

Введение Устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым почвенными фитопатогенами, во многом определяется результатами взаимодействия между корневой системой растений и разнообразными микроорганизмами. Совокупность корневой системы с почвой представляет собой сложную экологическую нишу, заселенную полезными, вредными и нейтральными для растений микроорганизмами, и образует так называемую ризосферу [1]. Нормальная жизнедеятельность высших растений происходит только при их тесном взаимодействии с микроорганизмами, заселяющими ризосферу и составляющими ассоциацию: «микроорганизмы – корневая система растения» [2]. К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал [3, 4, 5, 6, 7, 8 и др.], доказывающий огромное и разнообразное значение ризосферной микрофлоры в жизни высшего растения. Способность микроорганизмов ризосферы стимулировать рост и развитие растений связывают с улучшением их азотного и фосфорного питания, выделением гормонов, продукцией веществ антибиотической природы, угнетающих фитопатогенные микроорганизмы, и влиянием других факторов [9, 10, 11, 12]. Отмечается, что ассоциативные бактерии снижают заболеваемость растений различными вирусными, грибными и бактериальными инфекциями [4, 5, 13, 14]. Но не исключено, что они могут повышать устойчивость растений и к абиотическим стрессовым факторам [3, 6, 8], в частности к низким температурам [7, 15]. В последнее время все большее распространение получают инфекционные болезни, связанные с несбалансированным применением удобрений. Слишком высокие дозы минеральных удобрений могут привести к деградации почвы, тем более что растения не в состоянии полностью их использовать [16]. Вместе с этим происходит загрязнение водоёмов, которое возникает как следствие перекачивания части внесенных минеральных удобрений через грунтовые воды [17]. Поэтому все более актуальным становится разработка систем интегрированной биологической защиты и стимуляции роста растений, не нарушающих экологического равновесия в почве и не загрязняющих окружающую среду. Необходимо использовать те препараты, которые не оказывают отрицательного влияния на компоненты биоценоза [16, 18]. Следует отметить, что такие биопрепараты, в частности бактериальные удобрения на основе ризосферных микроорганизмов, используют в сельском хозяйстве для стимулирующего воздействия на рост и развитие растений, продуцируя биологически активные вещества и ингибирования фитопатогенных микроорганизмов. Однако, несмотря на установленное отрицательное влияние фитопатогенных микроорганизмов на лесные культуры, до настоящего времени не созданы биопрепараты для их биозащиты [19]. В этой связи весьма актуальным является изучение симбиотических отношений такой экономически важной лесной культуры, как сосна, с ризосферными бактериями, и разработка на их основе высокоэффективных биопрепаратов для защиты лесонасаждений

биологическими методами. Целью настоящей работы явилось изучение видового и количественного состава ризосферных бактерий проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и оценка их хозяйственно ценных качеств. В связи с поставленной целью решались следующие задачи: 1. выделение штаммов ризосферных бактерий, используя метод активной колонизации корней, и определить их численность; 2. идентифицирование выделенных штаммы ризосферных бактерий на основе анализа гена 16S рРНК; 3. оценка фунгицидной и ростостимулирующей активности выделенных штаммов ризосферных бактерий. Методы исследования Основным растительным объектом исследования явились семена сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), собранные в Бушковском участковом лесничестве Сернурского лесничества республики Марий Эл. Для поверхностной стерилизации отбирали 50 семян сосны обыкновенной и помещали их в стерильные колбы объёмом 50 мл. Использовали следующий вариант стерилизации: 1) 70 % этанол – 2 мин; 2) Промыть стерильной водой – 1 мин; 3) 5 – 15 % гипохлорит натрия (NaClO) – 7 мин; 4) Промыть стерильной водой – 1 мин; 5) 5 – 15 % гипохлорит натрия (NaClO) – 7 мин; 6) 5 -кратно промыть стерильной водой – 1 мин. 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 (г/л): дрожжевой экстракт – 0,5, пептон – 0,5, гидролизат казеина – 0,5, глюкоза – 0,5, крахмал – 0,5, K₂HPO₄ – 0,3, MgSO₄ – 0,024, пируват Na – 0,3, агар – 18, вода дистиллированная – 1000 мл, pH 6-6,5. Культивировали в течение 2-х суток в термостате при температуре 28 °С. На третьи сутки визуально регистрировали наличие или отсутствие бактериального роста вокруг семян. Для оценки колонизирующей способности ризосферных бактерий были взяты 4 пробы дерново-подзолистой почвы из корнеобитаемого слоя сосны обыкновенной и ели европейской, растущих возле Павловского государственного музея-заповедника (г. Санкт-Петербург). Поверхностно стерилизованные семена сосны обыкновенной проращивали на стерильных фильтровальных дисках, смоченных водой, в течение 2 недель. Стерильные проростки раскладывали по чашкам Петри с 0,6 %-ной агарозой, а вокруг корня – комочки почвы на расстоянии 1 - 3 см таким образом, чтобы почва не касалась корней. Культивировали в термостате в течение 24 часов при температуре 28 °С. По истечении суток, корешок отрезали, асептически разрушали в стерильной ступке с добавлением 10 мл стерильного физиологического раствора и делали ряд последовательных разведений (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴). Из каждого разведения отбирали по 40 мкл суспензии и поверхностно высевали на питательный агар (Биокомпас-С, Россия). Посевы культивировали в течение 3-х суток при 28 °С. Затем проводили подсчет выросших колоний и выделение различных по морфологии изолятов.

