* из пораженных клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.), огурцов (*Cucumis* L.), томатов (*Sol. lycopersicum* L.),

фасоли (Bassimba et al., 2009), сосны обыкновенной (Горовик и др., 2012; Kovaleva et al., 2015). Введение в различные ткани сосны обыкновенной клеток *Bac. pumilus* P10 приводило к развитию явных признаков заболевания. Наблюдались такие симптомы, как деформация и некроз стеблей, некроз и хлороз хвои (Горовик и др., 2012; Kovaleva et al., 2015).

Представители рода *Paenibacillus* обитают в почве, ризосфере растений, есть эндофитные представители, колонизирующие растительные ткани (Ulrich et al., 2008). Ризобактерии этого рода могут способствовать росту растений и повышению их индуцированной системной устойчивости против различных экологических стрессов. Среди представителей рода обнаружены культуры (*P. azotofixans*, *P. polymyxa*) с высокой антибиотической активностью в отношении фитопатогенов (Zhou et al., 2008).

Реакция растений на заражение бактериями. Ответная реакция сверхчувствительности (СЧ) фасоли на заражение бактериальными культурами. Реакция гиперчувствительности, проявляющаяся в локальной гибели клеток в месте инокуляции бактерий, развивается у растений, не являющихся специфическими хозяевами для тестируемого фитопатогена. Локальная гибель клеток индуцируется самим растением в ответ на распознавание специфических белков фитопатогенных бактерий и является защитной реакцией (Горовик и др., 2012).

Проверка выделенных изолятов бактерий на реакцию сверхчувствительности к ним индикаторного растения показала, что при инокуляции листьев фасоли бактериальными суспензиями родов *Bacillus* и *Paenibacillus* отмечено появление незначительных точечных повреждений по месту уколов (рис. 4, б, в), которые видны по сравнению с контролем (рис. 4, а).

На листьях, инокулированных суспензиями бактерий родов *Rouxiella* и *Brevibacterium*, наблюдали появление более обширных локальных некрозов, что свидетельствует о развитии выраженной СЧ-реакции под воздействием этих бактерий (рис. 4, г, д). На 10-й день после заражения фасоли суспензиями бактерий *Ewingella americana* и *Stenotrophomonas rhizophila* наблюдали увядание и гибель листьев в результате нарушения ксилемного тока и поступления питательных веществ. Это может свидетельствовать о проявлении бактериями патогенных свойств в отношении растений фасоли (рис. 4, е, ж), способности вызывать бактериозы.

