

С. Н. Масленникова, А. И. Шургин, В. К. Чеботарь,
А. В. Щербakov, А. В. Канарский

ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ: ПОСЛЕДНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Ключевые слова: эндофиты, эндофитные бактерии, сосна, ель, бактериальные удобрения.

В данной статье представлен краткий обзор последних исследований, посвященных эндофитным микроорганизмам хвойных древесных растений и перспективам возможностям их применения в лесном хозяйстве.

Key words: endophytes, endophytic bacteria, pine, spruce, bacterial fertilizers.

This article is a brief survey of the recent studies of endophytic microorganisms of conifers and perspective ways of their application in forestry.

Введение

Охрана и защита лесов от вредителей и болезней – важная проблема не только в плане их экономического значения, но и общебиологического и географического: леса определяют состояние многих видов природных ресурсов, водного баланса речных бассейнов [1], формируют местный и мировой климат, а также вносят вклад в цикл углерода.

Предупреждение инфекционных болезней и улучшение роста и развития древесных растений представляет современную задачу многих специалистов-биологов. Борьба с потерями и убытками лесного хозяйства от массовой гибели лесных насаждений и снижение качества древесины в результате бактериальных и грибных заболеваний, защита сеянцев в питомниках при выращивании стандартного посадочного материала на промышленной основе должны рассматриваться с точки зрения экологической безопасности применяемых методов [2]. В основе такого безопасного и перспективного способа подавления инфекционных заболеваний, а также стимулирования роста и развития лесных древесных пород лежит использование симбиотических бактерий. Есть данные, что эндофиты, выделенные из почек сосны обыкновенной, могут улучшать рост сеянцев сосны в той же степени, как и микоризные грибы [3]. Поэтому многие эндофитные бактерии могут предоставить большие возможности для лесного хозяйства в качестве стимуляторов роста и оздоровления древесных растений.

В настоящее время уже созданы и повсеместно применяются биопрепараты на основе эндофитных и ризосферных бактерий для сельскохозяйственных культур. Однако, этот положительный опыт не нашел своего применения в лесоводстве, и до сегодняшнего времени биопрепараты для лесных культур созданы не были.

Целью настоящего обзора явился анализ существующих данных об эндофитных микроорганизмах древесных растений, а также потенциальных путей их применения в области лесного хозяйства.

Разнообразие эндофитных симбионтов в древесных растениях

К эндофитам принадлежат микроорганизмы, в основном бактерии и грибы, которые могут

быть обнаружены в отдельный момент времени в тканях внешне здорового растения [4].

Большое количество работ в настоящее время направлено на изучение грибных популяций лесных деревьев, и имеется очень мало данных об эндофитных бактериях и особенно их функциях в тканях дерева [5]. Эндофитные бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Erwinia* и *Burkholderia* обнаружены практически во всех древесных тканях. Большинство исследований направлено на эндофитные бактерии, ассоциированные с корнями древесных растений, которые, по всей видимости, отличаются по разнообразию и функциям от бактерий, ассоциированных с побегами [6]. Надземная часть деревьев подвергается УФ излучению, быстро меняющейся температуре, влажности и обладает лимитированным количеством питательных веществ по сравнению с корнями.

Обычно эндофитные бактерии побегов обнаруживаются при использовании культуры тканей, т.к. меристема побегов или зародышей очень часто используется как стартовый материал. Например, эндофитные бактерии были обнаружены в культуре тканей лесного ореха (*Corylus avellana* L., *C. contorta* C.) [7], вишни (*Prunus cerasus* L.) [8], различных видах тополей, лиственницы, белой акации (*Robinia pseudoacacia* L.), ели обыкновенной (*Picea abies* Karst.) [9, 10] и сосне обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) [11, 12]. В опытах Ульриха и соавторов [9] большая часть эндофитов 5-летних культур, выращенных из побегов и зрелых и незрелых зигот тополей, лиственницы, белой акации и ели, были идентифицированы как представители рода *Paenibacillus*. Иногда в этих культурах встречались бактерии родов *Methylobacterium*, *Stenotrophomonas* и *Bacillus* spp. *Paenibacillus* spp. не оказывал видимого негативного влияния на развитие растения, а один штамм, выделенный из культуры тополя, оказывал стимулирующее влияние на рост сеянцев [9].

