

Введение В настоящее время наблюдается тенденция развития микробных биопрепаратов на основе эндофитных бактерий, которые населяют внутренние ткани растений без вреда для хозяина [1]. Известно, что бактериальные симбионты оказывают стимулирующее воздействие на рост и развитие растения-хозяина, продуцируя биологически активные вещества и ингибируя фитопатогенные микроорганизмы. В связи с этим эндофитные бактерии являются перспективными агентами в биологической защите растений [2], а также и биопрепаратов другого назначения [3, 4, 5, 6]. Большинство экспериментальных работ посвящено анализу эндофитных популяций микроорганизмов на вегетативных органах растений. Бактериальные эндофиты были выделены из корней, стеблей и листьев многих двудольных и однодольных растений. Особенно активно в настоящее время ведется изучение эндофитов злаков [7, 8, 9, 10]. Проникая во внутреннюю среду растения-хозяина, эндофитные бактерии способны расселиться по организму растений и достигать его репродуктивной структуры, в том числе и по семенам. Анализ публикаций в этой области исследований свидетельствует о присутствии эндофитных бактерий в семенах риса [11], кукурузы [12], пшеницы [13], и хлопка [12] и других важнейших сельскохозяйственных культур. Для стимулирования развития и роста сельскохозяйственных культур созданы и применяются соответствующие биопрепараты на основе эндофитных бактерий. Однако, этот положительный опыт до сего времени не нашел применения в лесоводстве. Причиной тому является, прежде всего, отсутствие систематических исследований, отражающих симбиотическую взаимосвязь лесных культур и эндофитных бактерий. Фрагментарная и недостаточная информация о симбионтах лесных культур не позволяет определить механизмы повышения устойчивости растений-хозяев к неблагоприятным факторам среды и увеличения их продуктивности [14]. До настоящего времени не созданы и биопрепараты для стимулирования развития и роста лесных культур. В этой связи является весьма актуальным и своевременным изучение симбиотических отношений экономически важных лесных культур сосны и ели с эндофитными бактериями. Целью настоящих исследований явилось изучение видового и количественного состава эндофитных бактерий семян сосны обыкновенной и ели гибридной и оценка их фунгицидной и ростостимулирующей активности. Материалы и методы В работе использовали семена сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), собранные в Бушковском участковом лесничестве Сернурского лесничества и семена ели гибридной (*Picea abies* (L.) Karst. × *Picea obovata* Ledeb.), собранные в Сернурском лесничестве республики Марий Эл. Для поверхностной стерилизации отбирали по 50 семян сосны обыкновенной и ели гибридной и помещали их в стерильные колбы объёмом 50 мл. Для каждой повторности использовали один из четырех вариантов стерилизации (табл. 1), отличающиеся по времени инкубирования в стерилизующем агенте. Эффективность метода

стерилизации оценивали по всхожести семян и отсутствию бактериального роста на питательной среде. Для этого поверхностно стерилизованные семена подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге, раскладывали на агаризованной среде R2A [15] и культивировали в течение 2-х суток при температуре 28 °С. На третьи сутки регистрировали наличие или отсутствие бактериального роста вокруг семян. Таблица 1 – Варианты поверхностной стерилизации

Процедура	Время инкубации (мин)	A	B	C	D
1) 70 % этанол	2				
Промыть стерильной водой	1	3	5	15	
5 - 15 % гипохлорит натрия (NaClO)	7	20	30	40	4
Промыть стерильной водой	1	5	5	15	
5 - 15 % гипохлорит натрия (NaClO)	7	20	30	40	6

