



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.07

(21) Номер заявки
202290410

(22) Дата подачи заявки
2020.07.30

(51) Int. Cl. *A01P 3/00* (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)
A01N 63/20 (2020.01)
A01N 25/00 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ БИОПЕСТИЦИДА И БИОУДОБРЕНИЯ

(31) 2019-0071

(32) 2019.07.31

(33) CU

(43) 2022.08.01

(86) PCT/CU2020/050004

(87) WO 2021/018321 2021.02.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕНТРО ДЕ ИНХЕНЬЕРИЯ
ХЕНЕТИКА И БИОТЕКНОЛОХИЯ
(CU)

(72) Изобретатель:
Альварес Луго Ирене Мария, Санчес
Ортис Илеана, Вонг Падилья Идания,
Сомонтес Санчес Даналай, Моран
Вальдивия Роландо, Гальдос Бетаргес
Лиссоэ, Домингес Рабилеро Ларица
Каридад, Нордело Вальдивия Айлин
(CU)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) MA YUAN ET AL.: "Co-metabolic transformation of the neonicotinoid insecticide imidacloprid by the new soil isolate *Pseudoxanthomonas indica* CGMCC 6648", JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES AND HEALTH B: PESTICIDES., vol. 49, no. 9, 2 September 2014 (2014-09-02), páginas 661-670, XP055855487, XN ISSN: 0360-1234, DOI:

10.1080/03601234.2014.922766, Recuperado de Internet: URL: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03601234.2014.922766?needAccess=true> > "Results"; página 664 "Plant growth-promoting activities of *P. indica* CGMCC 6648"; página 667

KUMARI KIRTI ET AL.: " *Pseudoxanthomonas indica* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dumpsite", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol.61, no. 9, 1 de Septiembre de 2011 (2011-09-01), páginas 2107-2111, XP055855533, GB, ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ij.s.0.017624-0, página 2107, columna de derecha, primer párrafo

MOLINARI S.: "SALICYLIC ACID AS AN ELICITOR OF RESISTANCE TO ROOT-KNOT NEMATODES IN TOMATO", ACTA HORTICULTURAE, no. 789, 1 de Mayo de 2008 (2008-05-01), páginas 119-126, XP055855611, BE, ISSN: 0567-7572, DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.789.15 resumen "Salicylic Acid Treatments and Determination of RKN Index of Reproduction"; página 121

KLESSIG DANIEL F. ET AL.: " Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future", MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 31, no. 9, 1 de Septiembre de 2018 (2018-09-01), páginas 871-888, XP055855633, US, ISSN: 0894-0282, DOI: 10.1094/MPM I-03-18-0067-CR, Recuperado de Internet: URL:<https://aps.journals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR> > primer párrafo completo; página 873, columna de izquierda

(57) Composición biopестицида и биоудобрения, содержащая *Pseudoxanthomonas indica* или метаболиты указанной бактерии и инертные наполнители или разбавители. Применение *Pseudoxanthomonas indica* или метаболитов указанной бактерии для получения композиции биопестицида или биоудобрения. Способ борьбы с фитопатогенами и зоонематодами, включающий нанесение эффективного количества *Pseudoxanthomonas indica* или ее метаболитов на нуждающееся в нем растение или животное. Способ стимулирования роста растения, включающий нанесение эффективного количества *Pseudoxanthomonas indica* или метаболитов этой бактерии на почву, субстрат, растения или семена.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области сельского хозяйства и основано на использовании *Pseudoxanthomonas indica* в сельском хозяйстве в качестве полезного микроорганизма в этой области. Как показано в настоящем изобретении, бактерии этих видов микробов обладают нематоцидной и фунгицидной активностью, которая индуцирует защитный ответ и действуют, как стимулятор роста растений, не влияя на окружающую среду.

Уровень техники

Растения связаны с микроорганизмами, которые обладают биоудобряющей и биорегулирующей активностью. Биоудобряющий эффект этих микроорганизмов благоприятствуют надлежащему состоянию растения посредством увеличения доступности удобрения, фиксации азота и симбиоза. Биорегулирование проявляется в виде усиления роста растения путем борьбы с патогенными микроорганизмами. Этот эффект проявляется по механизмам, таким как действие антибиотиков, сидерофоров, антагонистических соединений бактерий и грибов, внеклеточных ферментов и увеличенной устойчивостью к биотическому и абиотическому стрессу. Обычно этот тип родов бактерий включает *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Enterobacter* и *Xanthomonas*; виды грибов включают *Trichoderma* (Mabood, Zhou and Smith 2014, *Can. J. Plant Sci.* 94: 1051-1063).

В частности, одними из чаще всего наблюдающихся фитопатогенов являются нематоды, становящиеся одними из наиболее важных вредителей в сельском хозяйстве в тропиках, субтропиках и областях с умеренным климатом. Из видов нематод *Meloidogyne* spp. приводит в тропических областях к потерям урожая, оцениваемым в 11-25%. Ежегодные потери во всем мире оцениваются примерно в \$ 87 миллиардов. Химические нематоциды чаще всего использовались для борьбы с нематодами вследствие их скорости и эффективности. Однако фумиганты, такие как метилбромид были запрещены во многих странах вследствие их высокой токсичности для млекопитающих, их способности уменьшать озоновый слой и остаточных эффектов. С учетом таких предпосылок в современной практике поощряется использование благоприятных микроорганизмов, как врагов фитонематод для получения биологических средств (Jones et al. 2013, *Mol Plant Pathol* 14(9), 946-961).

Некоторыми из природных врагов нематод являются грибы *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium chlamydosporium*, *Arthrobotrys oligospora* и *Trichoderma harzianum*. также ими являются бактерии, такие как *Pasteuria penetrans*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* (Dong and Zhang 2006, *Plant and Soil* 288(1):31-45) и *Tsukamurella paurometabola* штамм C924 (патент EP 0774906 B1). Недавно штаммы родов *Chromobacterium*, *Burkholderia* и *Flavobacterium* были запатентованы для регулирования заражения нематодами.

Однако биопродукты пока не обеспечивают полную эффективность, поэтому необходимо получить полезные микроорганизмы, которые не благоприятствуют развитию резистентности растений к патогенам и приводят к минимальному воздействию на окружающую среду.

