

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ЭНДОФИТОВ
ПШЕНИЦЫ И ИХ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ**

Автореферат бакалаврской работы

Студента 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Долгова Алексея Романовича

Научный руководитель
зав. каф., д-р биол. наук, проф.



С. А. Степанов

Зав. кафедрой
д-р биол. наук, проф.



С. А. Степанов

Саратов 2025

Введение. Твёрдая пшеница является важнейшей сельскохозяйственной культурой Саратовской области. С мягкой пшеницей на них приходится более четверти всех сельскохозяйственных площадей, отданных под посевы в Саратовской области.

Твердая пшеница — ценная продовольственная культура для производства макаронных изделий и крупы, отличающаяся от мягкой пшеницы меньшей пластичностью и повышенной устойчивостью к засухе, зерно содержит больше клейковины. Традиционно для повышения ее ростовых характеристик применяют минеральные удобрения, однако их использование имеет недостатки, связанные с экологическими рисками. Тогда как биопрепараты, особенно на основе эндофитов (симбиотических микроорганизмов, обитающих внутри растений), предлагают экологически безопасную альтернативу для стимуляции роста и биофортификации. Хотя потенциал таких препаратов велик, для их широкого внедрения требуются дальнейшие исследования механизмов действия эндофитов и оптимизации применения в различных агроусловиях.

В обзорной части работы систематизированы современные представления о роли эндофитных микроорганизмов в агроэкосистемах, с акцентом на их ростостимулирующий потенциал, механизмы взаимодействия с растениями (синтез фитогормонов, солюбилизация питательных элементов, индукция системной резистентности) и зависимость биоразнообразия от генотипа хозяина. Анализ литературных данных выявил, что бактериальные эндофиты пшеницы, представленные преимущественно родами *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Pantoea*, способны повышать урожайность до 1,7-1,9 раз за счет оптимизации минерального обмена и усиления стрессоустойчивости [1,2]. Особое внимание уделено эколого-физиологическим особенностям яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) саратовской селекции [3, 4], чья высокая требовательность к условиям выращивания определяет актуальность поиска эффективных биостимуляторов.

В экспериментальной части проведен комплексный анализ эндофитных сообществ трех сортов яровой твердой пшеницы (Саратовская золотистая, Луч

25, Памяти Васильчука). Методом серийных разведений после поверхностной стерилизации [5] выделены бактериальные штаммы из семян и вегетативных органов растений на ключевых фазах онтогенеза: прорастание-первый лист (11 сут.), стебление (35 сут.), колошение (60 сут.). Идентификация изолятов сочетанием биохимического тестирования [6] и MALDI-TOF масс-спектрометрии [7] позволила установить таксономическую структуру сообществ, оценить их сортоспецифичность и динамику в онтогенезе. Далее оценивалась ростостимулирующая активность: семена инокулировали суспензиями доминантных штаммов (10^7 КОЕ/мл), положительным контролем служили семена, обработанные 1-нафтилуксусной кислотой, отрицательным – поверхностно-стерилизованные, необработанные семена. Далее проводился анализ морфометрических показателей проростков через 8 суток культивирования, после чего проводилась статистическая обработка данных.

Цель данной работы заключалась в анализе биоразнообразия эндофитных микроорганизмов яровой твердой пшеницы и оценке их ростостимулирующей активности.

Для решения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Выделить, идентифицировать и оценить биоразнообразие эндофитов 3-х сортов твердой пшеницы из семян и различных органов на разных стадиях фенофазы.
2. Проанализировать ростостимулирующую активность эндофитных бактерий на прорастание семян твердой пшеницы с определением морфометрических показателей.

Структура и объем работы. Работа изложена на 64 странице машинописного текста и включает 7 разделов: определения, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, заключение, список использованных источников, содержащий 76 наименований.

Научная новизна и значимость работы. Впервые было изучено и

проанализировано биоразнообразие эндофитных микроорганизмов яровой твёрдой пшеницы сортов саратовской селекции Саратовская золотистая, Памяти Васильчука и Луч 25, а также морфометрическая оценка ростостимулирующей активности штаммов *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*.

Основное содержание работы. В обзоре литературы систематизированы современные данные о роли эндофитных бактерий в агроэкосистемах: механизмах колонизации растений (корневая экссудация, горизонтальная/вертикальная передача), биохимических аспектах взаимодействия (синтез индол-3-уксусной кислоты, сидерофоров, солюбилизация фосфатов), а также влиянии генотипа хозяина на формирование микробиоты [1, 2]. Особое внимание уделено физиологическим особенностям твердой пшеницы – строению, отличию от мягкой пшеницы [8]. Проанализированы сорта саратовской селекции (Саратовская золотистая, Луч 25, Памяти Васильчука) [4].