5 -кратно промыть стерильной водой 1 Далее по 20 стерильных семян сосны обыкновенной и ели гибридной помещали в стерильные ступки, добавляли по 10 мл стерильного физиологического раствора и асептически разрушали, используя стерильные пестики. Далее готовили ряд последовательных разведений (10-2, 10-3, 10-4). Затем из каждого полученного разведения отбирали по 40 мкл суспензии и поверхностно высевали на питательный агар (Биокомпас-С, Россия) и среду R2A. Посевы культивировали в течение 3-х суток при 28 °С. На четвёртые сутки проводили подсчет выросших колоний и выделение различных по морфологии изолятов. Бактериальную ДНК выделяли стандартным щелочным методом [16, 17]. Для наработки участков 16S рРНК гена использовали прямой праймер BD (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и обратный праймер FD (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) [18]. Этапы полимеразной цепной реакции включали начальную денатурацию цепей ДНК при 94 °С в течение 1 мин; 30 циклов, каждый из которых состоял из 30 секунд при 94 °С, 30 секунд при 55 °С и 1 мин при 72 °С; и финальную стадию 5 мин при 72 °С. Амплифицированные участки ДНК выявляли с помощью горизонтального гель-электрофореза (Bio-Rad, США). Для RFLP-анализа (Restriction fragment length polymorphism) использовали рестриктазы Msp I и Hae III (FastDigest). Рестрикционные фрагменты выявляли с помощью горизонтального гель-электрофореза. В качестве маркера использовали Ladder (50 - 1000 п. н.). Электрофорез проводили в течение 1 ч при постоянном напряжении 130 В. После проведения рестрикционного анализа для идентификации отобрали 7 бактериальных штаммов. Повторно проводили полимеразную цепную реакцию и гель-электрофорез, после чего под УФ вырезали полоску геля с ДНК и очищали от агарозы. Для определения концентрации ДНК готовили 1 % агарозу. В первую лунку геля вносили 2 мкл маркера ВМЕ, в последнюю лунку – 3 мкл ВМЕ. Во все остальные лунки раскапывали по 2 мкл ДНК, выделенной из геля, предварительно смешав с раствором для нанесения на гель. Электрофорез проводили в течение 40 мин при 110 В. Концентрацию ДНК определяли на основании анализа гель-электрофореза с помощью программы TotalLab (USA). Секвенирование выполнено согласно протоколу фирмы Beckman Coulter (США) для 8-и канального секвенатора SEQ8000 с использованием коммерческого набора для секвенаторов

«SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) with Quick Start Kit». Видовую принадлежность клонов определяли с использованием программ BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) и Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Для того чтобы оценить фунгицидную активность выделенных штаммов, из мицелия активно растущего на чашке Петри гриба вырезали кусочек, равный 1/8 от общей площади, помещали в стерильную чашку Петри и добавляли 10 мл стерильной воды. Стерильным шпателем аккуратно смывали споры с поверхности гриба. Отбирали 20 мкл суспензии спор, добавляли в 200 мл растопленной среды PDA (OXOID Ltd., Англия) температурой 40 - 45°C, перемешивали и разливали по чашкам Петри. В застывшей среде стерильным пробочным сверлом делали «колодцы» [4, 5, 6, 19], в которые добавляли по 100 мкл исследуемой бактериальной суспензии и инкубировали в течение одной недели при комнатной температуре, после чего регистрировали отсутствие или наличие зоны ингибирования роста гриба и измеряли радиус зон линейкой. Для оценки ростстимулирующей активности выделенных штаммов использовали семена редиса (*Raphanus sativus* L.) сорта «Ранний красный». Поверхностно-стерилизованные семена редиса (70 % этанол в течение 2 мин, затем промывали стерильной водой) замачивали в бактериальной суспензии на 30 мин, контрольный образец семян замачивали в стерильной воде. Затем в стерильные чашки Петри с фильтровальными дисками и ватой разливали по 15 мл стерильной воды и раскладывали по 16 стерильных семян. Чашки инкубировали в течение 2 суток при 28 °C. На третьи сутки измеряли длину корня и длину побега. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica v5.5 методом однофакторного дисперсионного анализа. Результаты и обсуждение

Метод поверхностной стерилизации разработали на семенах сосны обыкновенной и ели гибридной. Для этого сравнивали четыре варианта стерилизации, которые отличались по времени инкубирования семян в гипохлорите натрия. Эксперимент показал, что из четырёх исследованных вариантов стерилизации семян (табл. 1) наиболее эффективным оказался вариант «А»: бактериальный рост отсутствовал, и, кроме того, стерилизация не повлияла на всхожесть семян, а значит, не повредила семенные структуры и эндофитную микрофлору. Из всех вариантов вариант «А» предполагает наименьшее время инкубирования в стерилизующем агенте и, следовательно, является оптимальным для стерилизации семян исследуемых растений.