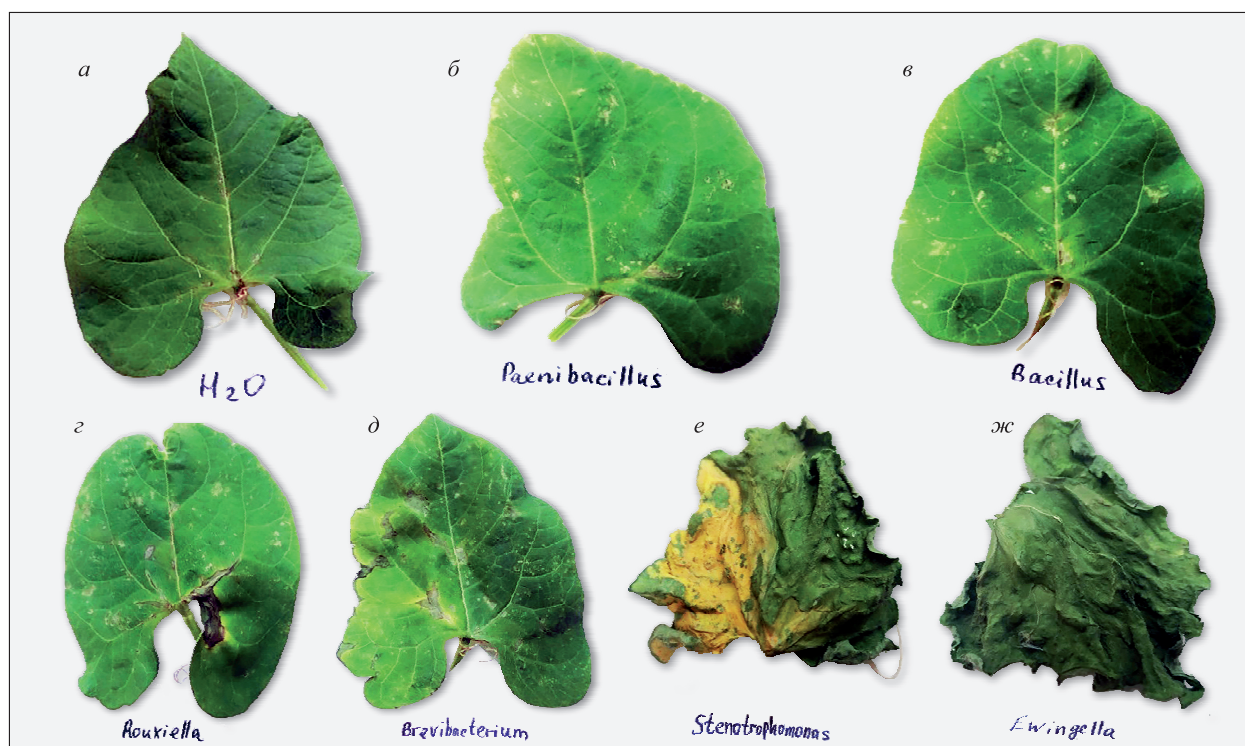


Рис. 4. Листья фасоли через 10 сут после инфицирования.

а – стерильная вода (контроль); б – *Bacillus pumilus*; в – *Paenibacillus taichungensis*; г – *Rouxiella chamberiensis*; д – *Brevibacterium frigoritolerans*; е – *Stenotrophomonas rhizophila*; ж – *Ewingella americana*.

Таким образом, обработка всеми штаммами бактерий вызвала реакцию сверхчувствительности (разной степени выраженности) на листьях фасоли, при этом наибольшую вирулентность проявили бактерии *Ewingella americana* и *Stenotrophomonas rhizophila* – они инициировали бактериоз.

Влияние выделенных бактерий на рост и развитие семян и сохранность проростков сосны обыкновенной в эксперименте *in vitro*. В вегетационном опыте № 1 (14 дней) установлено, что стабильно ингибирующее влияние на развитие семян оказывали бактерии *Ewingella americana* – через 14 дней количество проросших семян в этом варианте было меньше на 16 % по сравнению с контролем. В варианте с *Rouxiella chamberiensis* также отмечено уменьшение количества проростков (на 10 %). Стимулировали рост проростков на протяжении всего эксперимента, по сравнению с контролем, бактерии родов *Bacillus* (на 22 %), *Brevibacterium* (на 16 %) и *Paenibacillus* (на 14 %). Обработка семян бактериями *Stenotrophomonas rhizophila* незначительно повышала скорость прорастания семян на протяжении эксперимента (до 5 %), однако к концу 2-й недели сохранность проростков в этом варианте была несколько ниже, чем в контроле.

Анализ морфометрических данных проростков показал, что статистически значимых различий размеров надземной части (стебелек и мутовка) проростков между контролем и опытом выявлено не было. Достоверное ($p < 0.05$) уменьшение длины корешков по отношению к контролю отмечено в вариантах обработки бактериями родов *Ewingella* и *Paenibacillus* (на 42 и 26 % соответственно). При обработке семян бактериями родов *Rouxiella* и *Bacillus* также наблюдали уменьшение длины корней проростков на 10–17 %.

В вегетационном опыте № 2 (31 день) выявлено, что внесенные при посеве в почву с семенами бактерии оказывали разное влияние на рост и развитие семян сосны обыкновенной. Установлено, что обработка семян *Bacillus amyloliquefaciens* увеличивала всхожесть на 21 %, *Brevibacterium frigoritolerans* – на 12 %, *Bac. pumilus* и *Paenibacillus taichungensis* – на 9–10 %, а в варианте *Ewingella americana* отмечено уменьшение количества проростков на 15.1 % по сравнению с контролем.

Морфометрический анализ проростков сосны обыкновенной показал, что все исследованные бактерии, кроме *Ewingella americana*, достоверно ($p < 0.05$) увеличивали длину ство-

Таблица 2. Морфометрические показатели проростков сосны обыкновенной

Вариант обработки семян	Длина, мм		
	корешка	стволика	мутовки
Контроль	24.8 ± 1.3	24.9 ± 0.9	13.3 ± 0.5
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	23.9 ± 1.3	29.3 ± 1.2	14.1 ± 0.6
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	24.9 ± 1.4	28.9 ± 1.4	13.1 ± 0.7
<i>Ewingella americana</i>	20.5 ± 0.9	26.5 ± 1.2	14.5 ± 0.7
<i>Bacillus pumilus</i>	25.6 ± 1.4	32.8 ± 0.9	16.0 ± 0.5
<i>Rouxiella chamberiensis</i>	24.3 ± 1.5	33.3 ± 1.4	15.7 ± 0.8
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	17.5 ± 1.6	30.2 ± 1.1	13.3 ± 0.5
<i>Bac. amyloliquefaciens</i>	27.8 ± 1.5	33.8 ± 1.2	16.8 ± 0.8

Примечание. Выделенные жирным шрифтом показатели достоверно отличаются от контроля ($p < 0.05$).