Идентификация выделенных штаммов бактерий проведена на основании ПЦР - амплификации и секвенирования гена 16S рНК с использованием стандартных методов молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля, определение и анализ нуклеотидных последовательностей) [20]. Бактериальную ДНК выделяли стандартным щелочным методом [21, 22]. Для наработки участков 16S рНК гена использовали прямой праймер BD (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и обратный праймер FD (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) [23]. 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 геле-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 геле-электрофореза. В качестве маркера использовали Ladder (50 - 1000 п. н.). Электрофорез проводили в течение 1 ч при постоянном напряжении 130 В. Секвенирование было 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 ризосферных 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 °С, перемешивали и разливали по чашкам Петри. В застывшей среде стерильным пробочным сверлом делали «колодцы» [24], 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 (рис. 1). Рис. 1 – Зоны подавления роста фитопатогенного гриба *Fusarium sporotrichioides* Для оценки ростостимулирующей активности выделенных штаммов ризосферных бактерий 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 °С. На третьи сутки измеряли линейкой длину корня и длину побега (рис. 2). Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica v5.5 методом однофакторного дисперсионного анализа. Рис. 2 – Проращивание семян редиса, обработанных суспензией ризосферных бактерий. Результаты и обсуждение. В опыте была определена средняя численность ризосферных бактерий в расчете на один проросток. Наибольшее количество бактерий наблюдается в варианте опыта № 4, где использовалась почва, взятая из-под ели европейской, и численность составила $9,5 \times 10^6$ КОЕ/растение. Несколько ниже наблюдалась численность микроорганизмов в вариантах опытов №1, 2 и 3 ($3,3 \times 10^6$, $6,3 \times 10^6$, $7,3 \times 10^6$ КОЕ/растение соответственно), в которых использовалась почва, взятая из корнеобитаемого слоя сосны обыкновенной. Для RFLP-анализа было отобрано 13 штаммов ризосферных бактерий. На основании полученных данных общее количество штаммов было разделено на 2 группы (А, В), в каждую из которых входят генетически сходные штаммы. В группу А вошли штаммы 1.1RP, 1.2RP, 2.1RP, 4.1RP, в группу В – 3.5RP, 4.3RP. А также была выделена группа Unique, которую составили 7 уникальных штаммов (2.4RP, 2.5RP, 2.6RP, 2.7RP, 3.1RP, 4.2RP, 4.4RP)[1]. Результаты секвенирования позволили определить видовую принадлежность выделенных штаммов, одни из которых относятся к классу Bacilli (уникальные штаммы 4.2RP, 2.5RP и штаммы группы А) и 1 штамм – к классу Actinobacteria, семейство Micrococaceae (3.1RP). Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение видовой принадлежности выделенных штаммов ризосферных бактерий

