

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОФИТОВ МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA* L. VAR. *SATIVUS*)

Эндофитные бактерии были выделены из 44 поверхностно стерилизованных корнеплодов моркови. Двадцать пять изолятов из 63 различались по RAPD-профилю. Из них семь обладали антагонистической активностью в отношении грибов рода *Fusarium*, девять растворяли неорганические фосфаты и девять синтезировали ауксины от 1,59 до 15,38 мкг/мл. Восемь изолятов принадлежали к семейству *Enterobacteriaceae* (род *Enterobacter* и *Pantoea*), четыре – к роду *Pseudomonas* и один – к роду *Bacillus*.

Ключевые слова: бактериальные эндофиты, PGPB, антагонистическая активность, ауксины, растворение фосфатов, сидерофоры.

Введение

В последнее десятилетие особое внимание микробиологов привлекают эндофитные бактерии, изолируемые из поверхностно стерилизованных (внутренних) растительных тканей. Растущий интерес к этим микроорганизмам связан не только с возможностью их использования в растениеводстве, но и в связи с распространением среди них возбудителей инфекционных болезней человека. Согласно определению Vai с соавторами [1] к эндофитам относятся микроорганизмы, колонизирующие внутренние растительные ткани, поддерживающие рост и развитие растений и не вызывающие у них болезней.

Среди эндофитов обнаружено большое количество штаммов, способных защищать растения от фитопатогенов, а так же положительно влиять на рост растений за счет синтеза ИУК, АЦК-деаминазы и растворения фосфатов [2], [3]. Инокуляция растений такими бактериями вызывает эффекты, сопоставимые с обработкой синтетическими стимуляторами роста, применением минеральных удобрений, а также средств химической защиты от патогенов [4], [5]. Поскольку свойства микроорганизмов, заселяющих ткани различных растений, могут сильно отличаться, представляет большой интерес изучение эндофитов, присутствующих в культурных растениях с целью их возможного последующего использования в биологических удобрениях и средствах защиты растений.

Целью работы являлось выделение бактериальных эндофитов из корнеплодов моркови, изучение их разнообразия и выявление таких хозяйственно-полезных признаков, как антагонистическая активность по отношению к фито-

патогенам, синтез ауксинов и сидерофоров и способность растворять неорганические фосфаты.

Материалы и методы

Технически зрелые (100 дней после посева) корнеплоды моркови сорта «Московская зимняя» отмывали от почвы, стерилизовали в 3% растворе гипохлорита натрия в течение получаса, затем промывали стерильной водой. После этого из центра верхней, средней и нижней частей корнеплода вырезали диски толщиной 2 см, выкладывали в чашки Петри с картофельно-глюкозным агаром и инкубировали трое суток при температуре 27°C. Всего было проанализировано 132 диска из 44 корнеплодов. Выросшие колонии изолятов суспендировали в стерильном растворе 0,15M NaCl и титровали до единичных колоний, из которых затем при помощи *Chelix* выделяли ДНК и проводили RAPD-PCR со случайно подобранным праймером *Lmbd* (GGG CGC TG).

Фунгистатическая активность изолятов бактерий в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum*, *F.avenaceum* и *F.sporotrichioides* оценивалась методом двойной культуры [6]. Для проверки способности микроорганизмов синтезировать сидерофоры (низкомолекулярные органические вещества, способные образовывать стабильный комплекс с железом), использовали среду с хромазуролом [7]. Фосфат-мобилизирующая активность проверялась на среде Муромцева [8].

Для изучения способности микроорганизмов синтезировать ауксины их выращивали на среде DYGS с добавлением 1 мг/мл D,L-триптофана в течение 5 суток, после чего культуру центрифугировали 5 мин при 1300 об/мин, затем к супернатанту добавляли реактив Сальковского. Определение уровня ауксинов в супернатан-

те проводили колориметрическим методом по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов ИУК с концентрацией 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 мкг/мл [9].

Для отдельных изолятов бактерий была проведена идентификация путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, амплифицированных при помощи праймеров DlongF (состав: CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC) и DlongR (состав: CCG AAT TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G) и сравнения полученных последовательностей нуклеотидов с гомологичными из базы данных NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Результаты и обсуждение

Бактерии были обнаружены в тридцати семи корнеплодах из сорока четырех (84%). После инкубирования тканей растений на питательной среде было выделено 63 изолята бактерий, 20 из нижних, 23 из средних и 20 из верхних частей корнеплодов. Грибных эндофитов обнаружено не было. 25 изолятов различались по RAPD-профилю (рис 1). Они были использованы для дальнейших экспериментов.

Таблица 1. Ингибирование роста грибов различными бактериальными изолятами (%)

№ изолята	Грибы		
	<i>F.avenaceum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F.sporotrichioides</i>
5	66	–	33
8	41	–	50
11	71	–	41
14	72	14	53
20	56	23	33
21	–	28	25
23	–	23	–

Одним из ключевых хозяйственно-полезных свойств эндофитов по отношению к растениям является их способность подавлять рост фитопатогенов. Семь из исследованных нами изолятов обладали антагонистической активностью по отношению к грибам рода *Fusarium* (табл. 1). Ингибирование роста *F.avenaceum* в двойной культуре составило 41-72%, *F. oxysporum* – 14–28%, *F.sporotrichioides* – 25–53%.

