

# Выделение эндофитных фосфатсолюбилизирующих бактерий, колонизирующих внутренние ткани сои и озимой пшеницы

Екатерина Соловьева, Зинаида Алещенкова

*Институт микробиологии НАН Беларуси*

Экологически чистым способом повышения продуктивности сельскохозяйственных культур является применение микробных препаратов, в основе которых природные штаммы микроорганизмов, улучшающие азотное и фосфорное питание растений, обеспечивающие защиту от биотических и абиотических стрессовых факторов. Помимо широкого использования ризосферных микроорганизмов, перспективными объектами являются эндофитные бактерии, обитающие во внутренних тканях растения, не вызывая его заболеваний и не оказывая отрицательного влияния на развитие. В связи с этим целью наших исследований был поиск, выделение и отбор эффективных штаммов эндофитных фосфатсолюбилизирующих бактерий сои и озимой пшеницы в почвенно-климатических условиях Беларуси с целью их использования в качестве инокулянтов растений. Из 102 выделенных культур эндофитных бактерий сои и озимой пшеницы отобраны 2 штамма *Pantoea agglomerans* 6SK и *Pseudomonas fluorescence* 11E, обладающие высокой фосфатсолюбилизирующей, ростстимулирующей, колонизирующей способностью и антагонистической активностью в отношении возбудителей бактериозов зерновых и бобовых культур. Отмеченные бактериальные культуры являются перспективными объектами при создании микробных препаратов комплексного действия.

*Эндофитные бактерии, солюбилизация фосфатов, антимикробная активность*

## Введение

В последнее время в мировой практике большое внимание уделяется экологически безопасным агротехнологиям, сокращающим внесение высоких доз минеральных удобрений, пестицидов, регуляторов роста растений и др. Достойное место среди них занимает использование микробных препаратов комплексного действия, способных защищать растения от фитопатогенов, оказывать ростстимулирующее воздействие.

Перспективной для растениеводства группой микроорганизмов являются эндофитные бактерии, колонизирующие внутренние ткани растения, не вызывая его заболеваний и не оказывая отрицательного влияния на развитие. Эндофитные бактерии способны улучшать фосфорное питание растений, продуцировать ИУК и сидерофоры. Было показано, что эндофитные бактерии способны продуцировать витамины, необходимые для растений (Ryan et al., 2007). Кроме того, было обнаружено, что эндофитные бактерии обладают целым рядом дополнительных свойств, необходимых для улучшения развития растений, таких как: регуляция осмотического давления, работы устьиц, азотного питания растения, развития корневой системы и т.д. (Lodewyckx et al., 2002, Shukla et al., 2014).

Эндофитные бактерии способны уменьшать или предотвращать отрицательное воздействие фитопатогенных микроорганизмов на растения. Предполагается, что определенные виды эндофитных бактерий запускают защитные механизмы растений, известные как индуцированная системная устойчивость (ISR), которая схожа с приобретенной системной устойчивостью (SAR) (Stepniowska, 2013).

Таким образом, бактериальные эндофиты являются потенциальными кандидатами для создания инокулянтов, стимулирующих рост и развитие растений.

В связи с этим целью нашей работы был поиск, выделение и отбор эффективных штаммов эндофитных фосфатсолюбилизирующих бактерий сои и озимой пшеницы в почвенно-климатических условиях

Беларуси с целью их использования в качестве инокулянтов растений.

*Растительные объекты:* соя (*Glycine max.*) сорта «Ясельда», озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта «Могилевская».

*Микробиологические объекты:* изоляты эндофитных бактерий, выделенные из растительных образцов (корни, стебель, листья, семена).

## Методика исследования

Выделение бактериальных эндофитов проводили из внутренних тканей растений, отобранных в период их активного роста и развития в агроценозе сои и озимой пшеницы (Минская область). Растительные образцы поверхностно стерилизовали (Solovyova, 2017) и растирали в ступке, готовили суспензию для микробиологического посева на агаризованные селективные среды (Эшби и глюкозо-аспарагиновая) (Теппер, 2004).

Выделение и отбор активных фосфатсолюбилизирующих эндофитных бактерий проводили по способности изолятов к образованию зон «гало» (Yasmin et al., 2009).