Штамм	Вид	Схожесть, %	Группа
1.1RP, 1.2RP, 2.1RP, 4.1RP	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	Группа А
4.2RP	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	100	Группа А
4.2RP	<i>Bacillus cereus</i>	99	Группа Unique
3.1RP	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	Группа Unique
2.5RP	Домен Bacteria Тип "Actinobacteria" Класс Actinobacteria Подкласс Actinobacteridaе Порядок Actinomycetales Подотряд Micrococceae Семейство Micrococaceae	97	Группа Unique
2.5RP	Домен Bacteria Тип Firmicutes Класс Bacilli Порядок Bacillales Семейство Paenibacillaceae Род <i>Brevibacillus</i>	97	Группа Unique

Штаммы ризосферных бактерий проростков семян сосны обыкновенной проверены на способность подавлять *in vitro* рост фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* Schwabe и *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 35108 (возбудители корневой гнили и фузариозов злаковых и лесных культур), взятые из рабочей коллекции лаборатории технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии. В результате оценки фунгицидной активности выделенных ризосферных микроорганизмов показано, что штаммы 2.5RP, 3.1RP, 2.7RP не проявляют активности в отношении фитопатогенов рода *Fusarium*. Штаммы ризосферных микроорганизмов, ингибирующие рост патогенных грибов (1.2RP, 2.6RP, 2.4RP, 4.4RP, 3.5RP), которые вовлечены в дальнейшие исследования, направленные на разработку высокоэффективных биопрепаратов для лесного

хозяйства. Выделенные штаммы ризосферных бактерий также 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 замерена длина корня и побега (рис. 3). Рис. 3 – Измерение длины корня редиса, инокулированного суспензией ризосферных бактерий. Достоверность различия с контролем проверена с помощью программы Statistica v5.5. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты оценки ростостимулирующей активности выделенных штаммов бактерий на рост редиса сорта «Ранний красный»

Вариант	Штамм	Средняя длина корня, см	Средняя длина побега, см
1	1.2RP	3,72±0,26	1,80±0,07
2	2.6RP	4,22±0,34	1,74±0,09
3	3.1RP	3,92±0,26	1,82±0,08
4	3.5RP	5,70±0,34	1,84±0,08
5	Контроль 1	4,69±0,36	1,97±0,06
6	4.2RP	3,60±0,25	1,47±0,07
7	2.5RP	3,06±0,26	1,60±0,06
8	2.4RP	5,02±0,28	1,82±0,07
9	2.7RP	5,40±0,35	1,74±0,06
10	4.4RP	5,53±0,42	1,91±0,08
11	Контроль 2	5,00±0,42	1,91±0,08

Примечание. р – вероятность. Достоверно значимыми различия считаются при р 0,05. Однофакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что ризосферный штамм 3.5RP достоверно значимо (р = 0,024) стимулирует рост корня редиса. Также следует отметить штаммы (2.7RP, 4.4RP), имеющие тенденцию к стимуляции роста корня, и штаммы (1.2RP, 4.2RP, 2.5RP), которые наоборот угнетают его рост. Достоверно установлено, что ни один из исследованных штаммов не влияет на рост побега редиса.

Выводы

1. В настоящей работе была изучена ризосфера сосны обыкновенной, из которой было выделено 18 бактериальных штаммов. Средняя численность ризосферных бактерий сосны обыкновенной составила $6,6 \times 10^6$ КОЕ в расчете на одно растение.
2. Рестрикционный анализ гена 16S рНК изученных бактерий выявил группы идентичных RFLP-профилей и позволил разделить их на 3 обособленные группы. Последующая молекулярно-генетическая идентификация с использованием программ BLAST и RDP выявила разнообразие в таксономическом положении изучаемых штаммов.
3. Исследование хозяйственно ценных свойств изучаемых микроорганизмов позволило выделить 2 перспективных штамма 3.5RP и 4.4RP, проявляющих как фунгицидную, так и ростостимулирующую активности. Данные штаммы будут включены в дальнейшую работу для создания высокоэффективных биопрепаратов для лесного хозяйства.