Материалы и методы. В работе использовали семена и растения яровой твёрдой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) сортов Саратовская золотистая», Луч 25 и Памяти Васильчука, полученные в ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока» (Саратов). Поверхностно стерилизовали (3% H_2O_2 : 96% этанол, 1:1, 15 мин) [5] образцы растений гомогенизировали в 10 мл стерильного 0,9% NaCl. Стерильность контроля проверяли методом отпечатков и посевом последнего промывочного раствора на ГРМ-агар. Гомогенаты высевали на ГРМ-агар, инкубировали 24–48 ч при температуре плюс 28 °С [1, 5]. Изолированные колонии пересевали на ГРМ-агар. Идентификацию бактерий проводили на основании изучения фенотипических свойств по определителю бактерий «Bergey's manual of determinative bacteriology» [6]. Верификацию видовой идентификации осуществляли с использованием метода MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия).

Чистые культуры эндофитов исследовали на ростостимулирующий потенциал путем анализа морфометрических параметров корней и первого

листка, статистическую значимость. Семена обрабатывали суспензиями эндофитных бактерий *P. agglomerans*, *B. pumilus*, *B. altitudinis* и *P. chlororaphis*, выделенных из тканей пшеницы в ходе предварительных исследований. После 30-минутного замачивания в бактериальной суспензии с концентрацией 10^7 КОЕ/мл семена высевали на стерильные диски из фильтровальной бумаги в чашки Петри [5]. Для сравнения использовали синтетический ауксин – 1-нафтилуксусную кислоту (положительный контроль) в концентрациях 1, 10 и 25 мг/л и необработанные поверхностно-стерилизованные семена (отрицательный контроль).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов статистики в программе Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Статистическую значимость определяли, сравнивая экспериментальные образцы с контролем. Для этого применяли критерий Шапиро-Уилка, после чего использовали тест Манна-Уитни. Всю обработку статистической значимости проводили с использованием самописного скрипта на языке Python с использованием библиотек *numpy* и *scipy.stat* [8].

Проводили анализы:

1. всхожести семян (%) по ГОСТ Р 52325-2005 [9];
2. биоразнообразия эндофитов трёх сортов;
3. эффективности и безвредности стерилизации для семян;
4. морфометрические параметры проростков семян, обработанных 1-нафталинуксусной кислотой (NAA) [10];
5. фитотоксического эффекта 1-нафталинуксусной кислоты по показателям фитотоксического действия на рост корневой системы [11].

Результаты исследования. В результате микробиологического исследования семян и органов трех сортов яровой твердой пшеницы саратовской селекции Саратовская золотистая, Памяти Васильчука и Луч 25 был выделен 31 штамм эндофитных микроорганизмов. Таксономический анализ позволил идентифицировать эти штаммы как представителей 9 видов, относящихся к 6

родам бактерий (таблица 1).

Таблица 1 – Таксономическое положение выделенных эндофитных микроорганизмов

Вид	Количество штаммов (% от общего количества)	Семейство	Порядок	Класс	Тип
<i>Pantoea agglomerans</i>	8 (25,8%)	Erwiniaceae	Enterobacteriales	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
<i>Enterobacter cloacae</i>	7 (22,6%)	Enterobacteriaceae			
<i>Citrobacter koseri</i>	2 (6,5%)				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3 (9,7%)	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1 (3,2%)				
<i>Bacillus mycoides</i>	7 (22,6%)	Bacillaceae	Bacillales	Bacilli	Bacillota
<i>Bacillus altitudinis</i>	1 (3,2%)				
<i>Bacillus pumilus</i>	1 (3,2%)				
<i>Staphylococcus lentus</i>	1 (3,2%)	Staphylococcaceae			
Всего	31 (100%)	-	-	-	-

Доминирующими видами по количеству выделенных штаммов стали *P. agglomerans* – 8 штаммов, 25,8 % и *E. cloacae* – 7 штаммов, 22,6 %, *B. mycoides* – 7 штаммов, 22,6 %, *P. fluorescens* – 3 штамма, 9,7 %, *C. koseri* – 2 штамма, 6,5 %, *B. altitudinis* – 1 штамм, 3,2 %, *B. pumilus* – 1 штамм, 3,2 %, *P. chlororaphis* – 1 штамм, 3,2 % и *S. lentus* – 1 штамм, 3,2%.

Анализ филогенетического состава показал преобладание грамотрицательных бактерий типа Pseudomonadota – 21 штамм, 68 %, представленных родами *Pantoea*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Pseudomonas*, над грамположительными бактериями типа Bacillota – 10 штаммов, 32 %, представленными родами *Bacillus* и *Staphylococcus* (рисунки 5, 6).

