

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ЭНДОФИТНЫЕ СИМБИОНТЫ *HERBASPIRILLUM* SPP. КАК
ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ И
КОНКУРЕНТОСПОСОБНЫХ В АДАПТИВНОМ ЗЕМЛЕДЕЛИИ
БИОПРЕПАРАТОВ, СПОСОБНЫХ АКТИВИЗИРОВАТЬ ЗАЩИТНЫЕ
СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Багавовой Арапат Рустамовны

Научный руководитель
доцент, канд. биол. наук


подпись, дата
30.05.2022г.

Ю.П. Федоненко

Научный консультант
канд. биол. наук


подпись, дата
30.05.2022г.

Н.С. Величко

Зав. кафедрой:
профессор, док. биол. наук


подпись, дата
30.05.2022г.

С.А. Коннова

Саратов 2022

Введение

Актуальность работы. Традиционно внимание исследователей привлекает поиск экологически безопасных и энергосберегающих подходов для развития устойчивого земледелия. Все большее внимание уделяется разработке конкурентноспособных микробных препаратов для агrobiотехнологии. Особого внимания заслуживают эндофитные представители родов *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rhizobium* и *Herbaspirillum*, обладающих ценными функциональными свойствами и являющихся перспективными биотехнологическими ресурсами, способными стать адекватной и экологически безопасной альтернативой агрохимикатам.

Повсеместное распространение бактерий рода *Herbaspirillum* (в почве, воде, на поверхности и во внутренних тканях растений), активный синтез ими метаболитов широкого спектра действия, высокая адаптивная способность к различным условиям окружающей среды, разнообразие биосинтетических и катаболических реакций, особенности генетической организации позволяют рассматривать их не только в качестве перспективного объекта для применения в области биотехнологии, но и в качестве модельного объекта для изучения экологической роли тесно связанного с растением-хозяином эндофитного сообщества. Несмотря на наличие работ по оценке поведения бактерий в рода *Herbaspirillum* в сельскохозяйственных системах [1-5] малоизученными остаются способ их проникновения в специфическую экологическую нишу и физиологические механизмы потенциально полезных ассоциаций.

Растения способны воспринимать сложный набор молекул на основе гликанов, которые можно найти в разных слоях клеточных стенок бактерий. Одними из таких физиологически активных соединений являются липополисахариды (ЛПС) – основные компоненты внешней мембраной клеточной стенки грамотрицательных бактерий [6]. На данный момент феномен опосредованной регуляции иммунного ответа хозяина

продемонстрирован для широкого спектра патогенов, при этом работы по изучению механизмов взаимоотношений и роли ЛПС в индукции защитных реакций в системах растение-микроорганизм представлены фрагментарно, что является одной из основных причин, сдерживающих разработку более эффективных микробных препаратов комплексного действия для повышения продуктивности и устойчивости растений.

Цель исследования: оценить роль эндофитных бактерий *H. lusitanum* P6-12^T как потенциальной основы микробиологических препаратов для растениеводства.

Для реализации цели решали следующие задачи:

1. Выявление возможных путей проникновения и характера распределения клеток гербаспирилл *in planta* на примере зернобобовых культур и штамма *H. lusitanum* P6-12^T с репортерным геном *gfp*;

2. Оценка влияния бактеризации на морфо-биологические показатели фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) и мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.);

3. Исследование индуцированного роста и реакций растений в ответ на инокуляцию эндофитом *H. lusitanum* P6-12^T и экстрагированным с его поверхности ЛПС.

4. Оценка эффективности применения *H. lusitanum* P6-12^T в препаратах биоконтроля.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили бактериальные штаммы *Herbaspirillum lusitanum* strain P6-12^T, *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, предоставленные коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (IBPPM 515, IBPPM 278, IBPPM 130 <http://collection.ibppm.ru/>). В качестве возбудителей гнилей использовали грибы *Fusarium oxysporum* (Schlecht) f. sp. *pisi* (Hal.) и *Alternaria alternata* из коллекции VKM (All-Russian collection of microorganisms) (F-137; F-1120 <http://www.vkm.ru/>).

Культуру *H. lusitanum* P6-12^T выращивали на жидкой синтетической малатной среде с глюкозой [7], *Pseudomonas syringae* и *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* – на среде Luria-Bertani (LB) при перемешивании на вибростенде (160 rpm, 30±1 °C) до окончания экспоненциальной фазы роста. Грибные фитопатогены выращивали на картофельно-глюкозном агаре. Для трансформации штамма *H. lusitanum* P6-12 использовали среду SOC (Sigma-Aldrich). В качестве селективного антибиотика при трансформации использовали гентамицин мкг мл⁻¹, (Sigma-Aldrich).

