

РОСТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ *Rhizobium leguminosarum*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ ЮЖНОГО УРАЛА

Одним из перспективных методов развития экологически-ориентированного земледелия является использование PGPR микроорганизмов. Они могут выступать в качестве эффективного стимулятора роста и, как следствие, урожайности растений путем улучшения минерального питания и защиты от фитопатогенов. Одной из наиболее важных и перспективных групп PGPR являются клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, которые широко применяются в сельском хозяйстве в качестве ассоциативных микросимбионтов для небобовых экономически значимых культур.

На ростостимулирующую активность были проверены штаммы *R. leguminosarum* LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008), PVu5, выделенные из бобовых растений Южного Урала на семенах растений огурца и физалиса. Показано, что штаммы *R. leguminosarum* LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008), PVu5 обладают ростостимулирующей активностью и могут быть использованы в качестве биоудобрений для физалиса и огурца в концентрации 10^7 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/мл. Кроме того, было обнаружено, что все штаммы обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенному грибу *F. solani* и оказывают положительный эффект на рост растений.

Таким образом, данные штаммы можно использовать в качестве биоудобрений для защиты полезных сельскохозяйственных культур от фитопатогенных грибов, а также для улучшения роста растений.

Ключевые слова: ризобии, PGPR, биоудобрения, *F. solani*.

В настоящее время существует несколько подходов к решению проблемы повышения урожайности сельскохозяйственных культур, среди которых экологически безвредным является применение ростостимулирующих ризобактерий (Plant growth promoting rhizobacteria – PGPR) [1], [2], [3]. Данные бактерии способны защитить растения от фитопатогенов и от негативного влияния окружающей среды, а также повышать урожайность и улучшать рост растений [4]. Среди PGPR-микроорганизмов наиболее важными и перспективными являются представители рода *Rhizobium* (клубеньковые бактерии), принадлежащие к семейству Rhizobiaceae. Это почвенные грамотрицательные бактерии, которые способны фиксировать азот из атмосферы, образуя клубеньки на корнях бобовых растений и вступая с ними в симбиоз [5], [6]. Ризобии, кроме того, могут выступать и в качестве ассоциативных микросимбионтов для многих экономически ценных небобовых культур, таких как рис, кукуруза, пшеница, рапс, томат, перец и т. д. [7]. Клубеньковые бактерии могут колонизировать корневую систему и повышать урожайность растений,

благодаря тому, что способны выделять ростостимулирующие вещества [8]. Кроме того, было обнаружено, что ризобии способны также проявлять защитные свойства. Противогрибковая активность ризобий включает в себя синтез антибиотиков, защитных ферментов, фунгистатических метаболитов и повышение экспрессии стресс-зависимых генов [9], [10]. Существуют штаммы ризобий, которые могут синтезировать антибиотики и бактериоцины. Они являются токсичными веществами и, таким образом, могут замедлять или даже останавливать рост определенных штаммов бактерий [11], [12]. Поэтому в настоящее время очень важным и перспективным направлением на пути создания экологически ориентированного сельского хозяйства является получение искусственных симбиотических ассоциаций ризобий с разными видами сельскохозяйственных культур, в том числе и с небобовыми растениями.

Целью данной работы являлось определение ростостимулирующей и фунгистатической активностей штаммов *R. leguminosarum* LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008), PVu5 на растениях огурца и физалиса.

Материалы и методы**Объекты исследования, бактериальные штаммы**

В данной работе объектами исследования были штаммы *R. leguminosarum* LSy10 (D18), выделенный из клубеньков чины лесной (*Lathyrus sylvestris*), *R. leguminosarum* LVe13 (Inz 2008), полученный из клубеньков чины весенней (*Lathyrus vernus*) и *R. leguminosarum* PVu5 - из клубеньков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) из коллекции бактерий Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН.

Для определения ростостимулирующей активности исследуемых штаммов были использованы растения физалиса овощного (*Physalis philadelphica*) сорта «Золотая россыпь» и огурца обыкновенного (*Cucumis sativus*) сорта «Деликатесный».

Для изучения антагонистических свойств бактерий был использован штамм фитопатогенного гриба *Fusarium solani*, вызывающий корневую гниль.

Методы исследования

Фунгистатическую активность исследуемых штаммов ризобий по отношению к фитопатогенному грибу *F. solani* определяли методом двойной культуры, описанной в работе [8].

Видовую принадлежность бактерий определяли с помощью анализа последовательности 16S рРНК [8].

Для экспериментов по изучению ростостимулирующей активности семена были стерилизованы как описано в работе [13]. Для

каждого варианта опыта использовалось по 50 проростков.

Вычисления среднего значения, стандартного отклонения и доверительного интервала проводили с помощью программы MS Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Филогенетическое положение выделенных бактерий было определено с помощью анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. По данным секвенирования было определено, что штаммы *R. leguminosarum* LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008), PVu5 филогенетически близки к представителям вида *R. leguminosarum*.