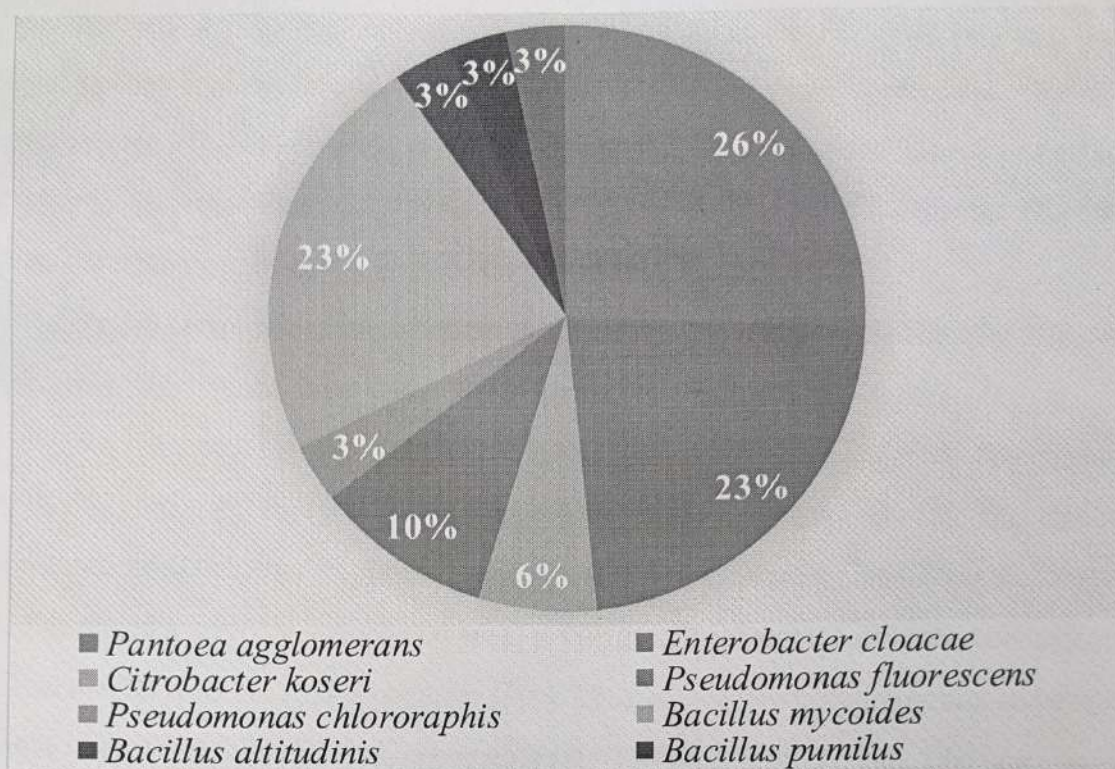


Рисунок 5 — Соотношение видов эндофитов по количеству выделенных штаммов



Рисунок 6 — Соотношение грамотрицательных и грамположительных видов выделенных эндофитов

Микробиота семян была представлена видами *P. agglomerans* (индекс встречаемости R=100 %), *E. cloacae* (R=67 %), *B. mycoides* (R=67 %), *B. altitudinis* (R=33 %) и *B. pumilus* (R=33 %). Наибольшее сходство видового состава эндофитов семян, рассчитанное по коэффициенту Жаккара (KJ=40 %), отмечено между сортами Саратовская золотистая и Луч 25.

Состав эндофитного сообщества демонстрировал выраженную динамику в зависимости от фазы вегетации растения и исследуемого органа.

На 11-й день после прорастания (фаза проростка – первый лист), помимо сохраняющихся *P. agglomerans* (R=100 %) и *B. mycoides* (R=33 %), в листьях появились новые виды: *P. fluorescens* (R=67 %) и *C. koseri* (R=67 %). К 35-му дню (фаза выхода в трубку – стеблевание) в корнях, стеблях и листьях доминировали *E. cloacae* (R=100 %) и *B. mycoides* (R=67 %), а у сорта Саратовская золотистая в корнях был обнаружен *P. chlororaphis* (R=33 %). На 60-й день (фаза колошения – начало цветения) видовое разнообразие снизилось; *P. agglomerans* был повторно выделен из колоса сортов Луч 25 и Памяти Васильчука (R=67 %), что указывает на возможную вертикальную передачу этого вида от взрослых растений к семенам. *B. mycoides* был обнаружен в листьях сорта Памяти Васильчука, а *S. lentus* – в стебле Саратовской золотистой.