Присутствие эндофитной микрофлоры в хвое отмечают многие авторы. Так, Мюллер с коллегами изучали эндофиты хвои ели обыкновенной. Всего было выделено 182 изолята, 90% от общего числа которых было идентифицировано как *Lophodermium piceae*. Основная роль этих грибных

эндофитов, как было доказано в опыте, состоит в разложении хвои после ее опада [13].

Хеландер с коллегами [14] обнаруживали в хвое сосны обыкновенной следующих эндофитных грибных штаммы: *Cenangium ferruginosum* (64 % от общего числа выделенных грибных эндофитов) и *Cyclaneusma minus* (12 %). Также авторы отмечают, что старая хвоя населена микроорганизмами больше, чем молодая. Таким образом, имеются возрастные различия в эндофитной микрофлоре. Помимо этого, наблюдается и сезонная периодичность: количество эндофитов в молодой хвое нарастает в течение лета, тогда как в старой хвое численность ассоциативной микрофлоры не изменяется.

Отмечается, что наиболее распространёнными бактериальными эндофитами почек сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) являются штаммы *Methylobacterium extorquens* и *Pseudomonas synxantha* [12].

Другие авторы так же сообщают, что *Methylobacterium* spp. – доминирующие представители эндофитной микрофлоры почек сосны обыкновенной [15], симбиоз которых положительно влияет на рост и развитие растения-хозяина. В опытах было доказано, что инокуляция семян сосны обыкновенной штаммом *Methylobacterium extorquens* увеличивает образование боковых корней, стимулирует их рост, а также увеличивает биомассу надземной части семян по сравнению с контрольными образцами.

Некоторые исследователи отмечают о наличии в почках и представителей микобактерий. Пирттила и коллеги изучили локализацию и распределение эндофита *Mycobacterium* sp. в почках сосны обыкновенной [16]. Примечательно, что данные бактерии в изобилии присутствовали до удлинения и дифференцировки почки, но как только ткани полностью сформировались, микобактерии больше не обнаруживались, и метаболическая активность эндофитов восстанавливалась только к следующему сезону роста.

Помимо бактерий, в почках сосны обнаруживаются и представители микромицетов. Этими же авторами из почек сосны обыкновенной было изолировано 2 эндофитных гриба: *Hormonema dematioides* и *Rhodotorula minuta* [17].

Эндофитные бактерии также содержатся и в репродуктивных органах хвойных деревьев. Бактерия *Enterobacter cloacae* была выделена из пыльцы *Pinus halepensis* и *P. pinea* и оплодотворённых яйцеклеток *Pinus brutia* [18]. В пыльце сосны обыкновенной эндофиты обнаружены не были, однако спорогенные клетки мужских цветков содержали эндофиты в виде биоплёнкоподобных структур (согласно данным, полученным методом *in situ* гибридизации) [5]. Меньшее количество эндофитов было обнаружено в женских соцветиях сосны обыкновенной, несмотря на то, что зародыши семян были хорошо заселены бактериальной микрофлорой [5]. Были также выделены бактериальные эндофиты рода *Rahnella* из зародыша и эндосперма семян ели обыкновенной [19]. Отмечается, что количество эндофитов в семенах ели со временем снижается [19].

Пыльца и семена других лесных деревьев изучены крайне мало. Были выделены эндофиты таких родов, как *Bacillus*, *Enterococcus*, *Paenibacillus* и *Methylobacterium*, из семян и сеянцев эвкалиптов (*Eucalyptus*) [20]. Специфичные штаммы *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Enterococcus* присутствовали сразу и в семенах, и сеянцах, выращенных из семян, что подтверждает вертикальный транспорт эндофитов. В аналогичных опытах эндофитный штамм *Pantoea agglomerans* был выделен из *E. grandis*, помечен GFP (от англ. «green fluorescent protein» – зеленый флуоресцентный белок) и инокулирован в семена двух видов и одного гибрида эвкалипта. И затем наблюдали колонизацию с помощью флуоресцентной микроскопии. Колонизация сеянцев была подтверждена для *E. grandis* и гибрида *E. grandis* x *E. globulus*, и не подтверждена для *E. urophylla*. Штамм заселял корни сеянцев (в основном межклеточных пространства) и ксилемные сосуды стебля. Отмечается, что ни один лист сеянцев GFP-помеченным штаммом колонизирован не был, что говорит об отсутствии горизонтального транспорта.