В настоящем изобретении указанная выше задача решается с помощью композиции биопестицида и биоудобрения, которая содержит *Pseudoxanthomonas indica* или метаболиты этих видов бактерий и инертные наполнители или разбавители. В настоящем изобретении впервые показано, что эти виды можно использовать в качестве нематоцида и фунгицида широкого спектра действия, способного обеспечить борьбу с нематодами и фитопатогенными грибами, имеющимися в большинстве сельскохозяйственных культур. Эксперименты, связанные с настоящим изобретением, показали, что композиция биопестицида, содержащая *Pseudoxanthomonas indica* уменьшает выведение из яиц *Meloidogyne* *in vitro* по сравнению со степенью выведения из яиц не обработанных этой бактерией с последующим увеличением гибели личинок нематод. Нанесение этой бактерии на почву уменьшает индекс заражения с помощью *Meloidogyne* spp. в томатах и уменьшает количество корневых галлов с высокой технической эффективностью (TE).

В контексте настоящего изобретения биопестицид представляет собой продукт, использующийся для борьбы с сельскохозяйственными вредителями посредством особых биологических эффектов. Эта особенность отличает биологические пестициды от многих химических пестицидов широкого спектра действия. В данной области техники известно, что биопестициды представляют собой биологическое средство борьбы; т.е. организм, его гены или метаболиты, предназначенные для борьбы с вредителями (Lacey and Sporleder, 2013, Chapter 16 Biopesticides, *Insect Pests of Potato*, 463-497pp). В композиции биопестицида, предлагаемой в настоящем изобретении, считают, что эффект биологической борьбы обусловлен бактерией или вырабатываемыми ей соединениями.

В контексте настоящего изобретения биоудобрение является продуктом, содержащим полезный микроорганизм, который благоприятствует росту развитию растения без вредного воздействия на экосистему, в качестве альтернативы химическим удобрениям. Специалисты в данной области техники понимают, что биоудобрения улучшают доступность и усвоение питательных веществ, а также продуцирование гормонов растения. Кроме того, они придают стойкость растения к стрессу и увеличивают устойчивость к патогену, что приводит к улучшению сельскохозяйственной культуры (Bhardwaj et al, 2014 *Microbial Cell Factories* 13:66).

В соответствии с приведенными экспериментальными данными настоящее изобретение относится к

индуктору защитного ответа и стимулятору роста растения для обработанных растений. Оно включает микроорганизм *Pseudoxanthomonas indica*, грамотрицательную подвижную бактерию, которая позитивна для каталазы и оксидазы, которые образует желтые колонии после роста в течение 24 ч при 28°C в среде из триптоносоевого агара. В настоящем изобретении бактерию получали из ризосферы здоровых растений томата в сооружении для защиты растений, зараженном *Meloidogyne* spp., и его идентифицировали, как *Pseudoxanthomonas indica* по обычным методикам биохимии и молекулярной биологии. Этот вид бактерий не является новым; он был выделен из почвы в других регионах мира. Репрезентативный штамм этого вида, названный P15, выделяли из почвы в наружной свалке отходов гексахлорэтана в Индии и он описан в 2011 г. (Kumari et al. 2011, Int J Syst Evol Microbiol 61: 2107-2111). Этот вид имеется в продаже в известных коллекциях микроорганизмов.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция биопестицида или биоудобрения содержит живые или инактивированные бактерии *Pseudoxanthomonas indica*. В настоящем изобретении показано, что надосадочная жидкость от культуры и живые бактерии и их летучие или растворимые соединения (метаболиты) обладают нематоцидной или фунгицидной активностью.

В контексте настоящего изобретения метаболит означает вещество или соединение, продуцируемое *Pseudoxanthomonas indica*, которое способно бороться с вредителями и зоонематодами в растениях, и/или обладает стимулирующей рост растения активностью. В одном варианте осуществления настоящего изобретения метаболиты, в природе продуцируемые *Pseudoxanthomonas indica*, получают по методикам естественного, рекомбинантного или химического синтеза. В конкретном варианте осуществления метаболиты являются летучими или растворимыми соединениями.

Метаболиты, выделяемые *Pseudoxanthomonas indica* в культуральную среду, и вырабатываемые ими летучие соединения обладают *in vitro* активностью по отношению к разным фитопатогенным грибам: *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Stemphylium solani*, *Phytophthora nicotianae*, *Bipolaris oryzae* и *Fusarium oxysporum*. Кроме того, они обладают стимулирующей рост растения активностью и увеличивают длину и массу растения, длину главного корня и количество боковых корней и радикулярных волосков.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно содержит стабилизирующие соединения, усилители, активаторы против нематоцидной активности или покрытия для семян. В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрации бактерий равна от 1×10^8 до 1×10^{10} колониеобразующих единиц (CFU) на 1 мл композиции. Композиция биопестицида применима для прямой или непрямой борьбы с фитопатогенами и зоонематодами.

Другим объектом настоящего изобретения является применение *Pseudoxanthomonas indica* или метаболитов этой бактерии для получения композиции биопестицида или биоудобрения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения для такого применения концентрация бактерий равна от 1×10^8 до 1×10^{10} CFU на 1 мл композиции. В одном варианте осуществления настоящего изобретения композицию биоудобрения готовят как предварительно упакованное твердое вещество, порошок, жидкость, суспензию, гранулят, препарат для небулайзера или капсулированный продукт.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу борьбы с фито- и зоонематодами, который включает нанесение эффективного количества *Pseudoxanthomonas indica* или его метаболитов на нуждающееся в нем растение или животное. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в таком способе бактерию наносят в виде суспензии или концентрата живого или инактивированного штамма. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в таком способе бактерию готовят, как предварительно упакованное твердое вещество, порошок, жидкость, суспензию, гранулят, препарат для небулайзера или капсулированный продукт. В одном варианте осуществления в способе, предлагаемом в настоящем изобретении, штамм используют для уменьшения степени заражения растений фитопатогенными нематодами или грибами.

Другим объектом настоящего изобретения является способ стимулирования роста растения, который включает нанесение эффективного количества *Pseudoxanthomonas indica* или его метаболитов на почву, субстрат, растения или семена. В таком способе бактерию необязательно готовят как предварительно упакованное твердое вещество, порошок, жидкость, суспензию, гранулят, препарат для небулайзера или капсулированный продукт.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Фитогенетическое дерево штамма H32, полученное по методике присоединения соседей, в последовательности генов, кодирующих 16s рибосомную рибонуклеиновую кислоту (rRNA), которое показывает взаимосвязь штамма H32 с типичными представителями семейства *Pseudoxanthomonas*. Не входящими в эту группу микроорганизмами были *Luteimonas mephitis* B1953/27, *Arenimonas donghaensis* HO3-R19, *Lysobacter enzymogenes* DSM 2043T и *Thermomonas haemolytica* A50-7-3. Значения бутстрэпа, превышающие 70%, наблюдались в узлах разветвлений (выраженные в % от 1000 повторов). Черта обозначает два замещения на каждые 100 нуклеотидов.

Фиг. 2. Влияние летучих органических соединений (VOC) на рост грибов *Bipolaris oryzae*. H32, H36 и H42: Исследованные штаммы бактерий. Контроль: группа без обработки. Неодинаковые буквы означают статистически значимые различия по критерию Данкена, $p < 0,05$.