Объектом исследования служили проростки семян пшеницы (*Triticum aestivum* L. «Саратовская 29») и фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L. «Баллада 29»), любезно предоставленные ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока» (Саратов, Россия) и ФГБНУ Федеральный научный центр риса (Краснодар, Россия) соответственно. Семена поверхностно стерилизовали и проращивали в чашках Петри на плотной агаризованной среде при 30 °C в течение 3 дней в темноте [8]. Проверку чистоты поверхностной стерилизации семян оценивали по рассевам на среде LB 48 ч при 25 °C [8].

Определения динамики титра клеток *H. lusitanum* P6-12^T в инфицированных растениях проводили через 1, 3, 4, 5, 6 и 7 суток после инокуляции. Для исследования способности бактерий колонизировать все компартменты растения, корни и листья отбирали в выбранный день после инокуляции и поверхностно стерилизовали. Затем гомогенизировали растиранием в ступке, экстракты разбавляли 1 мл стерильного PBS. Количество колонизирующих бактерий оценивали путем посева нескольких разведений экстрактов на чашки с селективной средой для *H. lusitanum* P6-12^T.

Исследование индуцированного роста и реакций растений проростки помещали в биологические пробирки, заполненные стеклянными шариками и 10 мл жидкой среды для растений с добавлением микроорганизмов (10⁻⁹ КОЕ

мл⁻¹) или ЛПС (10 мкг/мл). Инокулированные семена помещали в камеру для выращивания при 24/19 °С и 16/8 ч на 20 дней. Морфометрические показатели оценивали на 7-е сутки. Для определения сухого веса корней и побегов, было собрано восемь случайных проб (20 растений). Образцы высушивали до постоянной массы при 80 °С, 48 ч. Контролем служили аналогично обработанные семена без инокуляции бактериями.

Трансформацию клеток плазмидным вектором осуществляли методом электропорации на приборе MicroPulser («BioRad», США) с использованием предустановленной программы и протокола для трансформации *E. coli* в электропорационной кювете 0,1 см. Успешно трансформированные клетки приобретали устойчивость к антибиотику. Выросшие колонии проверяли на наличие зеленой флуоресценции с использованием флуоресцентного микроскопа (Leica DMI3000B, оборудованного камерой Leica 420 D CCD (Leica Microsystems, Германия) и набора фильтров No 10, EX BP 450-490, BS F 510, EM LP 515-565).

Для доказательства эндофитной природы и выяснения путей колонизации тканей растения применяли штаммом *H. lusitanum* P6-12^T трансформированный плазмидой, несущей ген зеленого флуоресцирующего белка. 3-х дневные проростки пшеницы и фасоли инокулировали *H. lusitanum* P6-12^T-*gfp*. После инокуляции семена помещали в стеклянные пробирки, заполненные автоклавированными стеклянными шариками и 10 мл стерильного модифицированного раствора Хогланда [9-10] при 24 °С в течение 16 ч в дневное время и при 19 °С в течение 8 ч в ночное время в течение 7 дней. В качестве контроля использовали не инокулированные семена в экспериментальных условиях.

Флуоресцентно окрашенные бактерии наблюдали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI3000B, оборудованного камерой Leica 420 D CCD (Leica Microsystems, Германия) и конфокального микроскопа TCS SP5 Leica, на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Клетки визуализировали использованием свежесобранных целых корней или

нарезанных вручную срезов корней. Образцы помещали на предметное стекло, погружали в среду, препятствующую выцветанию (Citifluor Ltd., Кентербери, Великобритания), и закрывали покровными стеклами. При пробоподготовке дополнительное окрашивание не применялось. Чтобы обнаружить белок GFP, использовался комплект оптических фильтров № 10 (диапазон длин волн возбуждения BP 450-490, диапазон длин волн излучения BP 515-565).

Определение содержания оксида азота в корнях пшеницы мягкой и фасоли обыкновенной проводили согласно [11]. Измерения проводили в 3-кратной биологической и аналитической повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office.

Для определения содержания перекиси водорода пользовались методикой, предложенной [12]. По полученным данным строили калибровочную кривую в координатах оптическая плотность – концентрация перекиси водорода. Определение содержания пероксидазы проводили согласно [13].

Антагонистическую активность микроорганизмов по отношению к фитопатогенным грибам и фитопатогенным микроорганизмам оценивали в чашках Петри методом агаровых блоков в трехкратной повторности.

Структура и объем работы. Работа включает в себя такие структурные элементы, как Содержание, Обозначения и сокращения, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список литературы. Работа проиллюстрирована 14 рисунками и 3 таблицами. Список литературы состоит из 139 наименований. Объем работы составляет 62 страницы.