лика по сравнению с контролем, при этом бактерии родов *Bacillus* и *Rouxiella chamberiensis* достоверно увеличивали длину стволика (на 31.7 и 20.3 %) и мутовки (на 34 и 18 %), бациллы увеличивали длину корешка (на 3 и 12 %). Достоверное уменьшение длины корня отмечено в вариантах обработки *Paenibacillus taichungensis* (на 29.4 %) и *Ewingella americana* (на 17.3 %). Данные морфометрического анализа представлены в табл. 2.

При визуальном осмотре на проростках не обнаружено каких-либо признаков поражения (усыхания, мацерации растительной ткани и др.).

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

Типы взаимоотношений между бактериями. Микроорганизмы, выделенные из пораженной древесины кедровых сосен, составляют часть эндофитного микробиома – сложно организованной системы (ассоциации), в которой кроме взаимодействия с растением испытывают множество различных взаимных влияний – от конкуренции до кооперации (Cankar et al., 2005; Ferreira et al., 2008; Nair, Padmavathy, 2014; Endophytes..., 2018). Антагонистические взаимодействия микроорганизмов являются одним из возможных вариантов межмикробных связей в микробиоценозах и существенно влияют на сукцессионные процессы в микробных поливидовых сообществах, которые могут определять доминирование одних ассоциантов над другими. Антагонистическая активность бактерий

определяет их выживание при взаимодействии в микробных ассоциациях (Масленникова и др., 2013; Чеботарь и др., 2015; Chebotar' et al., 2015).

Поскольку типы взаимоотношений между представителями микробного сообщества в пораженных водянкой хвойных ранее никем не выяснялись, мы провели ряд исследований на установление взаимоотношений между выделенными штаммами бактерий. Опыты по изучению чувствительности бактерий к выделяемым ими веществам показали, что некоторые штаммы обладали ярко выраженной антагонистической активностью по отношению друг к другу (рис. 5, а).

Так, штамм *Bacillus amyloliquefaciens* проявлял активные антагонистические свойства по отношению ко всем тест-культурам, он в разной степени сдерживал рост большинства исследуемых штаммов (рис. 5, б). Метаболиты *Bac. amyloliquefaciens* сильнее всего подавляли рост бактерий *Brevibacterium frigoritolerans* и *Rouxiella chamberiensis* с образованием зон отсутствия роста в 6–8 и 3–5 мм соответственно. Зона отсутствия роста в 3 мм наблюдалась у штамма *Pseudomonas paralactis*. По отношению к бактериям родов *Bacillus*, *Ewingella* и *Paenibacillus* отмечены незначительные зоны сдерживания роста (0.3–2 мм) (рис. 5, табл. 3), что, на наш взгляд, нельзя считать признаком антагонистических взаимоотношений между этими микроорганизмами, однако приведенные данные могут свидетельствовать о наличии потенциального антагонизма, который может проявиться при изменении условий роста бактерий (Гвоздяк и др., 2009).

Кроме того, антагонистическая активность разной степени выраженности была выявлена еще у 4 из 9 исследованных штаммов. Выраженными антагонистическими свойствами

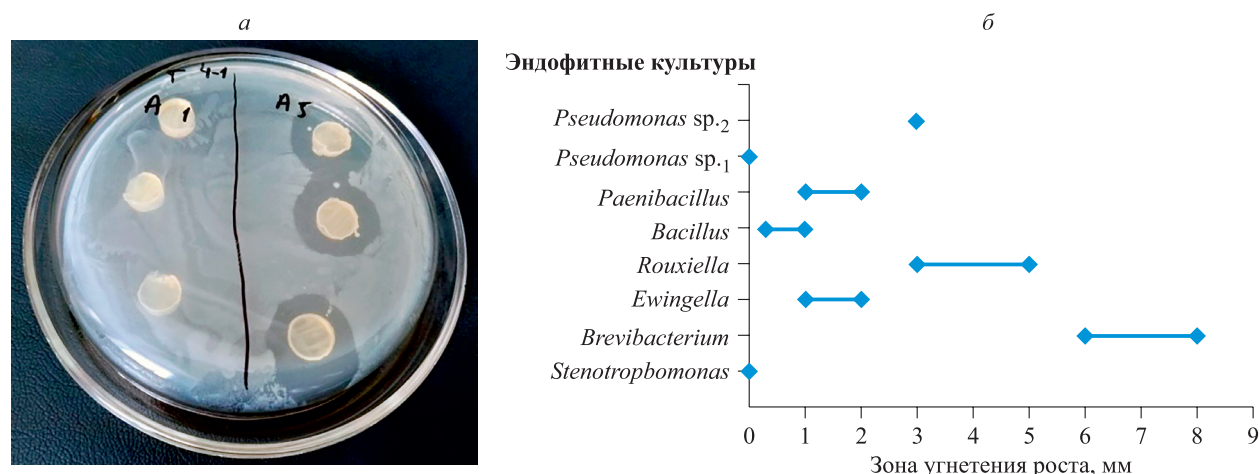


Рис. 5. Проявление антагонистической активности исследуемых бактерий.