Для изучения влияния исследуемых штаммов *R. leguminosarum* LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008), PVu5 на корневую систему растений огурца и физалиса, семена обрабатывали бактериальными суспензиями в концентрациях 10^5 КОЕ/мл и 10^7 КОЕ/мл, а затем измеряли длину корня опытных проростков и сравнивали с длиной корня контрольных проростков.

Было определено, что средняя длина корней опытных растений огурца практически не зависела от концентрации бактериальной суспензии и оказалась больше длины корней контрольных (не обработанных) растений примерно в 2–2,5 раза в экспериментах со всеми штаммами (рис. 1).

В случае опытных растений физалиса, также обработанных штаммами ризобий в концентрациях 10^5 КОЕ/мл и 10^7 КОЕ/мл, длина

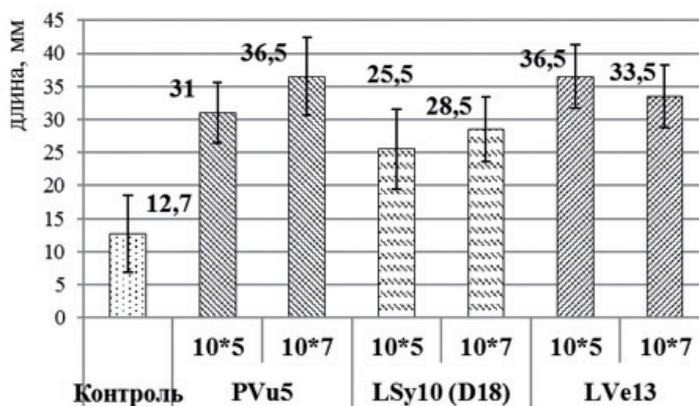


Рисунок 1 – Средняя длина корней опытных и контрольных растений огурца, обработанных штаммами *R. leguminosarum* PVu5, LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008)

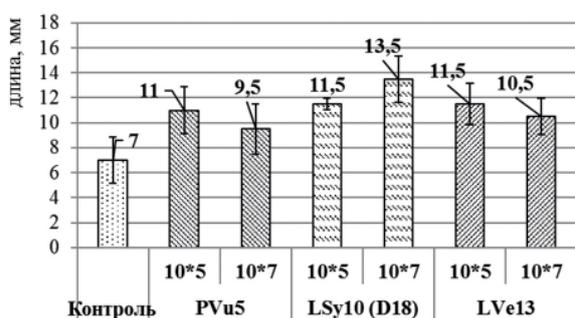


Рисунок 2 – Средняя длина корней опытных и контрольных растений физалиса, обработанных штаммами *R. leguminosarum* PVu5, LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008)

корней превосходила контроль в 1,5–2 раза вне зависимости от концентрации бактериальной суспензии (рис. 2). Наибольшее влияние на корневую систему физалиса оказал штамм *R. leguminosarum* LSy10 (D18) в концентрации 10⁷ КОЕ/мл – длина корней увеличилась в 2 раза, а на корневую систему огурца – штаммы *R. leguminosarum* LVe13 в концентрации 10⁵ КОЕ/мл и *R. leguminosarum* PVu5 в концентрации 10⁷ КОЕ/мл (средняя длина корней увеличилась в 2,5 раза по сравнению с контролем).

По литературным данным ризобии способны синтезировать ауксины, гиббереллины, цитокинины и этилен [14]. Вероятно, исследуемые штаммы ризобий синтезируют растительный гормон, который в свою очередь влияет на увеличение длины корней проростков растений огурца и физалиса.

Полученные результаты показали, что *R. leguminosarum* LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008), PVu5 обладают ростостимулирующей активностью и могут быть использованы в качестве удобрений для физалиса и огурца в концентрации 10⁷ КОЕ/мл и 10⁵ КОЕ/мл.

Было определено, что некоторые штаммы клубеньковых бактерий способны проявлять фунгистатическую активность по отношению к фитопатогенным грибам [15]. Нами был использован метод двойной культуры для определения у штаммов *R. leguminosarum* LSy10 (D18), LVe13 (Inz 2008), PVu5 данной активности (рис. 3). В качестве культуры фитопатогена использовался гриб *F. solani*, вызывающий корневую гниль.

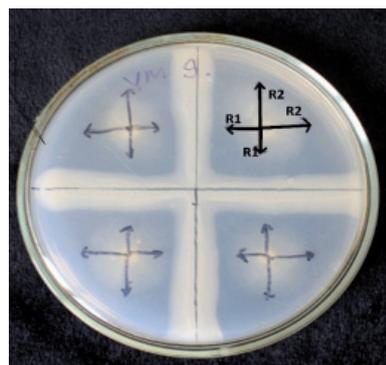


Рисунок 3 – Метод двойной культуры (штамм *R. leguminosarum* LSy10 (D18)).

Проводилось вычисление степени угнетения роста гриба *F. solani* бактериями по формуле:

$$(R2-R1)/R2 \cdot 100\%$$

где R1 – это зоны, на которые бактериальные штаммы не повлияли, а R2 – зоны подавления роста гриба.