Для установления детерминант, определяющих азотфиксирующую активность, у отобранных изолятов определяли наличие в геноме *nifH* гена (Федоров и др., 2008). Суммарную ДНК выделяли СТАВ – методом. Для амплификации фрагмента *nifH* гена были использованы праймеры *nifH-1F* и *nifH-1R*. Состав реакционной смеси для праймеров: 1x буфер для Tag-полимеразы (Праймтех, Беларусь), 0,2 ммоль каждого из дНТФ (Праймтех), 2 ммоль  $MgCl_2$ , 0,4 пмоль каждого праймера (Праймтех, Беларусь) и 0,5 ед. ДНК-полимеразы (Праймтех, Беларусь). Разделение ДНК на фрагменты, соответствующие последовательностям *nifH* гена, проводили при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл).

Антагонистические свойства отобранных изолятов эндофитных бактерий по отношению к фитопатогенным микроорганизмам изучали методом штриха (Сэги, 1983) на агаризованной картофельно-глюкозной среде (Теппер, 2004). В качестве тест-

культур использовали штаммы фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas phaseoli*.

Приживаемость отобранных эндофитных бактерий в ризосфере и эндосфере сои и озимой пшеницы и их влияние на рост и развитие растений изучали в модельном эксперименте с использованием генетически маркированных штаммов, устойчивых к рифампицину (отобранные спонтанные мутанты характеризовались устойчивостью к антибиотику в концентрации 150 мкг/мл).

Эффективность инокуляции семян сои и озимой пшеницы выделенными эндофитами оценивали в модельных условиях в сосудах с дерново-подзолистой почвой. Предпосевную обработку семян проводили культуральной жидкостью (КЖ) эндофитных бактерий, в контроле – стерильной водопроводной водой. Титр клеток КЖ составлял не менее  $2,0 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. Повторность опыта – 4-кратная.

Идентификацию наиболее эффективных изолятов эндофитных бактерий осуществляли на основании физиолого-биохимических свойств (Берджи, 1994), исследованных с помощью автоматизированной системы VITEK-2 (BioMérieux, Франция), и результатов анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерной программы «Microsoft Excel».

## Результаты и обсуждение

Ранее нами исследовано эндофитное микробное сообщество бобовых и зерновых культур (Картыжова и др., 2017). Установлено, что эндосфера растений сои в фазу бутонизации – цветения представлена микроорганизмами различных эколого-трофических групп, сосредоточенными в большей степени в листьях (82 %). Эндофитные микроорганизмы озимой пшеницы в фазу цветения распределены следующим образом: в корнях (55 %), листьях (45 %).

Из поверхностно стерилизованных растительных образцов изолированы 102 культуры эндофитных бактерий, растущих на селективных средах (Эшби и глюкозо-аспарагиновая). У отобранных изолятов была изучена фосфатсольбилизирующая (ФСБ) и азотфиксирующая способность.

Установлено, что максимальной ФСБ способностью, определяемой по диаметру зон «гало», обладали 11 изолятов эндофитов сои и пшеницы. Наиболее активными были 4 изолята (№1, 4, 6, 11), характеризующиеся наличием зоны «гало» размером 2-20 мм в зависимости от периода культивирования бактерий. Наибольшую ФСБ способность проявлял изолят №11.

Молекулярно-генетический анализ не выявил наличия *nifH* гена в геноме отобранных фосфатсольбилизирующих изолятов (№1, 4, 6, 11).

Оценка антимикробной активности изучаемых изолятов показала, что максимальной антагонистической активностью в отношении фитопатогенных бактерий обладали изоляты №6 и

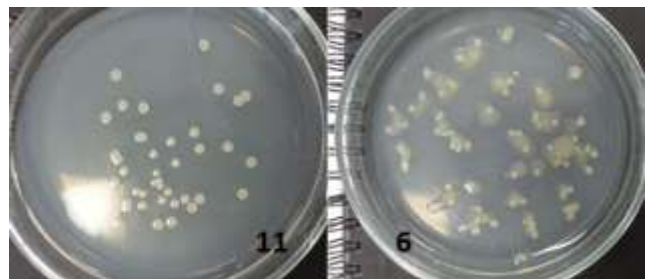
№11. Зона подавления роста тест-культуры *Xanthomonas phaseoli* изолятами №6 и №11 составляла 6 и 13 мм, *Pseudomonas syringae* – 6 и 11 мм соответственно. Изоляты №1 и №4 не влияли на рост бактериальных патогенов.