а – влияние *Pseudomonas paralactis* на тест-культуры методом агаровых блочков; б – угнетение роста эндофитов *Bacillus amyloliquefaciens*.

обладал штамм *Bac. pumilus*, ингибирующий рост 4 бактерий с разными размерами зоны отсутствия роста: *Brevibacterium frigoritolerans* – 8–10 мм, *Rouxiella chamberiensis* – 5–6 мм, *Ewingella americana* – 2–4 мм и *Paenibacillus taichungensis* – 2–3 мм. Интересно, что на 3-й день учёта *Bac. pumilus* еще сдерживал рост штамма *Pseudomonas paralactis*, а к 5-му дню наличия такой зоны уже не наблюдалось (табл. 3).

Зоны отсутствия роста бактерий *Brevibacterium frigoritolerans* и *Paenibacillus taichungensis* регистрировали под влиянием штамма *Ps. azotoformans* (4 и 2 мм соответственно).

Также отмечали слабовыраженное сдерживание роста некоторых штаммов бактериями *P. taichungensis* (табл. 3).

Бактерии *Stenotrophomonas rhizophila*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Ewingella americana*, *Rouxiella chamberiensis* и *Ps. paralactis* не оказали антагонистического воздействия на другие

тест-культуры бактерий. Предполагаем, что взаимоотношения между ними носят симбиотический характер (кооперация), с возможными синтрофными связями.

Следовательно, исходя из полученных данных, среди микроорганизмов, принадлежащих к одному сообществу, явный антагонизм по отношению друг к другу встречается реже, чем положительные или нейтральные взаимоотношения. Тем не менее присутствие микробов-антагонистов в сообществе необходимо для контроля численности других бактерий и предотвращения их негативных воздействий на растение.

Таким образом, из «мокрой древесины» пораженных бактериальной водяной сосны сибирской выделен комплекс чистых культур микроорганизмов, ранее не описанных в других исследованиях. Нами не выявлены представители рода *Erwinia*, *Pseudomonas nimipressuralis* и *Ps. syringae*, которые часто

Таблица 3. Проявление антагонистической активности между бактериями, выделенными из пораженной бактериальной водяной сосны сибирской

Бактерии	Зона угнетения роста, мм								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	–	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	0	–	0	0	8–10	1–2	4	0	6–8
<i>Ewingella americana</i>	0	0	–	0	2–4	0	0	0	0.3–2
<i>Rouxiella chamberiensis</i>	0	0	0	–	5–6	0	0	0	3–5
<i>Bacillus pumilus</i>	0	0	0	0	–	0.3–1	0	0	0.3–2
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	0	0	0	0	2–3	–	2	0	0.3–2
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	0		0	0	0	0.5–1	–	0	0
<i>Ps. paralactis</i>	0		0		5–7	0	0	–	3
<i>Bac. amyloliquefaciens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	–

упоминаются другими авторами (Рыбалко, Гукасян, 1986; Морозова, Сурдина, 2013; Черпаков, 2012, 2017). Среди выделенных бактерий к условно-патогенным штаммам можно отнести *Rouxiella chamberiensis* и *Ewingella americana*, как и представителей рода *Erwinia*, относящихся к семейству Enterobacteriaceae, а также *Stenotrophomonas rhizophila* и *Bacillus pumilus*, проявляющих выраженные вирулентные свойства по отношению к индикаторным растениям и неоднозначно влияющих на рост и развитие сеянцев сосны обыкновенной. Полагаем, что при определенных условиях окружающей среды вышеуказанные бактерии способны участвовать в патогенезе и тем самым вызывать инфекционные заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Среди изученных представителей прокариотного микробиома пораженной бактериальной водянкой древесины сосны сибирской идентифицированы доминирующие бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bac. pumilus*, *Paenibacillus taichungensis*, *Rouxiella chamberiensis*, *Ewingella americana*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Pseudomonas azotoformans*, *Ps. paralactis*.

2. Все исследуемые бактерии проявляли выраженные вирулентные свойства (реакция сверхчувствительности) на индикаторном растении (фасоли) – от локальных некрозов по месту укола (*Bacillus pumilus*, *Paenibacillus taichungensis*) до отмирания обширных участков листа (*Brevibacterium frigoritolerans*, *Rouxiella chamberiensis*) и гибели листьев. Наибольшей вирулентностью обладали бактерии *Ewingella americana* и *Stenotrophomonas rhizophila*, заражение которыми привело к бактериозу – полному усыханию и гибели листьев фасоли в результате нарушения ксилемного тока и поступления питательных веществ.