Фиг. 3. Длина ветви (А) и масса (В) растений *Arabidopsis thaliana* после 14 дней воздействия VOCs *Pseudoxanthomonas indica* штамм Н32 (Н32) или культуральной среды в триптоносоевом бульоне (контроль). Звездочкой отмечены статистически значимые различия по критерию Стьюдента $p < 0,05$.

Фиг. 4. Длина главного корня растений *Arabidopsis thaliana* после 8 дней совместного выращивания с *Pseudoxanthomonas indica*, штаммы Н32, Н36 и Н42 или $MgSO_4$ (10 ммоль/л), в качестве отрицательного контроля (контроль). Неодинаковые буквы означают статистически значимые различия по критерию Данкена, $p < 0,05$.

Фиг. 5. Количество боковых корней *Arabidopsis thaliana* при обработке с помощью *Pseudoxanthomonas indica*, штаммы Н32, Н36 и Н42, или $MgSO_4$ (10 ммоль/л), в качестве отрицательного контроля (контроль). Неодинаковые буквы означают статистически значимые различия по критерию Данкена, $p < 0,05$.

Фиг. 6. Количество радикулярных волосков вдоль 1 см главного корня растений *Arabidopsis thaliana* при обработке с помощью *Pseudoxanthomonas indica*, штаммы Н32, Н36 и Н42, или $MgSO_4$ (10 ммоль/л), в качестве отрицательного контроля (контроль). Неодинаковые буквы означают статистически значимые различия по критерию Данкена, $p < 0,05$.

Фиг. 7. Влияние *Pseudoxanthomonas indica*, штамм Н32, при нанесении на корни на экспрессию защитных генов PR1 и PDF1.2, на листья *Arabidopsis thaliana*. Экспериментальные группы: Контрольные растения обрабатывали водой (С) и растения обрабатывали бактериальным штаммом Н32 (Н32). Неодинаковые буквы означают статистически значимые различия по критерию Данкена, $p < 0,05$.

Фиг. 8. Влияние *Pseudoxanthomonas indica*, штамм Н32, при нанесении на корни на экспрессию защитных генов: осмотин (группа А), гидроксипероксидаза (HPL) (группа В), хитиназа (группа С), глутатионпероксидаза (GPx) (группа D), PR-1 (группа E), алленоксидсинтаза (AOS) (группа F) и фениламиннаммонийлиаза (FAL) (группа G). Неодинаковые буквы означают статистически значимые различия по критерию Данкена, $p < 0,05$. Экспрессию генов измеряли на системном уровне в листьях томатов.

Примеры

Пример 1. Выделение и консервация бактериальных штаммов с нематоцидной способностью.

Для выделения бактериальных штаммов с нематоцидной способностью собирали образцы ризосферной почвы от менее пораженных растений томата в сооружении для защиты растений с сильным заражением посредством *Meloidogyne* spp. в провинции Сiego de Ávila. Сначала проводили селективное предварительное обогащение. Для его проведения 1 г ризосферной почвы инкубировали в течение 48 ч при 30°C в минимальной среде М9, содержащей 100 яиц *Meloidogyne* в 1 мл культуры, в качестве единственного источника углерода и энергии. На основе этого препарата серийные разведения инокулировали в чашках Петри с использованием минимальной среды М9 с 0,05% хитина для выбора штамма. Колонии с гало, обладающими морфологически иными характеристиками, выбирали и обозначали символом Н, затем проводили некоторое количество последовательных выделений. Затем проводили выделение второй колонии путем определения активности десульфуразы и желатиназы. Активность десульфуразы наблюдали вследствие почернения фильтровальной бумаги, пропитанной ацетатом свинца, помещенной в колонии в чашке Петри с триптоносоевым агаром, вследствие сероводорода, выработанного колониями. Активность желатиназы определяли по наблюдению гало гидролиза после 24 ч выращивания в питательном агаре с 0,5% желатина и добавления реагента Фразье.

Штаммы Н32, Н36 и Н42 обнаруживали 3-5 мм непрозрачные светло-желтые гало круглой формы с выпуклым подъемом после 24 ч инкубации при 30°C, в среде триптоносоевого агара. Границы колоний были сплошными с плавными блестящими поверхностями и кремообразной консистенцией. Для консервации изолятов колонии выращивали в течение 12 ч в триптоносоевом бульоне, затем добавляли глицерин в качестве криоконсерванта (конечная концентрация 20% (об./об.) и образцы замораживали при -70°C).

Пример 2. Таксономическая идентификация выделенных бактерий.

Для идентификации проводили окрашивание по Граму, тест с оксидазой и каталазой и тест Хью и Лейфсона в соответствии с руководством *Bergey's Systematic Bacteriology* (Vos et al. 2009, Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2nd Edition, Vol 3, 1450 pp ISBN: 978-0-387-95041-). Штаммы Н32, Н36 и Н42 найдены грамотрицательными, подвижными, аэробными, палочковидными с окислительным метаболизмом. Обычные тесты, проведенные с использованием набора API 20NE (Biomerieux), привели к профилю, который не соответствует никакому набору в каталоге идентификации наборов. Результаты биохимических тестов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты биохимических тестов, проведенных с использованием API 20NE

| Тест | Результат |
|---------------------------------|-----------|
| Восстановление нитрата в нитрит | + |
| Выработка индола | - |
| Выработка глюконовой кислоты | - |
| Аргининдегидролаза | - |
| Уреаза | - |
| Гидролиз эскулина | + |
| Гидролиз желатина | + |
| β -галактозидаза | + |
| Усвоение следующих: | |
| D-Глюкоза | + |
| L-Арабиноза | - |
| D-Манноза | + |
| D-Маннит | - |
| N-ацетилглюкозамин | + |
| D-Мальтоза | + |
| Гентибиоза | - |
| Капроновая кислота | - |
| Адипат | - |
| Малат | + |
| Цитрат | - |
| Фенилуксусная кислота | - |
| оксидаза | + |

Штаммы, указанные в примере 1, также исследовали с помощью молекулярной биологии путем секвенирования фрагмента гена, который кодирует 16S rRNA. В качестве праймеров в полимеразной цепной реакции использовали олигонуклеотиды 63 F и 1387R (Marchesi et al. 1998 Applied and Environmental Microbiology 64(2):795-9). Последовательности сопоставляли с имеющимися в базе данных GenBank в National Center for Biotechnological Information of the United States с использованием MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software Version 7.0, Center for Evolutionary Functional Genomics, The Bioscience Resource Project, Arizona State University). Фитогенетическое дерево, полученное по методике присоединения соседей, которое приведено на фиг. 1, подтвердило, что штаммы H32, H36 и H42 образуют когерентную группу с представителями рода *Pseudoxanthomonas*, типа *Bacteroidetes* и внутригенную ветвь с *Pseudoxanthomonas indica*. *Luteimonas mephitis* B1953/27, *Arenimonas donghaensis* HO3-R19, *Lysobacter enzymogenes* DSM 2043T и *Thermomonas haemolytica* A50-7-3 А использовали в качестве микроорганизмов, не входящих в группу. Значения бутстрэпа, превышающие 70%, наблюдались в узлах разветвлений. На фиг. 1 приведена информация только для штамма H32. Фитогенетическое дерево, полученное по методике максимальной вероятности, обладало топологией, сходной с полученной по методике присоединения соседей.