Присутствие эндофитной микрофлоры в семенах норвежской ели было показано с использованием культуральных и молекулярно-генетических методов [19]. Оба подхода выявили непатогенных представителей рода *Pseudomonas* и *Rahnella*.

Гвоздиком с соавторами [21] из семян сосны обыкновенной (класс качества – I-III) были изолированы облигатные фитопатогенные (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *E. nimipressuralis*), факультативные фитопатогенные (*Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*) и сапротрофные (*Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Paenibacillus polymyxa*) бактерии, а также грибы из родов *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Acremonium* и дрожжи (р. *Torula*).

Физиологическая активность эндофитных бактерий

Бактериальные эндофиты колонизируют экологические ниши, сходные с таковыми фитопатогенов, что позволяет функционировать им как агентам биоконтроля [22]. Этот факт подтверждается многочисленными исследованиями, в которых показана способность эндофитных микроорганизмов подавлять рост растительных патогенов [23, 24, 25], насекомых [26] и нематод [27, 28]. Помимо этого, эндофитные бактерии способны улучшать появление всходов, а также оказывать стимулирующие воздействие на рост и развитие растения [29, 30].

Подобно действию многих ризосферных бактерий, механизмы положительного влияния эндофитов можно разделить на две группы: непосредственное влияние на рост путем продукции веществ-стимуляторов и/или опосредованное действие через ингибирование фитопатогенов.

В большинстве исследований отмечается позитивное влияние эпифитных и эндофитных бактерий, главным образом бактерий рода *Methylobacterium*, на органо- и эмбриогенез древесных растений [31, 32, 33, 34]. Метилотрофы обладают уникальной способностью утилизировать метанол и метан и использовать в качестве источника энергии,

и являются экологически важными организмами, поскольку они минимизируют выброс метанола и метана растениями в атмосферу [35, 36, 37].

В литературных данных часто отмечается, что многие эндофитные бактерии способны улучшать рост растения-хозяина. Так, Канкарон и коллегами были изолированы бактериальные штаммы из семян ели обыкновенной (*Picea abies* L. Karst), принадлежащие родам *Pseudomonas* и *Rahnella*, которые в опытах проявляли ростостимулирующую активность [19].

Эндофитные бактерии способны переводить атмосферный азот в формы, доступные для усвоения, и тем самым стимулировать рост растительного хозяина [38, 39]. Наряду с фиксацией атмосферного азота и улучшением азотного питания ассоциативные микросимбионты синтезируют фитогормоны – ауксины, цитокинины и гиббереллины. Стимулирующий эффект заключается в том, что экзогенные фитогормоны вызывают усиленный рост корневой системы растения, что, в свою очередь, приводит к улучшению минерального питания. Визуально это выражается в приросте биомассы, в частности, корневой системы.

Эндофитные микроорганизмы способны синтезировать антибиотики и экзоферменты с антагонистическими свойствами по отношению к широкому кругу фитопатогенов [40].

Сумара с соавторами [41] были выделены эндофиты из белой восточной сосны (*Pinus strobus*), метаболиты которых (алифатический поликетид, пиренофорол и впервые выделенное вещество неизвестной структуры) обладают фунгицидной активностью против ржавчины *Microbotryum violaceum* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Перспективы использования эндофитных бактерий

Одним из прикладных направлений в биологии семян является разработка методов обработки, позволяющих улучшить прорастание семян, а также защитить их от фитопатогенов. Внедрение штаммов эндофитных бактерий во внутренние структуры семян рассматривают как перспективный способ расширения физиологических возможностей семян. В литературе данный метод биологической обработки семян получил название биопрайминга [42]. В отличие от других методов обработки, при которых бактериальные клетки наносят на поверхность семян, биопрайминг предполагает проникновение бактерий во внутренние ткани. Колонизируя внутреннюю среду, бактерии выдерживают процедуру сушки и длительное хранение семян [42]. Постоянное присутствие эндофитных симбионтов снижает вероятность инфицирования семян патогенами, а также стимулирует прорастание семян.