3. В опытах *in vitro* показано, что бактерии *Ewingella americana* ухудшали всхожесть семян сосны обыкновенной (до 16 %) и задерживали развитие корешков у проростков; положительное влияние на развитие проростков (увеличение всхожести и сохранности, улучшение морфометрических характеристик) оказывали бактерии *Brevibacterium frigoritolerans* и *Bacillus amyloliquefaciens*.

4. Антагонистическая активность, разной степени выраженности, выявлена у четырех исследованных штаммов из девяти (*Bacillus*,

Pseudomonas, *Paenibacillus*). Метаболиты *Bac. amyloliquefaciens* подавляли развитие большинства исследуемых бактерий с образованием зон отсутствия роста от 0.3–2 до 6–8 мм.

5. Установлено, что в исследованном микробном сообществе в основном преобладали взаимоотношения нейтрального или симбиотического характера (кооперация), с возможными синтрофными связями.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН № 0287-2021-0011 «Снижение рисков возрастающего воздействия болезней и вредителей на лесные экосистемы в условиях глобальных изменений окружающей среды».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боронин А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Сорос. образов. журн. 1998. № 10. С. 25–31.
- Бубнова М. А. Характеристика очагов бактериальной водянки Слюдянского и Шелеховского лесничеств (Южное Прибайкалье) // Материалы Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум». М., 2020. С. 8–10.
- Быстров С. О., Антонов И. А. Первая находка уссурийского полиграфа *Polygraphus proximus* Blandford, 1894 (Coleoptera, Curculionidae: Scolytinae) в Иркутской области // Энтомолог. обозр. 2019. Т. 98. Вып. 1. С. 91–93.
- Воронин В. И., Морозова Т. И., Ставников Д. Ю., Нечесов И. А., Осолков В. А., Буянтзеев В. А., Михайлов Ю. З., Говорин Я. В., Середкин А. Д., Шуварков М. А. Бактериальное повреждение кедровых лесов Прибайкалья // Лесн. хоз-во. 2013. № 3. С. 39–41.
- Гвоздяк Р. И., Гойчук А. Ф., Розенфельд В. В. О протравливании семян сосны обыкновенной в контексте взаимодействий между видами их аутомикрофлоры // Плодоводство, семеноводство, интродукция древесн. раст. 2009. Т. 12. С. 24–28.
- Гвоздяк Р. И., Яковлева Л. М. Бактериальные болезни лесных древесных пород. Киев: Наук. думка, 1979. 240 с.
- Горовик Ю. Н., Шаловило Ю. И., Ковалева В. А., Лагоненко А. Л., Гут Р. Т., Евтушенков А. Н. *Bacillus pumilis* – новый фитопатоген сосны обыкновенной // Тр. Беларус. гос. ун-та. 2012. Т. 7. С. 194–198.
- Гродницкая И. Д., Трусова М. Ю., Сенашова В. А., Кондакова О. Э., Шкода В. Н., Баранчиков Ю. Н. Предварительные данные о составе эндофитной микрофлоры, ассоциированной с бактериальной водянкой хвойных в Прибайкалье // Материалы Междунар. конф. X чтения памяти О. А. Катаева «Дендробионтные беспозвоночные животные, грибы и их роль в лесных экосистемах». Т. 2: Фитопатогенные грибы, вопросы патологии и защиты леса, Санкт-Петербург, 22–25 октября 2018 г. СПб.: СПбГЛТУ, 2018. С. 15–16.
- Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высш. шк., 1965. 210 с.