Анализ матрицы расстояний позволил определить наибольшую близость для последовательности 16S rRNA штаммов, использованных в настоящем исследовании, с *Pseudoxanthomonas indica* P15. EF424397.1. В соответствии с результатами филогенетического анализа сделан вывод о том, что исследованные штаммы относятся к виду *Pseudoxanthomonas indica* и результаты биохимических тестов соответствуют основным характеристикам, приведенным для этого вида бактерий.

Пример 3. *In vitro* нематоцидная активность бактерий, соответствующих выбранным штаммам.

Исследования *in vitro* проводили с использованием яиц и молоди фитонематоды *Meloidogyne* spp. Нематоцидную активность определяли в живых клетках *Pseudoxanthomonas indica*. Соответственно, массы яиц собирали с корней растения томата, пораженного этим вредителем; затем массы разъединяли с

помощью 0,5% гипохлорита натрия и выполняли три повтора (100 яиц) для каждого из исследуемых образцов. Для получения личинок яйца инкубировали при 28-30°C в стерильной деионизированной воде в течение 6 дней. Контрольные образцы получали таким же образом с использованием 100 яиц и 100 личинок нематод в 1 мл стерильной воды с пептоном (1% (мас./об.)). Критерий активности по отношению к яйцам *Meloidogyne* spp. определяли, как ингибирование в процентах выведения из яиц. Критерий активности по отношению к личинкам или молодежи нематод определяли путем расчета уменьшения их выживаемости в процентах.

Образцы цельных живых клеток *Pseudoxanthomonas indica* получали из свежей культуры каждого штамма, в которой концентрации бактерий определяли в виде CFU на 1 мл. По 2 раза отбирали 1 мл культуры и клетки разделяли центрифугированием и промывали пептоном (1%) в воде. Затем готовили три серийных разведения (1:100) и в этом же растворе использовали для анализов. В таблицах 2 и 3 представлено влияние двух из разведений *Pseudoxanthomonas indica* на яйца и личинки нематод.

Таблица 2

Ингибирование в процентах выведения из яиц нематод *Meloidogyne* spp. при двух концентрациях жизнеспособных клеток *Pseudoxanthomonas indica*

| Штамм | Ингибирование выведения | |
|----------|--------------------------|--------------------------|
| | 5×10 ⁶ CFU/мл | 5×10 ⁴ CFU/мл |
| Н32 | 83% | 89% |
| Н36 | 75% | 80% |
| Н42 | 74% | 85% |
| Контроль | 20% | 22% |

Таблица 3

Снижение в процентах выживаемости личинок нематод *Meloidogyne* spp. при двух концентрациях жизнеспособных клеток *Pseudoxanthomonas indica*

| Штамм | Снижение выживаемости личинок | |
|----------|-------------------------------|--------------------------|
| | 5×10 ⁶ CFU/мл | 5×10 ⁴ CFU/мл |
| Н32 | 50% | 55% |
| Н36 | 43% | 45% |
| Н42 | 38% | 40% |
| Контроль | 15% | 20% |

Следовательно, показано, что *Pseudoxanthomonas indica* ингибирует выведение из яиц *Meloidogyne* spp. Они также снижают выживаемость личинок этой нематоды.

Пример 4. Профили использования углеводов и ферментативной активности *Pseudoxanthomonas indica*.

Для определения углеводов, использующихся *Pseudoxanthomonas indica* штаммом Н32 в качестве единственного источника углерода и энергии использовали набор CH50 фирмы Biomeriux. Бактерии *Pseudoxanthomonas indica* штамма Н32 окисляют следующие углеводы: D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, N-ацетил-глюкозамин, D-мальтоза, D-лактоза и D-сахароза, как сообщают для типа штамма этих видов (*Pseudoxanthomonas indica* P15).

Для определения ферментативного профиля этого штамма *Pseudoxanthomonas indica* продуцирование хитиназы определяли путем выращивания в минимальной среде М9 с 0,5% коллоидного хитина. В свою очередь, продуцирование протеазы определяли путем посева в чашки, содержащие питательный агар и 0,5% желатина и последующее развитие осуществляли с помощью реагента Фразье. Кроме того, АРИЗУМ™ использовали для обнаружения фосфатаз, эстераз, липаз, глюкоронидаз, галактозидаз, фукозидаз, маннозидаз, арилаз, N-ацетил-β-глюкозаминидазы и нафтол-AS-BI-фосфогидролазы.

Результаты этих определений приведены в табл. 4, которые показывают, что бактерии *Pseudoxanthomonas indica* штамма Н32 обладают окислительным метаболизмом и способны разлагать большое количество органических соединений и других сложных химических соединений.

Таблица 4

Ферменты, выделяемые *Pseudoxanthomonas indica* штаммом Н32

| Фермент | Результат |
|------------------------------------|-----------|
| Хитиназы | + |
| Протеазы | + |
| Эстеразы (С4) | + |
| Эстеразалипазы (С8) | + |
| Липаза (С14) | - |
| Трипсин | + |
| α -химотрипсин | + |
| β -глюкозидаза | - |
| N-ацетил- β -глюкозаминидаза | + |
| Щелочная фосфатаза | + |
| Лейцинариламидаза | + |
| Валинариламидаза | + |
| Цистеинариламидаза | + |
| кслая фосфатаза | + |
| Нафтол-AS-VI-фосфогидролаза | + |

+: присутствие

-: отсутствие

Пример 5. Влияние *Pseudoxanthomonas indica* на заражение с помощью *Meloidogyne* spp. в *Solanum lycopersicum*.