Известно, что эффективность штаммов-интродуцентов зависит от приживаемости культур в ризосфере и эндосфере растений. Дальнейшие наши исследования были направлены на установление способности к колонизации выделенными эндофитами ризосферы и эндосферы растений сои и озимой пшеницы. Интродуцированные бактериальные эндофиты пшеницы и сои (№1, 4, 6, 11) активно заселяли как ризосферу, так и ризоплану растений, что свидетельствует о высокой колонизирующей активности штаммов. Максимальная численность интродуцированных антибиотикорезистентных штаммов эндофитных бактерий установлена в ризосфере растений и составила  $(0,2-2,2) \cdot 10^7$  КОЕ/г. Содержание эндофитов в ризоплане растений находилось в пределах  $(0,5-1,5) \cdot 10^4$  КОЕ/г корней.

Инокуляция семян зерновых и бобовых культур отобранными изолятами №1, 4, 6, 11 стимулировала рост и развитие растений в модельных условиях. Монообработка семян пшеницы и сои эндофитными фосфатсольбилизирующими бактериями положительно влияла на формирование корневой системы растений. Длина корней на стадии всходов в среднем в 2,0 раза превосходила показатели растений в контроле. Интродукция исследуемых бактериальных культур в эндосферу растений способствовала увеличению их высоты в среднем на 10%.

По признаку максимальной фосфатсольбилизирующей, антагонистической, ростстимулирующей и колонизирующей активности отобраны для дальнейшей работы по созданию инокулянтов растений изоляты №6 и №11.

Для идентификации отобранных бактериальных культур проводилось изучение их морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических свойств. На агаризованной питательной среде изоляты №6 и №11 образовывали слизистые колонии молочно-белого цвета диаметром 2-5 мм (рисунок 1).



**1 рис.** Характер роста наиболее активных фосфатсольбилизирующих изолятов эндофитных бактерий (№6, №11) на агаризованной питательной среде

Физиолого-биохимические свойства отобранных изолятов эндофитных бактерий (№6 и №11) представлены в таблице 1.

**1 таблица.** Основные физиолого-биохимические свойства эффективных эндофитных бактерий

Свойства	Изоляты	
	№6	№11
Окраска по Граму	-	-
Пигментообразование	+ (желтый)	+ (желто-зеленый)
Оксидаза	-	+
Каталаза	+	+
Источники углерода для роста:		
D-глюкоза	+	+
D-целлобиоза	-	-
D-мальтоза	+	-
D-маннит	+	+
D-манноза	+	+
D-сорбит	-	+
Сахароза	+	+
D-тагатоza	-	-
D-трегалоза	+	+
Уреаза	-	-
Фосфатаза	+	-
Липаза	-	-
Образование сероводорода	-	-
Глицинариламидаза	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-
Лизиндекарбоксилаза	-	-

На основании морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических свойств изоляты №6 и №11 идентифицированы как *Pantoea agglomerans* 6SK и *Pseudomonas fluorescence* 11E соответственно.

Таким образом, отобранные штаммы эндофитных бактерий *Pantoea agglomerans* 6SK и *Pseudomonas fluorescence* 11E, обладающие комплексом хозяйственно-ценных свойств, являются перспективными объектами для создания инокулянтов сельскохозяйственных культур.

Ekaterina Solovyova, Zinaida Aleschenkova

#### Isolation of endophytic phosphate-solubilizing bacteria colonizing internal tissues of soybean and winter wheat

##### Summary

Ecologically safe method of increasing cultivar productivity is application of biopreparations based on native microbial strains upgrading nitrogen and phosphorus nutrition of plants and protecting them from biotic and abiotic stress factors. Apart from widely used rhizospheric microorganisms, endophytic bacteria inhabiting plant internal tissues appear extremely attractive in this respect because they will not cause pathologies and any adverse effects. As a result our studies were focused on search, isolation and screening of efficient strains of endophytic phosphate-solubilizing bacterial cultures in soybean and winter wheat crops tilled in agroclimatic conditions of Belarus to be further used as plant inocula. 2 strains *Pantoea agglomerans* 6SK and *Pseudomonas fluorescence* 11E selected from 102 isolates of endophytic bacteria from soybean and winter wheat cultures possessed elevated phosphate-solubilizing, growth-stimulating, colonizing capacity and antagonistic activity against pathogens responsible for bacterial diseases of grain and legume crops. The selected variants are promising potential constituents of complex microbial preparations.