- Ерофеев С. В., Чеботарь В. К. Патент 2599416 Россия, МПКС12R1/07, C12N1/20, A01N63/02. Штамм бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* bs89 в качестве средства повышения продуктивности растений и их защиты от болезней / № 2015137387/10; Заявл. 02.09.15 Опубл. 10.10.16. Бюл. № 28.
- Исаев А. С., Рожков А. С., Киселев В. В. Черный пихтовый усач *Monochatus uralis* (Fisch.). Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1988. 269 с.
- Кидай З., Клемент З., Шоймоиши Ф., Вереш Й. Методы фитопатологии. М.: Колос, 1974. 343 с.
- Колмакова О. В., Трусова М. Ю. Потребление аминокислот некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища // Сиб. экол. журн. 2011. № 1. С. 13–21.
- Масленникова С. Н., Шурыгин А. И., Чеботарь В. К., Щербаков А. В., Канарский А. В. Эндифитные бактерии хвойных растений: последние исследования и перспективы применения // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2013. № 23. С. 139–142.
- Методы фитопатологии / Под ред. М. В. Горленко. М.: Колос, 1974. 540 с.
- Морозова Т. И., Сурдина В. Г. Бактериальная водянка хвойных в Байкальской Сибири // Проблемы микологии и фитопатологии в XXI веке: Материалы Междунар. науч. конф., посвященной 150-летию со дня рождения члена-корреспондента АН СССР, профессора Артура Артуровича Ячевского. СПб.: ООО «Копи-Р Групп», 2013. С. 189–191.
- Недорезков В. Д. Биологическое обоснование применения эндифитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.11. СПб., 2003. 41 с.
- Основные методы фитопатологических исследований / А. Е. Чумакова, И. И. Минкевич, Ю. И. Власова, Е. А. Гаврилова // Науч. тр. ВАСХНИЛ. М.: Колос, 1974. 192 с.
- Пашенова Н. В., Демидко Д. А., Бабичев Н. С., Ефременко А. А., Перцова А. А., Баранчиков Ю. Н. Инвазийный фитопатоген сопровождается уссурийского полиграфа в лесах Хамар-Дабана // Совет бот. садов стран СНГ при Междунар. ассоц. акад. наук. М.: Научтехлитиздат, 2019. С. 82–85. – (Информ. бюл.; Вып. 12 (35)).
- Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук, Н. Н. Колотилова, И. Б. Котова, Е. В. Семенова, Н. Ю. Татаринова, Н. В. Уголькова, Е. А. Цавкелова, А. Ф. Бобкова, А. Г. Богданов, И. В. Данилова, Т. Ю. Динариева, В. В. Зинченко, А. Д. Исмаилов, А. В. Кураков, В. Н. Максимов, Е. С. Милько, Е. П. Никитина, Е. П. Рыжкова, А. М. Семенов, Д. В. Хомякова, Т. А. Чердынцева, Т. Г. Юдина / Под. ред. А. И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
- Рыбалко Т. М., Гукасян А. Б. Бактериозы хвойных Сибири. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1986. 83 с.
- Смирнов С. И., Котов А. С. Бактериальная водянка в березняках Калужской области // Лесоведение, экология и биоресурсы: Материалы Междунар. науч.-произв. конф. «Брянщина – родина отечественного и мирового высшего лесного образования». Брянск: БГИТА, 2005. С. 182–183.
- Справочные материалы к заседанию Межведомственной комиссии по вопросам охраны озера Байкал от 29 ноября 2018 г. М.: Росгеолфонд, 2018. 50 с.
- Татаринцев А. Н. Эколого-ценотические особенности пораженности березняков бактериальной водянойкой в южной части Средней Сибири (Красноярская группа районов) // Сиб. экол. журн. 2014. Т. 21. № 2. С. 273–281.
- Уссурийский полиграф в лесах Сибири. Распространение, биология, экология, выявление и обследование поврежденных насаждений. Метод. пособие / С. А. Кривец, И. А. Керчев, Э. М. Бисирова, Н. В. Пашенова, Д. А. Демидко, В. М. Петько, Ю. Н. Баранчикова / Под ред. С. А. Кривец, Ю. Н. Баранчикова. Томск; Красноярск: УМИУМ, 2015. 48 с.
- Чеботарь В. К., Щербаков А. В., Щербакова Е. Н., Масленникова С. Н., Заплаткин А. Н., Мальфанова Н. В. Эндифитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие // С.-х. биол. 2015. Т. 50. № 5. С. 648–654.
- Черпаков В. В. Бактериальная водянка: поражаемые виды хвойных пород России // Актуал. пробл. лесн. комплекса. 2012. Вып. 33. С. 111–115.
- Черпаков В. В. Этиология бактериальной водянки древесных растений // Изв. СПбГЛТА. 2017. Вып. 220. С. 125–139.
- Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. № 2. С. 133–143.
- Шеховцов В. П. Бактериальная водянка берёзы в Бузулукском бору // Аграрн. Россия. 2009. № 6-II. С. 50.
- Яковлева Л. М., Здоровенко Г. М., Гвоздяк Р. И. Некоторые характеристики диссоциантов *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 240–246.
- Alizadeh M., Khakvar R., Babai-Ahari A. Isolation and characterization of bacterial agents associated of wetwood disease on elm trees in Iran // Acta Phytopath. Entomol. Hungar. 2017. V. 52. N. 2. P. 157–168.
- Bashan L. E. de, Hernandez J.-P., Bashan Y., Maier R. M. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings // Environ. Experiment. Bot. 2010. V. 69. N. 3. P. 343–352.
- Bassimba D. D., Cebrián M. C., Molina L. M., Jordá C. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain // Plant Pathol. 2009. V. 59. Iss. 2. P. 400–410.
- Bull C. T., Boer S. H. de, Denny T. P., Firrao G., Saux M. F.-L., Saddler G. S., Scortichini M., Stead D. E., Takikawa Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007 // J. Plant Pathol. 2010. V. 92. N. 3. P. 551–592.
- Bystrov S. O., Antonov I. A. First record of the four-eyed fir bark beetle *Polygraphus proximus* Blandford, 1894 (Coleoptera, Curculionidae: Scolytinae) from Irkutsk province, Russia // Entomol. Rev. 2019. V. 99. N. 1. P. 54–55 (Original Rus. Text © S. O. Bystrov, I. A. Antonov, 2019, publ. in Entomologicheskoe obozrenie. 2019. V. 98. N. 1. P. 91–93).
- Cankar K., Kraigher H., Ravnika M., Rupnik M. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L.