Проведен анализ для определения *in vivo* нематоцидной активности *Pseudoxanthomonas indica* в растениях томата (*Solanum lycopersicum*). Их пересаживали в горшки, содержащие 1 кг субстрата и заражали с помощью 500 яиц *Meloidogyne* spp. Бактерию выращивали в триптоносоевом бульоне в течение 24 ч и выполняли серийные разведения деионизированной водой для нанесения на растения в концентрациях, равных 4×10^4 - 2×10^4 CFU/г субстрата. Использованная схема включала два нанесения. Одно нанесение проводили через 3 дня после заражения субстрата нематодами. Рассадку томата пересаживали через 7 дней. Второе нанесение проводили через 14 дней после пересадки. Бактериальный штамм С-924, который обладал известными свойствами, как нематоцид, использовали в качестве положительного контроля (European Patent EP 0774906 B1). В этом эксперименте деионизированную воду использовали в качестве контроля (отрицательный контроль).

Через 35 дней после пересадки растения томата собирали и определяли степень заражения в корнях с использованием шкалы 0-10 Bridge и шкалы Page. ТЕ каждой концентрации штамма Н32 определяли по этим результатам (Wong et al. (2017) *Biotecnologia Aplicada*, 34:4301-43) Бактерия была эффективной по отношению к нематодам рода *Meloidogyne* для всех исследованных обработок, как показано в табл. 5.

Таблица 5

Корни *Solanum lycopersicum*, степень заражения и ТЕ обработки на основе *Pseudoxanthomonas indica*.

| Обработка | CFU/г | Степень | ТЕ* (%) |
|-------------|-----------------|---------|---------|
| T 10 | 4×10^7 | 1,38 | 75,32 |
| T 11 | 4×10^6 | 1,89 | 66,10 |
| T 12 | 4×10^5 | 1,29 | 76,92 |
| T 13 | 4×10^4 | 2,38 | 57,37 |
| T 14 | 2×10^4 | 2,43 | 56,41 |
| Штамм С-924 | 2×10^8 | 3,00 | 46,15 |
| КОНТРОЛЬ | - | 5,60 | 0,0 |

*ТЕ: Техническая эффективность

Соответственно, бактерии вида *Pseudoxanthomonas indica* могут уменьшить индекс *Meloidogyne* spp. более, чем на 50% ТЕ.

Пример 6. Фунгицидная активность метаболитов, выделяющихся в культуральную среду *Pseudoxanthomonas indica*.

Для определения фунгицидной активности метаболитов, выделяющихся в культуральную среду *Pseudoxanthomonas indica* штамма Н32 сначала использовали крышку толщиной примерно 7 мм с культуральной средой, содержащей грибы в середине чашки Петри с картофельным агаром с декстрозой. С обеих сторон 10 мкл суспензии бактерий штамма Н32 добавляли к триптоносоевому бульону, образуя линию. Только такую же культуральную среду добавляли к контрольной обработке. В каждом случае делали два повтора. После 5 дней инкубации при 28°C измеряли диаметр колонии грибов и относительный рост в процентах по сравнению с контролем определяли следующим образом:

Ингибирование роста, $\% = (\text{диаметр контрольной колонии} - \text{диаметр колонии без обработки}) / (\text{диаметр контрольной колонии} - 7) * 100$.

Результаты, приведенные в табл. 6, показывают, что *Pseudoxanthomonas indica* останавливает развитие группы фитопатогенных грибов, что влияет на сельскохозяйственные культуры с высоким экономическим значением.

Таблица 6

Ингибирование роста фитопатогенных грибов метаболитами, выделяющимися *Pseudoxanthomonas indica*.

| Гриб | Ингибирование роста % |
|-----------------------------------|-----------------------|
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 77,9 |
| <i>Sarocladium oryzae</i> | 47,8 |
| <i>Stemphylium solani</i> | 72,0 |
| <i>Phytophthora nicotianae</i> | 92,6 |
| <i>Bipolaris oryzae</i> | 80,9 |
| <i>Fusarium oxysporum cubense</i> | 43,9 |

Пример 7. Фунгицидная активность летучих органических соединений, выделяющихся *Pseudoxanthomonas indica*.

Собирали систему, состоящую из двух доньев чашек Петри. В нижней части она содержала среду PDA; затем сверху помещали крышку толщиной примерно 7 мм с грибами *Bipolaris oryzae*. Она содержала триптоносоевый агар, к которому добавляли 100 мкл 12-часовой культуры с бактериальными штаммами Н32, Н36 и Н42 в триптоносоевом бульоне. Для контрольной обработки добавляли только 100 мкл триптоносоевого бульона. В каждом случае делали два повтора. Систему герметизировали с помощью Parafilm™ и инкубировали при 28°C. Через 5 дней измеряли диаметр колонии грибов. Ингибирование роста по сравнению с контрольной обработкой определяли следующим образом:

Ингибирование роста, $\% = ((\text{диаметр контрольной колонии} - \text{диаметр обработанной колонии}) / (\text{диаметр контрольной колонии} - 7)) * 100$.

Три исследованных штамма ингибировали рост *Bipolaris oryzae* более, чем на 50% без физического контакта с патогеном, как показано на фиг. 2. Следовательно, летучие соединения *Pseudoxanthomonas indica* обладают фунгицидной активностью.

Пример 8. Выработка стимулирующих рост растения летучих соединений бактерией *Pseudoxanthomonas indica*.

Для демонстрации стимулирующей рост растения активности семена *Arabidopsis thaliana* (примерно 100 семян на обработку) стерилизовали смесью, содержащей 1 мл гипохлорита натрия (2% (об./об.)) и 3 мкл Triton X100 (1% (об./об.)). Затем их встряхивали в течение 8 мин при 37°C. После этого их промывали примерно 5 раз стерильной дистиллированной водой и хранили при 4°C в течение 4 дней. Их помещали в чашки Петри диаметром 150 мм, содержащие среду MS. Меньшие чашки Петри (диаметром 50 мм), содержащие триптоносоевый агар, помещали в центр более крупных чашек Петри. Через 2 дня после прорастания растения исследовали среду триптоносоевого агара, содержащую 10 мкл культуры микроорганизма, которые предварительно выращивали в триптоносоевом бульоне в течение 12 ч при 37°C, инокулировали. Систему герметизировали с помощью Parafilm™ и инкубировали при 20±2°C в режиме 16 ч освещение/8 ч затемнение.

Образцы собирали через 14 дней для определения длины и массы ветвей и количества листьев. После 14 дней инкубации в чашках Петри, содержащих *Pseudoxanthomonas indica*, растения *Arabidopsis thaliana* обладали лучшим ростом, чем контроль без бактерии (фиг. 3). Это свидетельствовало о стимулировании роста растений летучими соединениями, вырабатываемыми указанной бактерией.

Пример 9. Влияние растворимых соединений, выделяемых *Pseudoxanthomonas indica*, на морфологию корня.