*Endophytic bacteria, solubilizing of phosphates, antimicrobial activity*

Получено в феврале 2018 г., подписано в печать в апреле 2018 г.

**Екатерина СОЛОВЬЕВА.** Кандидат биологических наук, научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. +37529-3959308, адрес эл. почты: [ekatya@tut.by](mailto:ekatya@tut.by)

**Ekaterina SOLOVYOVA.** PhD, Institute of Microbiology, National Academy of Sciences (NAS), researcher. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. +37529-3959308, e-mail: [ekatya@tut.by](mailto:ekatya@tut.by)

**Зинаида АЛЕЩЕНКОВА.** Доктор биологических наук, главный научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. 8017-2659967, адрес эл. почты: [aleschenkova@mbio.bas-net.by](mailto:aleschenkova@mbio.bas-net.by)

**Zinaida ALESCHENKOVA.** Institute of Microbiology, National Academy of Sciences (NAS), doctor of biological sciences, principal researcher. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. 8017-2659967, e-mail: [aleschenkova@mbio.bas-net.by](mailto:aleschenkova@mbio.bas-net.by)

#### Выводы

Из внутренних тканей сои и озимой пшеницы выделены, изучены и отобраны 2 перспективных для сельского хозяйства штамма эндофитных бактерий *Pseudomonas fluorescence* 11E и *Pantoea agglomerans* 6SK, характеризующиеся фосфатсолубилизирующей, ростстимулирующей, колонизирующей способностью и антагонистической активностью в отношении возбудителей бактериозов зерновых и бобовых культур.

#### Литература

- HOLT, JG., KRIEG, NR., SNEATH, PH. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Baltimore, 1994, 787 p.
- LODEWYCKX C., VANGRONSVELD, J., PORTEOUS, F. et al. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical reviews in plant sciences*, 2002, Vol. 21, Iss. 6, p. 583–606.
- RYAN, RP., GIRI, R., SAINI, R. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 2007, Vol. 2, Iss. 7, p. 1–9.
- SHUKLA, ST., HABBU, PV., KULKARNI, VH. et al. Endophytic microbes: A novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. *Asian Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2014, Vol. 2, Iss. 3, p. 1–16.
- SOLOVYOVA, E., KARTYZHOVA, L., Z. ALESCHENKOVA, Z. Optimization of plant sample sterilization for isolation of endophytic microbial species. *Human and nature safety: proceedings of international scientific conference. LŽŪU. Akademija*, 2017, p. 172–174.
- STEPNIEWSKA, Z., KUZNIAR, A. Endophytic microorganisms — promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, Vol. 97, Iss. 22, p. 9589–9596.
- YASMIN, F., OTHMAN, R., SUJAM, K. et al. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *African J. of Microbiology Research*, 2009, Vol. 3, Iss. 11, p. 815–821.
- КАРТЫЖОВА, ЛЕ, АЛЕЩЕНКОВА, ЗМ, СОЛОВЬЕВА, ЕА, ШАВЕЙКО, ИВ. Эндофитное микробное сообщество сои и озимой пшеницы. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*: сб. науч. тр. Минск, 2017, Т. 9, с. 191–201.
- СЭГИ, Й. *Методы почвенной микробиологии*. Минск, 1983, 296 с.
- ТЕППЕР, ЕЗ., ШИЛЬНИКОВА, ВК., ПЕРЕВЕРЗЕВА, ГИ. *Практикум по микробиологии*. Москва, 2004, 256 с.
- ФЕДОРОВ, ДН., ИВАНОВА, ЕГ., ДОРОНИНА, НВ. и др. Новая система выродженных олигонуклеотидных праймеров для детекции и амплификации pifHD генов. *Микробиология*, 2008, Том 77, №2, с. 286–288.