В последнее десятилетие отмечается устойчивый рост применения биопрепаратов в растениеводстве в России, производственные испытания которых подтверждают их высокую экономическую эффективность. К преимуществам микробиологических препаратов в отличие от химических можно отнести безопасность использования, снижение химической нагрузки на агроценоз и ландшафт приле-

гающих территорий, восстановление нормальной структуры микробиоценоза обрабатываемых почв. Биопрепараты подавляют возбудителей болезней, при этом «включая» собственные иммунные механизмы растения, увеличивают устойчивость обработанных растений к неблагоприятным климатическим условиям, обеспечивают фиксацию атмосферного азота и мобилизуют запасы элементов питания из почвы.

В связи с этим другим перспективным способом применения эндофитных бактерий древесных растений могут стать микробиологические препараты для лесного хозяйства, которые до настоящего момента созданы не были, поэтому их разработка является весьма актуальной и своевременной. Авторами работ [43, 44] выделены эндофитные бактерии из семян сосны обыкновенной и ели гибридной, проявляющих фунгицидную и ростостимулирующую активность. Выделенные штаммы планируется использовать при создании биопрепаратов для стимулирования развития и роста лесных культур.

Заключение

Таким образом, к настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал, доказывающий огромное и разнообразное значение эндофитной микрофлоры в жизни древесных растений. Способность стимулировать рост растений, улучшать питание, выделять гормоны, снижать заболеваемость растений, повышать устойчивость к абиотическим стрессовым факторам позволяет эндофитным бактериям стать потенциальными эффективными агентами в биологической защите лесных культур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 г.

Литература

1. Р.В. Опритов, В кн. *Биосфера и человек*. Москва, 1975. С. 64-65.
2. Т.М. Рыбалко, А.Б. Гукасян, *Бактериозы хвойных Сибири*. Наука, Новосибирск, 1986.
3. Metsometsa et al. Неопубликованные данные.
4. B. Schulz, C. Boyle, *Microbial root endophytes*, 1-13 (2006).
5. A.M. Pirttila, A.C. Frank, *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Springer Science+Business Media B.V., 2011.
6. F.P. Moore, T. Barac, B. Borremans, *Syst Appl Microbiol*, 29, 539-556 (2006).
7. B.M. Reed, J. Mentzer, P. Tanprasert, *Plant Cell Tiss Org Cult*, 52, 67-70 (1998).
8. R. Kamoun, P. Lepoivre, P. Boxus, *Plant Cell Tiss Org Cult*, 52, 57-59 (1998).
9. K. Ulrich, A. Ulrich, D. Ewald, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 93, 347-351 (2008).
10. B. Van Aken, C.M. Peres, S.L. Doty, *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1191-1196 (2004).
11. H. Laukkanen, I.I. Soini, S. Kontunen-Soppela, *Tree Physiol*, 20, 915-920 (2000).