Семена *Arabidopsis thaliana* var Col 0 обрабатывали растворимыми соединениями, выделяемыми в культуральную среду *Pseudoxanthomonas indica*. Ранее семена стерилизовали путем погружения со встряхиванием на 8 мин при 37°C в раствор, содержащий 1 мл гипохлорита натрия (2% (об./об.) и 3 мкл Triton X100 (1% (об./об.)). Семена 5 раз промывали стерильной дистиллированной водой и хранили при 4°C в течение 4 дней.

10 семян помещали на одинаковом расстоянии в прямую линию на верхнее дно чашки Петри диаметром, содержащей среду MS. Чашки располагали вертикально в освещенной камере при 22±2°C и в режиме 16 ч освещение/8 ч затемнение. Через 4 дня после прорастания растений 240 мкл суспензии бактерий штаммов Н32, Н36 и Н42 добавляли к культуральной среде на расстоянии 2-3 см от нижнего конца корней. Эти суспензии получали из культуры в триптоносоевом бульоне, выращенной при 28°C в течение 18 ч, которую центрифугировали и повторно суспендировали в MgSO₄ 10 ммоль/л. Систему герметизировали с помощью Parafilm™ и инкубировали в освещенной камере при таких же условиях. MgSO₄ 10 ммоль/л использовали в качестве отрицательного контроля. В каждом случае выполняли всего 3 повтора.

После 8 дней совместного выращивания длину первичного корня, количество боковых корней и количество корневых волосков на длине в 1 см вдоль первичного корня измеряли от нижнего конца вверх. В этом исследовании использовали стереоскоп и инвертационный микроскоп. Корни растений, совместно выращенных с бактериальными штаммами, обладали иной морфологией, чем контрольные. Это свидетельствовало о возможных изменениях в архитектуре корня, вызванных этой бактерией. Первичный корень растений, обработанный бактерией, был длиннее (статистически значимо, $p < 0,05$), чем при контрольных обработках (фиг. 4).

Количество боковых корней и количество корневых волосков было значительно больше, чем при контрольной обработке ($p < 0,05$), как показано на фиг. 5 и фиг. 6. Следовательно, нанесение *Pseudoxanthomonas indica* увеличивало площадь поверхности корней и поэтому возможность всасывания питательных веществ.

Пример 10. Исследование способности *Pseudoxanthomonas indica* индуцировать экспрессию маркеров иммунного ответа в *Arabidopsis thaliana*, *Pseudoxanthomonas indica* и томатах.

Исследование для *Arabidopsis thaliana*.

Семена *A. thaliana* инкубировали в воде при 4°C в течение 4 дней; затем их высевали в субстрат песок:торф (1:1). После 6 недель прорастания их пересаживали в небольшие горшки, содержащие субстрат такого же состава. Через неделю горшки случайным образом разделяли на 2 группы. Первую группу обрабатывали бактериями штамма Н32 в количестве 1 мл на растение суспензией, содержащей 10⁹ CFU/мл в физиологическом растворе. Вторую группу (контроль) обрабатывали только с помощью 1 мл физиологического раствора. Проводили 4 нанесения с промежутками по 7 дней. Через 2 ч после последнего нанесения собирали образцы листьев и корней растений после каждой обработки и сразу замораживали в жидком азоте.

Экспрессию генов PR1 (маркер иммунного ответа, опосредуемого салициловой кислотой) и PDF1.2 (маркер иммунного ответа, опосредуемого жасмоновой кислотой) определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном масштабе времени (RT-qPCR). Ген убиквитина использовали в качестве внутреннего контроля. Как показано на фиг. 7, в листьях растений, обработанных бактериями штамма Н32, наблюдалось увеличение экспрессии гена PDF1.2 по сравнению с экспериментальным контролем. Степень экспрессии гена PR1 не отличалась от наблюдающейся в контрольной группе. Поэтому бактерии вида *Pseudoxanthomonas indica* индуцировали экспрессию PDF1.2 системным путем, что описано, как механизм защиты, связанный с резистентностью по отношению к заражению нематодами.

Исследование томатов.

Задачей исследования являлось определение способности *Pseudoxanthomonas indica* модулировать иммунный ответ в томатах (*Solanum lycopersicum*) на системном уровне. Бактерии штамма Н32 наносили в виде суспензии клеток при содержании 10⁹ CFU/мл на ризосферу растения. Образцы отбирали через 12 ч, 3 дня и 7 дней после нанесения бактерии. В каждом случае образцы отбирали случайным образом с 6 растений для каждой обработки. Растения распределяли на 2 группы для выравнивания изменений. После отбора образцы сразу замораживали в жидком азоте и хранили до обработки. Методику RT-qPCR использовали для определения относительной экспрессии защитных генов фенилаланинаммонийлиазы (PAL), глутатионпероксидазы (GPx), осмотина, хитиназы, гидропероксидлиазы (HPL), алленоксидсинтазы (AOS) и PR1 в листьях. Актин использовали в качестве внутреннего контроля для анализа.

На фиг. 8 показано, что *Pseudoxanthomonas indica* может на ранней стадии взаимодействия с растением индуцировать экспрессию генов осмотина, HPL, хитиназы, GPx и PAL. Кроме того, подавление гена PR1 наблюдалось через 12 ч и 3 дня после нанесения бактерии на растения, а также сверхэкспрессия того же гена через 7 дней по сравнению с растениями контрольной группы. Экспрессия гена AOS в исследованный период не увеличивалась по сравнению с контролями. Результаты свидетельствуют о том, что *Pseudoxanthomonas indica* может модулировать иммунную систему растений для благоприятства-

ния резистентности по отношению к воздействию патогенов.

Пример 11. Приготовление препарата *Pseudoxanthomonas indica* и демонстрация его стабильности.

Готовили препарат, содержащий концентрат *Pseudoxanthomonas indica* штамм Н32 в качестве активного ингредиента, экстракт дрожжей в качестве источника органического вещества, обогащенного аминокислотами, витаминами и факторами роста, поверхностно-активным веществом и водой. Конечный состав препарат включал экстракт дрожжей (70,4%); сахарозу (1,4%); Glanapon DG-1578™ (3,2%) и сухую биомассу (20%) микроорганизма *Pseudoxanthomonas indica*. В композиции концентрация бактерии составляла 10^9 - 10^{10} CFU/мл. Остаточная влажность композиции равнялась 5,0%. Проводили исследование стабильности 3 партий препарата в реальном масштабе времени для определения количества жизнеспособных клеток и нематоцидной активности по отношению к фитонематодам *Meloidogyne incognita*, в горшках при хранении препарата в течение 6 и 12 месяцев.

В табл. 7 приведены количества жизнеспособных клеток и ТЕ препарата для указанных периодов времени. Показано, что препарат или композиция биологической борьбы с фитонематодами стабилен в течение не менее 12 месяцев.