Определена средняя численность эндофитов в семени сосны обыкновенной и ели гибридной, которая составила $3,13 \times 10^5$ и $2,4 \times 10^6$ КОЕ соответственно. Из общего числа эндофитов семян сосны обыкновенной было отобрано 5 различных по морфологии изолятов и из семян ели гибридной – 9 изолятов, которые были отсеяны на свежую питательную среду. На основании полученных данных RFLP-анализа выделено 2 группы эндофитов (группа А: штаммы 2EP, 1EP, 3EP, 4EP, 4ES, 1ES; группа В: 5ES, 9ES, 7ES)[1], в каждую из которых входят генетически

сходные штаммы, и группа Unique, которую составляют 5 уникальных штаммов (5EP, 2ES, 3ES, 6ES, 8ES). Результаты секвенирования позволили определить видовую принадлежность выделенных штаммов, одни из которых относятся к классу Бациллы (*Bacilli*) (уникальный штамм 5EP и штаммы группы A) и 1 штамм – к классу Актинобактерии (*Actinobacteria*) (уникальный штамм 8ES). Штаммы эндофитных бактерий проверены на способность подавлять в тестах *in vitro* рост фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* Schwabe и *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 35108 (возбудители корневой гнили и фузариозов злаковых), взятые из рабочей коллекции лаборатории технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии. В результате оценки фунгицидной активности выделенных эндофитных микроорганизмов показано, что штаммы 5EP, 2EP, 2ES не проявляют активности в отношении фитопатогена *F. graminearum*, однако обладают ингибирующим действием на *F. sporotrichioides*. Кроме того выделены перспективные штаммы, ингибирующие рост обоих патогенных грибов (8ES, 4ES, 3ES, 6ES), которые планируется использовать при разработке биопрепаратов. Также выделенные штаммы бактерий проверены на способность стимулировать рост редиса (*Raphanus sativus* L.) сорта «Ранний красный». После обработки семян бактериальными суспензиями и инкубирования в течение 2 дней у каждого проростка определялась длина корня и побега. Достоверность различия с контролем оценивалась с помощью программы Statistica v5.5. Полученные данные представлены в таблице 2.

Однофакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что эндофитный штамм 2ES достоверно значимо ($p = 0,024$) стимулирует рост корня редиса. Также следует отметить штаммы 8ES и 2EP, имеющие тенденцию к стимуляции роста корня, и штамм 4ES, который наоборот угнетает его рост. Достоверно установлено, что ни один из исследованных штаммов не влияет на рост побега редиса. Таблица 2 – Результаты оценки ростстимулирующей активности выделенных штаммов бактерий на рост редиса сорта «Ранний красный»

Вариант	Штамм	Средняя длина корня, см	Средняя длина побега, см
1	8ES	$4,90 \pm 0,33$	$1,64 \pm 0,05$
	9ES	$4,44 \pm 0,28$	$1,76 \pm 0,08$
	2EP	$5,16 \pm 0,38$	$1,82 \pm 0,06$
	4ES	$3,73 \pm 0,23$	$1,71 \pm 0,07$
2	Контроль 1	$4,69 \pm 0,36$	$1,97 \pm 0,06$
	6ES	$4,85 \pm 0,35$	$1,78 \pm 0,07$
	5EP	$4,60 \pm 0,47$	$1,64 \pm 0,06$
	2ES	$6,16 \pm 0,34$	$1,94 \pm 0,06$
	3ES	$4,62 \pm 0,41$	$1,86 \pm 0,07$
	Контроль 2	$5,00 \pm 0,42$	$1,91 \pm 0,08$

* $p = 0,024$ * p – вероятность. Достоверно значимыми различия считаются при $p < 0,05$.

Выводы 1. Выделено 5 штаммов эндофитных бактерий из семян сосны обыкновенной и 9 штаммов из семян ели гибридной. Средняя численность эндофитов в семенах сосны обыкновенной и ели гибридной составила $3,13 \times 10^5$ и $2,4 \times 10^6$ КОЕ соответственно.

2. Рестрикционный анализ гена 16S рПНК изученных бактерий позволил выявить группы идентичных RFLP-профилей и позволил разделить их на 3 обособленные группы. Последующая молекулярно-генетическая идентификация с использованием программ BLAST и RDP показала разнообразие в

таксономическом положении изучаемых штаммов. 3. Исследование хозяйственно ценных свойств изучаемых микроорганизмов позволило выделить 3 перспективных штамма 2ES, 8ES, 3ES, проявляющих как фунгицидную, так и ростостимулирующую активности. Данные штаммы планируется использовать в дальнейшей работе при создании биопрепаратов для стимулирования развития и роста лесных культур