Полученные результаты показали, что наибольшей фунгистатической активностью обладает штамм *R. leguminosarum* LSy10 (D18), выделенный из чины весенней, так как степень угнетения роста гриба в данном эксперименте составила в среднем 15%, тогда как в случае с *R. leguminosarum* LVe13 (Inz 2008) она была близка к 5%, а в экспериментах с *R. leguminosarum* PVu5 составила 7%.

Заключение

Было обнаружено, что все исследуемые штаммы обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенному грибу *F. solani* и оказывают положительный эффект на рост растений. Следовательно, можно сделать вывод, что данные штаммы можно использовать в качестве биоудобрений для защиты полезных сельскохозяйственных культур от фитопатогенных грибов, а также для улучшения роста растений. По полученным данным в ходе исследования можно выделить два штамма, которые показали наилучшие результаты – это *R. leguminosarum* LSy10 (D18) и *R. leguminosarum* PVu5.

05.10.2017

**Исследования выполнялись с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика»
Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
в рамках госзадания по теме № АААА-А16-116020350028-4 при финансовой поддержке
грантов Российского фонда фундаментальных исследований
(гранты РФФИ № 16-04-00902А; №16-34-01076 мол_а; №17-44-020201р_а)**

Список литературы:

1. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria / J.W. Kloepper, J. Leong, M. Teintze [et al] // Nature. – 1980. – Vol. 286. – P. 885-886.
2. Dey, R. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria / R. Dey, K.K. Pal, D.M. Bhatt // Microbiol. – 2004. – Vol. 159. – P. 371-394.
3. Herman, M.A.V. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York / M.A.V. Herman, B.A. Nault, C.D. Smart // Crop Protect. – 2008. – Vol. 27. – P. 996-1002.
4. Искусственная ассоциативная симбиотическая система рапса с ризобиями для защиты от фитопатогенов / З.П. Вершинина, Д.К. Благова, Л.Р. Нигматуллина [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т.15. – № 3. – С. 1579-1582.
5. Тихонович, И.А. Микробиологические аспекты плодородия почвы и проблемы устойчивого земледелия / И.А. Тихонович, Ю.В. Круглов // Плодородие. – 2006. – № 5. – С. 9-12.
6. Pena, H.B. Nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizers isolated in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and evaluated as plant growth promoters / H.B. Pena, I. Reyes // Interciencia. – 2007. – Vol. 32. – No. 8. – P. 560-565.
7. Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans / P. Garcia-Fraile, L. Carro, M. Robledo [et al] // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – № 5. e38122. doi:10.1371/journal.pone.0038122.
8. Искусственные ассоциативные симбиозы между томатом и ризобиями, обладающими фунгистатической активностью / Д.К. Благова, З.П. Вершинина, Л.Р. Нигматуллина [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 1. – С. 107-114.
9. Ehteshamul-Haque, S. A. Use of Bradyrhizobium japonicum and fungicides in the control of root rot disease of sun flower. In: Ghaffar A, Shahzad S (eds) Proceedings of Status of Plant Pathology in Pakistan, Department of Botany, University of Karachi, Karachi – 75270, Pakistan. – 1992. – P 261–266.
10. Благова, Д.К. Поиск штаммов, обладающих фунгицидной активностью среди бактерий, ассоциированных с корнями дикорастущих бобовых растений / Д.К. Благова, Л.Р. Нигматуллина // Материалы всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия растений и микроорганизмов с окружающей средой». Саратов. – 2012. – Т.1. – № 1. – С. 102.
11. The beneficial plant growth-promoting association of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii with rice roots / Y.G. Yanni, R.Y. Rizk, F.K. Abd El-Fattah [et al] // Aust J Plant Physiol. – 2001. – Vol. 28. – P. 845–870.
12. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum bv. viciae isolated from agriculturesoils in Faisalabad / F.Y. Hafeez, F.I. Naeem, R. Naeem [et al] // Environ Exper Bot. – 2005. – V. 54. – P. 142–147.
13. Вклад бактериального адгезина RapA1 в эффективность формирования симбиоза Rhizobium leguminosarum с растениями фасоли / Л.Р. Нигматуллина, А.М. Лавина, З.П. Вершинина [и др.] // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 6. – С. 705–711.
14. Zahir, Z.A. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture / Z.A. Zahir, M. Arshad // Advances in Agronomy. – 2003. – Vol. 81. – P. 97-168.
15. Potential of Rhizobia for sustainable production of non-legumes / I. Mehboob, M. Naveed, A.Z. Zahir [et al] // Crop Production for Agricultural Improvement. – Springer Netherlands, 2012. – С. 659-704.

Сведения об авторах:

Хакимова Лилия Ралисовна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УНЦ РАН

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Сербаева Элина Рустамовна, магистрант биологического факультета кафедры биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета

450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32; тел.: 8(347)272-63-70; факс: 273-67-78, e-mail: ispania14@mail.ru

Лавина Анна Михайловна, аспирант лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УНЦ РАН

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: owlwoman@mail.ru

Вершинина Зилия Рифовна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УНЦ РАН; кандидат биологических наук

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: ziliyaver@mail.ru

Баймиев Алексей Ханифович, заведующий лабораторией молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УНЦ РАН; доктор биологических наук

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: baymiev@mail.ru