Таблица 7

Исследование стабильности препарата

| Характеристика | 0 месяцев | 6 месяцев | 12 месяцев |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Количество жизнеспособных клеток | $(5,0 \pm 0,3) \times 10^{10}$ | $(2,2 \pm 0,6) \times 10^{10}$ | $(9,2 \pm 0,7) \times 10^9$ |
| Биологическая активность (ТЕ* (%)) | 75,32 | 73,7 | 68,0 |

ТЕ*: Техническая эффективность

Пример 12. In vivo исследование нематоцидного воздействия *Pseudoxanthomonas indica* на 3 вида фитонематод.

Процедуру проводили в сооружении для защиты растений для исследования in vivo нематоцидного воздействия препарата, описанного в примере 11, на виды *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria* и *Radopholus similis*. Исследования с использованием видов *Meloidogyne incognita* и *Meloidogyne arenaria* проводили на растениях томата (*Solanum lycopersicum*) и исследование с использованием *Radopholus similis* проводили на бананах (*Musa spp.*). Саженьцы банана и томата пересаживали в горшки, содержащие 2 кг субстрата песок:торф (1:1). Перед пересадкой инокулировали яиц 3000 *Meloidogyne incognita*, 3000 или *Meloidogyne arenaria* образцов *Radopholus similis*. При исследованиях *Meloidogyne incognita* и *Meloidogyne arenaria* используемая схема включала 2 нанесения: первое через 3 дня после заражения субстрата; и второе через 14 дней после пересадки. Через 35 дней после пересадки растения собирали и определяли степень заражения. Для банана, зараженного с помощью *Radopholus similis*, проводили 3 нанесения: через 15, 49 и 63 дней. Через 80 дней после пересадки определяли количество нематод на 100 г корней. На основании этих результатов в двух партиях определяли ТЕ препарата *Pseudoxanthomonas indica*. Как показано в табл. 8, бактерия была эффективной для трех использованных видов нематод.

Таблица 8

Техническая эффективность препарата *Pseudoxanthomonas indica* для некоторых видов фитонематод

| Фитонематоды | ТЕ* (%) |
|------------------------------|---------|
| <i>Meloidogyne incognita</i> | 78,45 |
| <i>Meloidogyne arenaria</i> | 75,89 |
| <i>Radopholus similis</i> | 79,65 |

ТЕ*: Техническая эффективность

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция биопестицида, обладающая прямым действием против яиц и личинок фитопатогенных нематод, содержащая суспензию или концентрат *Pseudoxanthomonas indica* в концентрации 10^9 - 10^{10} CFU/мл и инертные наполнители или разбавители.

2. Композиция биопестицида по п.1, содержащая суспензию или концентрат живых *Pseudoxanthomonas indica*.

3. Композиция биопестицида по п.1, которая дополнительно содержит стабилизирующие соединения, усилители, активаторы против нематоцидной активности или покрытия для семян.

4. Композиция биопестицида по п.1, где композиция приготовлена как предварительно упакованное твердое вещество, порошок, жидкость, суспензия, гранулят, препарат для небулайзера или капсулиро-

ванный продукт.

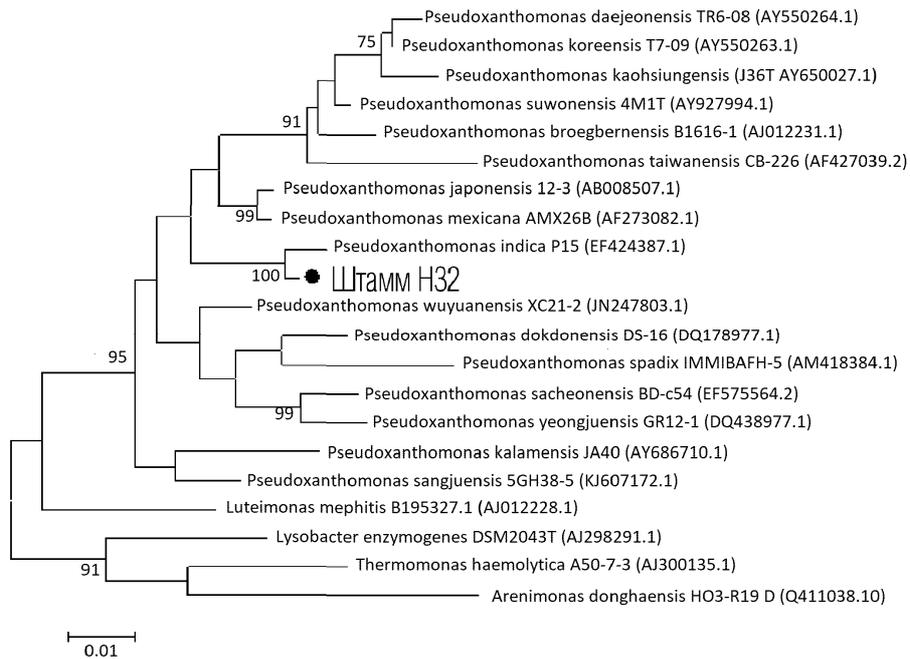
5. Применение *Pseudoxanthomonas indica* для приготовления композиции биопестицида по п.1 для снижения степени зараженности фитопатогенными нематодами *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria* и *Radopholus similis* путем прямого действия.

6. Применение по п.5, где указанная композиция содержит суспензию или концентрат живых бактерий *Pseudoxanthomonas indica*.

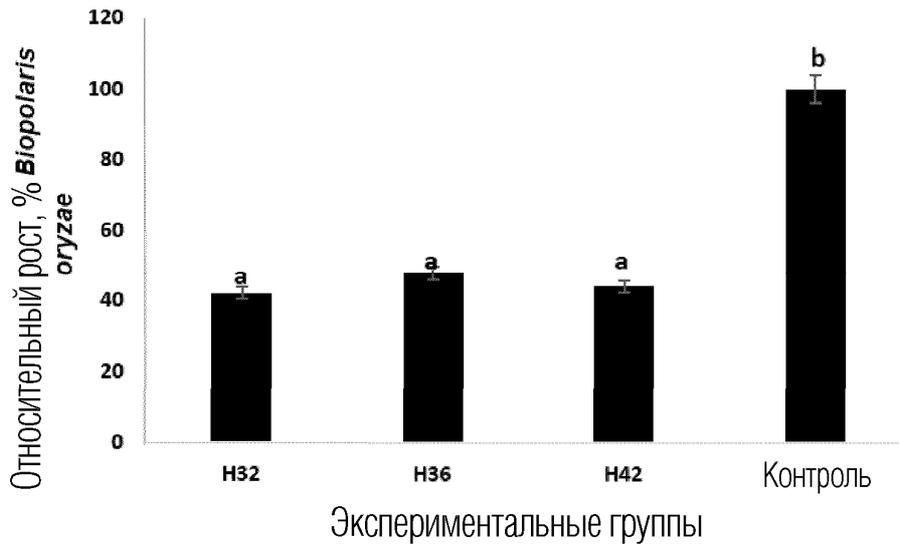
7. Применение по п.5, где композицию готовят как предварительно упакованное твердое вещество, порошок, жидкость, суспензию, гранулят, препарат для небулайзера или капсулированный продукт.