Основное содержание работы

Глава «Основная часть» содержит анализ данных о физиолого-морфологических особенностях *Herbaspirillum* spp., формировании мутуалистических взаимоотношений, путях проникновения эндофитных бактерий внутрь специфической экологической ниши, роли антиоксидантной

системы растений на воздействие внешних факторов, роли ЛПС бактерий в индукции защитных реакций.

Глава «Результаты исследования и их обсуждение» включает экспериментально полученные данные о способности штамма *H. lusitanum* P6-12^T эндофитно колонизировать растительные ткани однодольных и двудольных культурных растений, возможных путей проникновения микроорганизма во внутреннюю среду растения. Так как штамм исследуемых бактерий был выделены из клубеньков растений фасоли, может возникнуть вопрос о хозяйской специфичности микроорганизмов и, соответственно, специфичности ответа вида растения. В связи с этим мы оценивали эффект инокуляции семян штаммом *H. lusitanum* P6-12^T, не только на рост проростков фасоли, но и пшеницы. Результаты показали, что штамм проявляет способность к агрессивной колонизации исследуемых зернобобовых культур, без видимых негативных последствий для растения. Отмечено увеличение популяции *H. lusitanum* P6-12^T с 1-го по 7-й день после инокуляции. Для подтверждения того, что выделенные с поверхности стерилизованных корней бактерии относятся к *H. lusitanum* P6-12^T, нами были проанализировали случайно выбранные колонии с помощью ИФА-ELISA с использованием кроличьих антител, полученных к ЛПС *H. lusitanum* P6-12^T.

Показана способность *H. lusitanum* P6-12^T стимулировать рост растений. Через семь дней инкубирования прирост общей сухой биомассы для исследуемых растений был выше, чем для не инокулированных образцов.

Для исследования *in vitro* влияния ЛПС штамма *H. lusitanum* P6-12^T на морфологические показатели *T. aestivum* и *P. vulgaris* использовали охарактеризованные в наших предыдущих исследованиях препараты ЛПС для обработки 3-дневных проростков. Инокуляция проростков *T. aestivum* ЛПС увеличила длину корней на 10 % по сравнению с контролем, но не оказала влияния на общую длину побега и coleoptilya. В результате эксперимента показано значительное увеличение биомассы корней по сравнению с контролем на 45 %. Бактерии *H. lusitanum* P6-12^T незначительно

повлияли на общую длину побега (8 %) и не повлияли на длину колеоптиля. Инокуляция проростков *P. vulgaris* ЛПС *H. lusitanum* P6-12^T привела к увеличению длины гипокотыля на 152 %, в то время как средняя длина главного корня увеличилась на 184 %. При инокуляции проростков *P. vulgaris* культурой *H. lusitanum* P6-12^T, наблюдали увеличение длины гипокотыля и главного корня на 124 и 189 % соответственно.

В результате проведенной работы показано, что *H. lusitanum* P6-12^T проникает в растение через корневой чехлик, корневые волоски, распространяется по проводящим тканям, а затем и по всему растению. Исследование целых частей корня позволило доказать способность *H. lusitanum* P6-12^T эндофитно колонизировать клетки коры корней *T. aestivum* и *P. vulgaris*.

Характер изменения содержания оксида азота при инокуляции проростков *P. vulgaris* бактериями *H. lusitanum* P6-12^T и препаратом их ЛПС отличался. При обработке корней фасоли ЛПС *H. lusitanum* P6-12^T содержание NO увеличилось до 0,37 мг/мл, в то время как бактериализация не оказывала существенного влияния на содержание оксида азота в корнях *P. vulgaris*.

В корнях фасоли содержание перекиси водорода при их инокуляции штаммом *H. lusitanum* P6-12^T значительно возрастало (0,04 мкмоль/г) по сравнению с контрольными растениями. В отношении растений фасоли, обработанных ЛПС *H. lusitanum* P6-12^T, изменений не наблюдали.

Воздействие бактериальной суспензии *H. lusitanum* P6-12^T и очищенного препарата ЛПС на проростки фасоли индуцировало интенсивную продукцию пероксидазы. Ее содержание увеличилось до 26,8 и 22,7 моль/г соответственно. Таким образом, можно сделать вывод, что присутствие бактерий *H. lusitanum* P6-12^T стимулирует активность защитных реакций растений фасоли *P. vulgaris*.

Инокуляция проростков пшеницы культурой *H. lusitanum* P6-12^T и очищенным препаратом ЛПС приводила к незначительному по сравнению с

контролем увеличению содержания оксида азота в корнях. Концентрация оксида азота возросла до 0,04 и 0,1 мг/мл соответственно.

При инокуляции проростков пшеницы бактериями и ЛПС *H. lusitanum* P6-12^T было отмечено значительное увеличение концентрации перекиси водорода в корнях. Так, бактериальная суспензия повысила содержание H₂O₂ до 0,034, а ЛПС – до 0,04 мкмоль/г относительно контроля.