- Karts) // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 244. Iss. 2. P. 341–345.
- Chebotař V. K., Shcherbakov A. V., Shcherbakova E. N., Maslennikova S. N., Zaplatkin A. N., Mal'fanova N. V. Biodiversity of endophytic bacteria as a promising biotechnological resource // Sel'skokhoz. Biol. (Agr. Biol.). 2015. V. 50. N. 5. P. 648–654 (English online ed.).
- Endophytes of forest trees: Biology and applications. Second ed. / A. M. Pirttilä, A. C. Frank (Eds.). Springer Cham, 2018. 472 p.
- Ferreira A., Quecine M. C., Lacava P. T., Oda S., Azevedo J. L., Araújo W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans* // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 287. N. 1. P. 8–14.
- Gregersen T. Rapid method for distinction of gram-negative from grampositive bacteria // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1978. V. 5. N. 2. P. 123–127.
- Haavik L. J., Billings S. A., Guldin J. M., Stephen F. M. Emergent insects, pathogens and drought shape changing patterns in oak decline in North America and Europe // For. Ecol. Manag. 2015. V. 354. P. 190–205.
- Johnson D. W., Riffle J. W. Wetwood (Slime flux) of elm, cottonwood and mulberry. Diseases of trees in the Great Plains. Washington DC: USDA For. Serv., 1986.
- Kharuk V. I., Im S. T., Petrov I. A., Golyukov A. S., Ranson K. J., Yagunov M. N. Climate-induced mortality of Siberian pine and fir in the Lake Baikal watershed, Siberia // For. Ecol. Manag. 2017. V. 384. P. 191–199.
- Klement Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads // Nature. 1963. N. 199. P. 299–300.
- Kolmakova O. V., Trusova M. Yu. Uptake of amino acids by uncultivated bacterioplankton of a eutrophic water reservoir // Contemp. Probl. Ecol. 2011. V. 4. № 1. P. 8–14 (Original Rus. text © O. V. Kolmakova, M. Yu. Trusova, 2011, publ. in Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal. 2011. V. 18. N. 1. P. 13–21).
- Kovaleva V., Shalovylo Y. I., Gorovik Y. N., Lagonenko A. L., Evtushenkov A. N., Gout R. T. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine – Short communication // J. For. Sci. 2015. V. 61. Iss. 3. P. 131–137.
- Kuan K. B., Othman R., Rahim K. A., Shamsuddin Z. H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of Maize under greenhouse conditions // PLOS ONE. 2016. V. 11. N. 3. P. 1–19.
- Le Fleche-Matéos A., Levast M., Lomprez F., Arnoux Y., Andonian C., Perraud M., Vincent V., Gouilh M. A., Thiberge J.-M., Vandenbogaert M., Diancourt L., Caro V., Burguieře A. M., Manuguerra J.-C. *Rouxiiella chambeiensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Enterobacteriaceae isolated from parenteral nutrition bags // Int. J. System. Evolut. Microbiol. 2015. V. 65. Iss. 6. P. 1812–1818.
- Mattson W. J., Haack R. A. The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects // Insect outbreaks / P. Barbosa, J. Schultz (Eds.). San Diego: Acad. Press, 1987. P. 365–407.
- Moorman G. W. Bacterial wetwood or slime flux. PennState Extension. Pennsylvania, USA: Coll. Agr. Sci. Pennsylvania St. Univ., 2008.
- Nair D. N., Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans // The Sci. World J. 2014. V. 2014. Article ID 250693. 11 p.
- Ryan R. P., Monchy S., Cardinale M., Taghavi S., Crossman L., Avison M. B., Berg G., Lelie D. van der, Dow J. M. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas* // Nat. Rev. Microbiol. 2009. V. 7. N. 7. P. 514–525.
- Schmidt C. S., Alavi M., Cardinale M., Müller H., Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere // Biol. Fertil. Soils. 2012. V. 48. N. 8. P. 947–960.
- Shink B., Ward J. C., Zeikus J. G. Microbiology of wetwood: role of anaerobic bacterial populations in living trees // J. Gen. Microbiol. 1981. V. 123. Iss. 2. P. 313–322.
- Stoyanova M., Moncheva P., Bogatzevska N. Occurrence of phytopathogenic bacteria of Enterobacteriaceae family in bulbs of cultural and ornamental plants // Sci. Technol. 2012. V. 2. N. 6. P. 39–44.
- Tatarintsev A. I. Ecological-coenotic characteristics of the bacterial dropsy infection rate in birch forests in the southern part of middle Siberia (Krasnoyarsk group of areas) // Contemp. Probl. Ecol. 2014. V. 7. N. 2. P. 221–227 (Original Rus. Text © A. I. Tatarintsev, 2014, publ. in Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal. 2014. V. 21. N. 2. P. 273–281).
- Tsavkelova E. A., Klimova S. Yu., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42. N. 2. P. 117–126 (Original Rus. text © E. A. Tsavkelova, S. Yu. Klimova, T. A. Chedyntseva, A. I. Netrusov, 2006, publ. in Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya. 2006. V. 42. N. 2. P. 133–143).
- Ulrich K., Stauber T., Ewald D. *Paenibacillus* – a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 2008. V. 93. N. 3. P. 347–351.
- Ward J. C., Pong W. Y. Wetwood in trees: A timber resource problem. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-112. Portland, OR: USDA, For. Serv., Pacific Northwest Res. St., 1980. 57 p.
- Yakovleva L. M., Zdorovenko G. M., Gvozdyak R. I. Some characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* dissociants // Microbiology. 2002. V. 71. N. 2. P. 205–210 (Original Rus. text © 2002, L. M. Yakovleva, G. M. Zdorovenko, R. I. Gvozdyak publ. in Mikrobiologiya. 2002. V. 71. N. 2. P. 240–246).
- Zhou W.W., Huang J.X., Niu T.G. Isolation of an antifungal *Paenibacillus* strain HT16 from locusts and purification of its medium-dependent antagonistic component // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 105. Iss. 3. P. 912–919.