12. A.M. Pirttilä, H. Laukkanen, H. Pospiech, *Appl Environ Microbiol*, 66, 3073-3077 (2000).
13. M.M. Müller, R. Valjakka, A. Suokko, J. Hantula, *Mol Ecol*, 10, 7, 1801-1810 (2001).
14. M.L. Helander, T.N. Sieber, O. Petrini, S. Neuvonen, *Canadian Journal of Botany*, 72, 8, 1108-1113 (1994).
15. J. Koskimäki, J. Metsometsä, M. Kajula, J. Hokkanen, Academy of Finland. Projects № 118569, 129852.
16. A.M. Pirttilä, H. Pospiech, H. Laukkanen, *Tree Physiol*, 25, 289-297 (2005).
17. A.M. Pirttilä, H. Pospiech, H. Laukkanen, *Microb Ecol*, 45, 53-62 (2003).
18. A. Madmony, L. Chernin, S. Pleban, *Folia Microbiol*, 50, 209-216 (2005).
19. K. Cankar, H. Kraigher, M. Ravnikar, *FEMS Microbiol Lett*, 244, 341-345 (2005).
20. A. Ferreira, M.C. Quecine, P.T. Lacava, *FEMS Microbiol Lett*, 287, 8-14 (2008).
21. Р.И. Гвоздяк, XIII Междунар. научн. конф. Изд-во СибГТУ, Красноярск, 2009. С. 30-34.
22. G. Berg, L. Eberl, A. Hartmann, *Environ Microbiol*, 7, 1673-1685 (2005).
23. A.V. Sturz, B.G. Matheson, *Plant Soil*, 184, 265-271 (1996).
24. B.J. Duijff, V. Gianinazzi-Pearsonand, P. Lemanceau, *New Phytol*, 135, 325-334 (1997).
25. K. Krishnamurthy, S.S. Gnanamanickam, *Curr Sci*, 72, 331-334 (1997).
26. J.L. Azevedo, J. Jr Maccheroni, O. Pereira, W.L. Ara, *Electr J Biotech*, 3, 40-65 (2000).
27. J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee, J.W. Kloepper, *Can J Microbiol*, 43, 895-914 (1997).
28. J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, R. Rodriguez-Kabana, J.W. Kloepper, *Soil Biol Biochem*, 30, 925-937 (1998).
29. C.P. Chanway, *Forest Sci*, 43, 99-112 (1997).
30. E. Bent, C.P. Chanway, *Can J Microbiol*, 44, 980-988 (1998).
31. M.A. Holland, J.C. Polacco, *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol*, 45, 197-209 (1994).
32. C. Visser, B.N.S. Murthy, J. Odumeru, *In Vitro Cell DevBiol*, 30, 140-143 (1994).
33. B.N.S. Murthy, N.N. Vettakkorumakankav, S. Krishna-Raj, *Plant Cell Rep*, 18, 607-613 (1999).
34. M.A. Kalyaeva, N.S. Zakharchenko, N.V. Doronina, *Russ J Plant Physiol*, 48, 514-517 (2001).
35. R. Fall, *Microbial growth on CI compounds*, 8, 343-350, (1996).
36. R. Fall, A.A. Benson, *Plant Sci*, 1, 296-301 (1996).
37. F. Keppler, J.T.G. Hamilton, M. Bra, *Nature*, 439, 187-191 (2006).
38. J. Palus, J. Borneman, E. Triplett, *Plant and Soil*, 186, 135-142 (1996).
39. W. Barraquio, L. Revilla, J. Ladha, *Plant and Soil*, 194, 15-24 (1997).
40. G. Berg, J. Hallmann, *Microbial root endophytes*, 53-69 (2006).
41. M.W. Sumarah, J.R. Kesting, D. Sorensen, J.D. Miller, *Phytochemistry*, 72, 14, 1833-1837 (2011).
42. H. Muller. PhD thesis, University of Rostock, Germany, 2007.
43. Масленникова С.Н., Шургин А.И., Чеботарь В.К., Щербаков А.В., Канарский А.В. Вестник казанского технологического университета. 2012. Т.15. № 16. с. 175 – 178.
44. Масленникова С.Н., Шургин А.И., Чеботарь В.К., Щербаков А.В., Канарский А.В. Вестник казанского технологического университета. 2012. Т.15. № 18. с. 207 – 212.

© **С. Н. Масленникова** – инженер-исследователь лаб. технологии микробных препаратов, ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии, snmaslennikova@gmail.com; **А. И. Шургин** – канд. сельскохозяйственных наук, зам. дир. ЦКП ЭБЭЭ, ashurgin@pochta.ru; **В. К. Чеботарь** – канд. биол. наук, зав. лаб. технологии микробных препаратов, ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии, vladchebotar@rambler.ru; **А. В. Щербаков** – инженер-микробиолог той же лаборатории, avsherbakov@bisolbi.ru; **А. В. Канарский** – д-р техн. наук, проф. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, alb46@mail.ru.