Была изучена пероксидазная реакция в ответ на действие бактерий и ЛПС *H. lusitanum* P6-12^T. Результаты работы показали изменение активности пероксидазы в обоих случаях. Концентрация фермента увеличилась до 7,8 и 3,6 моль/г соответственно.

Растущий интерес к использованию эндофитных бактерий родов *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia* и *Rhizobium* в агробиотехнологии обусловлен их способностью увеличивать рост и продуктивность экономически важных культур, ингибировать рост фитопатогенных грибов *in vitro* и фиксировать азот. *H. lusitanum* P6-12 присутствует в эндомикробиоме *P. vulgaris* [14] и в клубеньках бобовых *Arachis hypogaea* и *Mucuna pruriens*, поэтому его можно назвать типичным представителем микрофлоры растений. Многие клубеньковые эндофиты способны подавлять рост растительных патогенных грибов [15]. В частности, таким фунгистатическим действием обладают ризобии [16]. Предполагается, что обнаруженная в ходе данной работы способность *H. lusitanum* P6-12^T подавлять рост возбудителей корневых гнилей поможет растениям-хозяевам справляться с грибковыми заболеваниями. Это открывает возможность использования *H. lusitanum* P6-12^T в препаратах биоконтроля.

Выводы

1. Доказана способность штамма *H. lusitanum* P6-12^T эндофитно существовать в тканях растений. Дана оценка стратегии колонизации специфичного и неспецифичного растения-хозяина. Установлено, что этот эндофит может проникать в корни растений через корневой чехлик, повреждения ризодермы, заселять корневые волоски и распространяться по всем органам и тканям.

2. Показано, что штамм *H. lusitanum* P6-12^T способен позитивно влиять на рост растения-хозяина. Наблюдалось увеличение значения всех морфобиологических показателей.

3. Отмечена положительная динамика изменения содержания оксида азота, перекиси водорода и пероксидазы в корнях *P. vulgaris* и *T. aestivum* в результате воздействия бактерий *H. lusitanum* P6-12^T и их ЛПС.

4. Обнаружена способность *H. lusitanum* P6-12^T подавлять развитие некоторых фитопатогенных бактерий и грибов.

Список литературы

1. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species / A. Elbeltagy [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 5285-5293.
2. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. / E. K. James [et al.] // *Moench. J. Exp. Bot.* – 1997. – V. 48. – P. 785-797.
3. The estimation of the amount of nitrogen fixation in the sugarcane by ¹⁵N dilution technique / T. Nishiguchi [et al.] // *Bulletin. Faculty. Agric. Univ. Miyazaki.* – 2005. – V. 51. – P. 53-62.
4. Occurrences of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae / F. L. Olivares [et al.] // *Biol. Fertil. Soils.* – 1996. – V. 21. – P. 197-200.
5. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum* / F. L. Olivares [et al.] // *New Phytol.* – 1997. – V. 135. – P. 723-737.
6. Whitfield, C. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides / C. Whitfield, M. S. Trent // *Annu. Rev. Biochem.* – 2014. – V. 83. – P. 99-128.
7. Оводов, Ю. С. Химия иммунитета / Ю. С. Оводов. – Сыктывкар: Изд-во Сыктывкарского ГУ, 1997. – 203 с.
8. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* // M. A. Schmidt [et al.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2011. – V. 44. – P. 182-185.
9. Terry, N. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo / N. Terry // *Plant Physiology.* – 1980. – V. 65. – P. 114-120.
10. Rothballer, M. In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties / M. Rothballer, M. Schmid, A. Hartmann // *Symbiosis.* – 2003. – V. 34. – P. 261-279.

11. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *stylosanthesquianensis* / B. Zhou [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V.56, № 422. – P. 3223-3228.

12. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the Auxin-Regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants / D. Bellincampi [et al.] // *Plant Physiology.* – 2000. – V. 122. – P. 1379-1385.

13. Пат. 2180114 Российская Федерация. Способ определения пероксидазной активности в биологических жидкостях / Л. Ф. Азнабаева, Ф. А. Кильсенбаева, Н. А. Арефьева. - Заявка № 2000125850/14 от 13.10.2000; опубл. 27.02.2002.

14. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris* / A. Valverde [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53, № 6. – P. 1979-1983.

15. Virtual Geographic Environments (VGEs): A new generation of geographic analysis tool / H. Lin [et al.] // *Earth-Science Reviews.* – 2013. – V. 126. – P. 74-84.

16. Enhanced defence responses of chickpea plants against *Rhizoctonia solani* by pre-inoculation with *Rhizobia* / I. Hemissi [et al.] // *Journal of Phytopathology.* – 2013. – V. 161, № 6. – P. 412-418.