Синтез ауксинов, а также улучшение минерального питания растений повышением доступности неорганических фосфатов путем их солюбилизации в почве являются одними из свойств, обуславливающих ростостимулирующую способность эндофитов. Среди исследованных нами изолятов девять были способны растворять фосфаты, причем три из них так же синтезировали от 15,04 до 15,38 мкг/мл ауксинов (таб.2). В дальнейшем планируется изучить способность этих микроорганизмов непосредственно влиять на рост растений.

Нами были идентифицированы отдельные изоляты, обладающие хозяйственно-полезными признаками. Среди них восемь принадлежали к семейству *Enterobacteriaceae* (род *Enterobacter* и *Pantoea*), четыре – к роду *Pseudomonas* (табл. 2). Ранее энтеробактерии, способные стимулировать рост растений были обнаружены в кукурузе [10] и тополе [11]. Среди эндофитов с анагонистической активностью один изолят, выделяющий сидерофоры, был идентифицирован нами как *Bacillus subtilis*.

Заключение

Таким образом, среди исследованных эндофитов моркови нами было выявлено несколько изолятов, обладающих хозяйственно-полезными признаками. Большинство из них относилось к семейству энтеробактерий. В дальней-

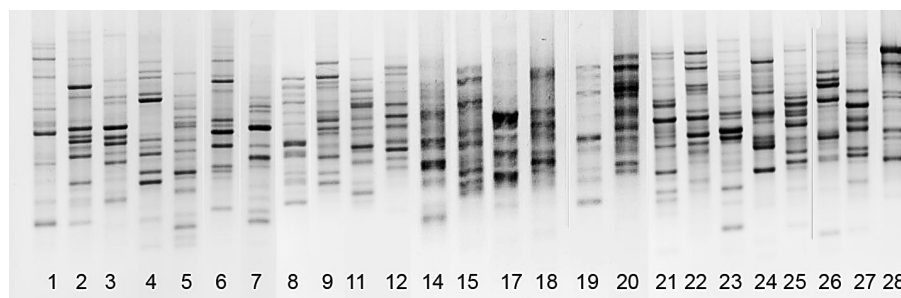


Рисунок 1. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов эндофитов моркови

Таблица 2. Видовая принадлежность и характеристики отдельных эндофитов моркови

№ изолята	Бактерии	Антагонистическая активность	Синтез сидерофоров	Фосфатмобилизирующая активность	Синтез ауксинов (мкг/мл)
2	<i>Enterobacter</i> sp.	–	–	+	–
5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	–	–	3,24
6	Не определен	–	–	+	15,38
8	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	–	–
11	Не определен	+	–	–	–
12	<i>Enterobacter</i> sp.	–	–	+	15,04
14	<i>Enterobacter</i> sp.	+	–	+	1,59
15	<i>Pseudomonas</i> sp.	–	–	+	6,44
17	<i>Pseudomonas</i> sp.	–	–	–	2,10
18	<i>Enterobacter cloacae</i>	–	–	+	–
19	<i>Enterobacter aerogenes</i>	–	–	+	15,17
20	<i>Pseudomonas oryzae</i>	+	–	+	–
21	<i>Enterobacter</i> sp.	+	–	–	–
23	<i>Pantoea</i> sp.	+	–	+	7,16
26	<i>Pseudomonas</i> sp.	–	–	–	1,94

шем планируется изучение непосредственного влияния данных микроорганизмов на рост и устойчивость растений к болезням.

17.09.2014

Работа выполнена на основе ФЦП №14.604.21.0016

Список литературы:

- Bai Y., Zhou X., Smith D.L. Enhanced soybean plant growth resulting from co inoculation of Bacillus strains with Bradyrhizobium japonicum. Crop science. 2003. 43 (5): 1774-1781.
- Mitter B, Brader G., Afzal M. et al. Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil and bacteria. Adv Agron. 2013. 121: 381–445.
- Dudeja S. S., Giri R. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. African Journal of Microbiology Research. 2014. 8(15): 1562-1572.
- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. Microbial Ecology. 2009. 58 (4):921-929.
- Sundaramoorthy S., Balabaskar P. Consortial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria for the management of early blight of tomato incited by Alternaria Solani. J Plant Pathol Microb. 2012. 3 (145): 1-4.
- Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytologist. 1987. 107: 127-142.
- Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry. 1987. 160 (1): 47-56.
- Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 162 с.
- Yasmin F., Othman, R., Sijam K., Saad M. S. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. African Journal of Microbiology Research. 2010. 3 (11): 815-821.
- Ogbo F., Okonkwo J. Some Characteristics of a Plant Growth Promoting Enterobacter sp. Isolated from the Roots of Maize. Advances in Microbiology. 2012. 2 (3): 368-374
- Taghavi S. et al. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium Enterobacter sp. 638. PLoS genetics. 2010. 6 (5): e1000943.

Сведения об авторах:

Благова Дарья Константиновна, научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, кандидат биологических наук, e-mail: blagova_darya@mail.ru

Сарварова Елена Рафисовна, аспирант лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, e-mail: sarvarova_lena@mail.ru

Хайруллин Рамиль Магзинурович, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор, e-mail: krm62@mail.ru
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71