COMPOSITION AND PHYTOPATHOGENIC PROPERTIES OF BACTERIA ISOLATED FROM *Pinus sibirica* Du Tour WOOD AFFECTED BY BACTERIAL WETWOOD IN THE BAIKAL REGION

I. D. Grodnitskaya¹, V. A. Senashova¹, M. Yu. Trusova²,
O. E. Pashkeeva¹, Yu. N. Baranchikov¹

¹ V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,
Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

² Institute of Biophysics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,
Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: igrod@ksc.krasn.ru, vera0612@mail.ru, mtrusova@ibp.krasn.ru,
koeandkoe@mail.ru, baranchikov_yuri@yahoo.com

Currently, in the dark coniferous forests of the Baikal region, the spread of the disease bacterial wetwood disease is noted, causing the sanitary condition deterioration in the forest stands, and leading to the forest dieback on large territories. Despite the fact that this disease has been known since the beginning of the last century, the question of its' real pathogen is still open. It is believed that associations of various endophytic microorganisms may take part in the development of pathogenesis. In this regard, it seems relevant to study the composition of the endophytic complex of microorganisms in wood with bacterial wetwood of forest species in order to establish the types of relationships between endophytes and test their ability to initiate a pathological process in conifers. An attempt was made to identify the main endophytic microbiome representatives of the «wet wood» of Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour) affected by bacterial wetwood, to assess their phytopathogenic properties and types of relationships between them. The features of the endophytic microbiome of the Siberian stone pine affected by bacterial wetwood in the Slyudyanskoye forestry of the Irkutsk region were studied. With standard microbiological and phytopathological methods we isolated pure cultures of bacteria and studied their characteristics (including virulence). For bacterias identification molecular genetic methods were used. From the infested wood of Siberian stone pine trees affected by bacterial wetwood, a complex of pure microorganisms cultures, not previously described in other studies, was isolated. Among them, opportunistic strains include *Rouxiella chamberiensis*, *Ewingella americana*, *Stenotrophomonas rhizophila* and *Bacillus pumilus*, which exhibit pronounced virulent properties in relation to indicator plants and ambiguously affect the growth and development of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Mutual impacts of bacteria on each other were noted in the endophytic microbiome of the affected Siberian stone pine wood. *Bacillus* bacteria showed pronounced antagonistic properties. Basically, in the endophytic community symbiotic relationships were dominated with possible syntrophic connections.

Keywords: conifer diseases, bacterial wetwood, Siberian stone pine, prokaryotic microbiome, Scots pine seeds and seedlings, virulence of strains, hypersensitivity reaction.

How to cite: Grodnitskaya I. D., Senashova V. A., Trusova M. Yu., Pashkeeva O. E., Baranchikov Yu. N. Composition and phytopathogenic properties of bacteria isolated from *Pinus sibirica* Du Tour wood affected by bacterial wetwood in the Baikal region // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2023. N. 1. P. 70–84 (in Russian with English abstract and references).