8. Способ снижения степени заражения фитопатогенными нематодами *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria* и *Radopholus similis*, включающий нанесение эффективного количества композиции биопестицида по любому из пп.1-5 в почву.

9. Способ по п.8, где композицию готовят как предварительно упакованное твердое вещество, порошок, жидкость, суспензию, гранулят, препарат для небулайзера или капсулированный продукт.



Фиг. 1

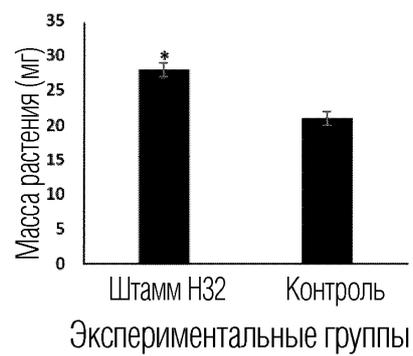


Фиг. 2

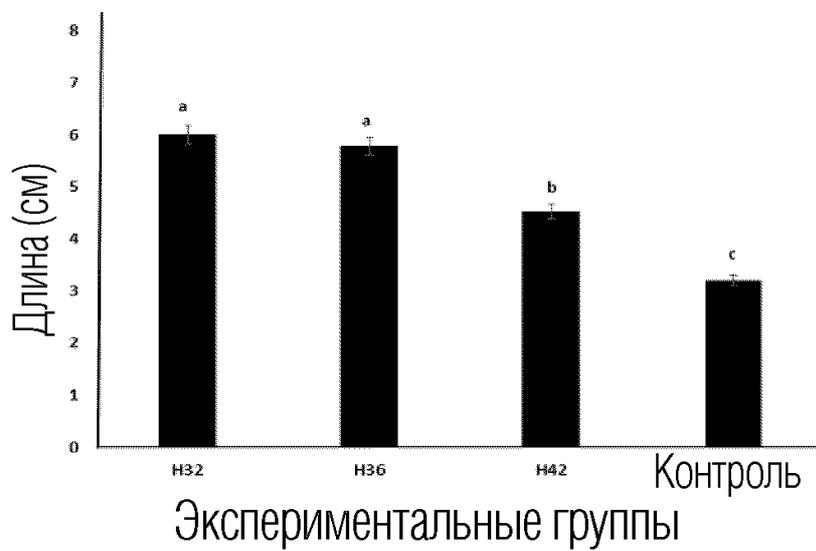
А



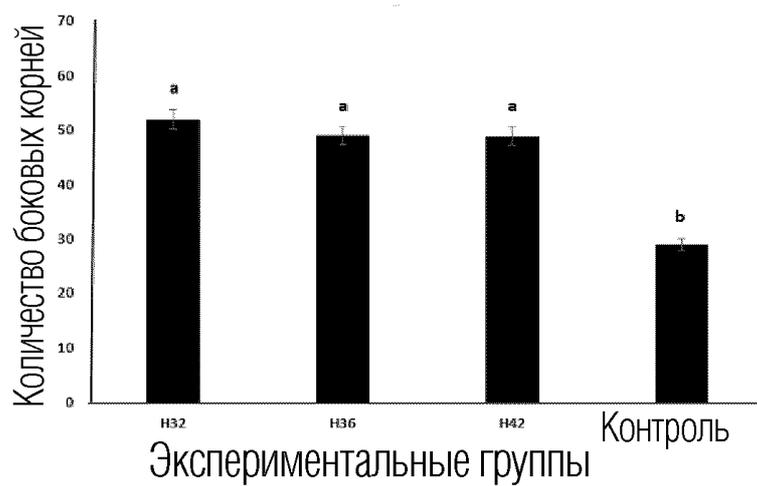
В



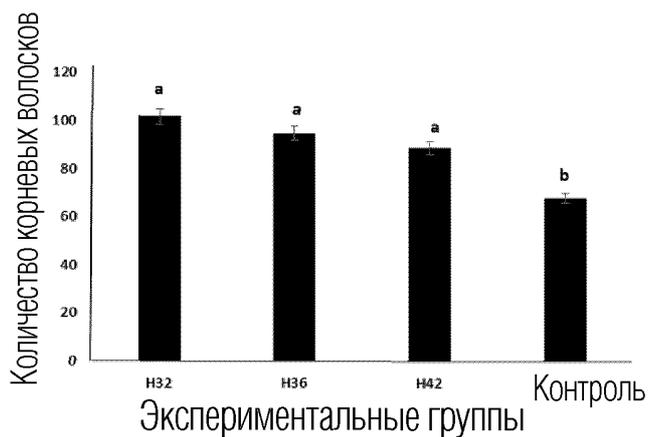
Фиг. 3



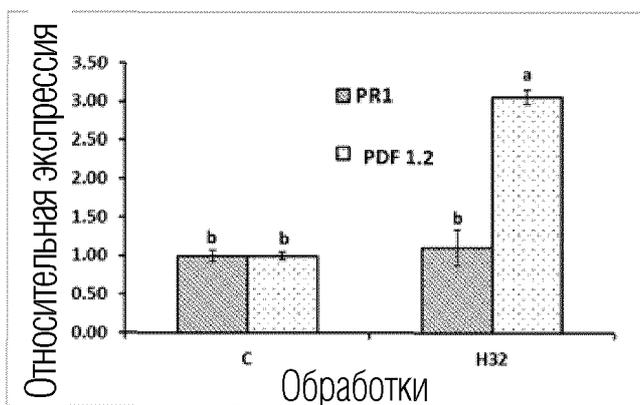
Фиг. 4



Фиг. 5

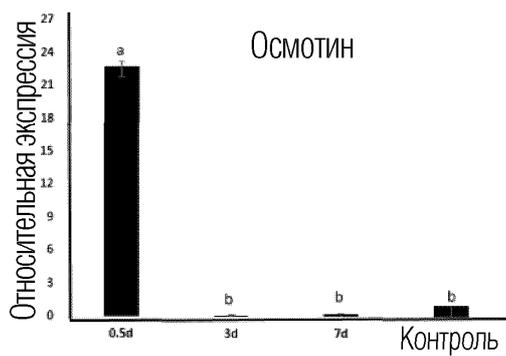


Фиг. 6



Фиг. 7

A



B