Количественная оценка обсемененности (КОЕ/г сырой массы) выявила значительные изменения численности эндофитов в ходе онтогенеза (Рисунок 7). Наблюдалась тенденция к элиминации грамположительных бактерий рода *Bacillus* снижение с 700 КОЕ/г в семенах до 100 КОЕ/г на поздних фазах и увеличению численности грамотрицательных бактерий: *E. cloacae* с 1000 КОЕ/г до 10000 КОЕ/г, *P. agglomerans* с 1000 КОЕ/г до 3000 КОЕ/г и *P. chlororaphis* до 10000 КОЕ/г к 35-му дню.

Исследование влияния поверхностной стерилизации семян (70% этанол, 30% гипохлорит Na) на их всхожесть и морфометрию проростков показало, что метод обеспечивает эффективное обеззараживание без критического угнетения жизнеспособности семян. Всхожесть стерилизованных семян составила 90 %, а

что соответствует ГОСТ Р 52325-2005 [10], против 98 % у нестерильных семян. Медианная длина первого листа и корня стерилизованных семян была незначительно больше, чем у нестерилизованных, однако статистическая достоверность этих различий не подтвердилась ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни). Это позволило использовать поверхностно-стерилизованные семена в качестве отрицательного контроля в последующих экспериментах.

Оценка влияния синтетического ауксина 1-нафтилуксусной кислоты (NAA) на прорастание и рост проростков выявила его выраженную дозозависимость. Концентрация 1 мг/л способствовала всхожести 93,4 % и стимулировала рост первого листа у всех сортов по сравнению с отрицательным контролем. Однако концентрации 10 мг/л и 25 мг/л оказали угнетающее действие: всхожесть снизилась до 80 % и < 60 % соответственно, а длина первого листа и особенно корней значительно уменьшилась. Фитотоксический эффект NAA на корневую систему был статистически значимым ($p < 0,05$) и выраженным: средний эффект торможения роста корней составил 56 %, что превышает порог значимости в 20 %. При оптимальной относительно надземной части растения концентрации (1 мг/л) 1-нафтилуксусной кислоты статистически достоверно ингибировала рост корней у всех сортов.

Исследование ростостимулирующей активности штаммов выделенных эндофитных бактерий: *P. agglomerans*, *P. chlororaphis*, *B. altitudinis*, *B. pumilus*, выявило достоверную ростостимулирующую активность у части штаммов. Наибольшее статистически достоверное увеличение медианной длины первого листа по сравнению с отрицательным контролем, продемонстрировал штамм *B. pumilus* ($+22,6 \pm 3,9$ мм) (таблица 2).

Таблица 2 — Морфометрические показатели длины первого листа проростков яровой твёрдой пшеницы (8-е сутки после посева)

Варианты обработки семян твёрдой яровой пшеницы	Длина первого листа проростков сортов яровой твёрдой пшеницы, Ме [Q1-Q3], мм			Среднее по медиане м, мм	Разность средних с отрицательным контролем, мм	Разность средних с положительным контролем, мм
	Саратовская золотистая	Памяти Васильчука	Луч 25			
Положительный контроль	60 [51-61]	60 [53-69]	58 [52-61]	59±1,3	6,7±2,6	
Отрицательный контроль	50 [46-56]	56 [55-65]	52 [44-64]	52,7±3,5		-6,7±2,6
<i>P. agglomerans</i>	52 [46-53]	63 [54-64]	59 [50-62]	57,8±6,3	5,3±3,5	-1,3±4,5
<i>P. chlororaphis</i>	51 [46-54]	57 [49-61]	57 [46-64]	54,8±3,9	2,3±3,7	-4,2±2,9
<i>B. altitudinis</i>	47[40-51]	68 [54-75]*	62 [58-67]*	58,8±10	6,3±6,6*	-0,3±6,4
<i>B. pumilus</i>	71 [63-78]*	78 [71-83]*	77 [70-80]*	75,3±4,3	22,6±3,9*	16,3±3,2*

Примечание – *Статистически значимые различия $p < 0,05$.

B. altitudinis также достоверно увеличил длину первого листа у сортов Памяти Васильчука и Луч 25 (+6,3±6,6) мм в среднем. Обработка *P. agglomerans* и *P. chlororaphis* не привела к статистически значимому увеличению длины первого листа. По сравнению с положительным контролем (NAA 1 мг/л), *B. pumilus* показал достоверно большую длину первого листа (+16,3±3,2 мм).

Наибольшую длину корня среди штаммов обеспечил *B. pumilus* (+10,3±6,8) мм относительно отрицательного контроля. *P. chlororaphis* также достоверно увеличил длину корня (+4,0±3,1 мм). *B. pumilus* также превзошел NAA по стимуляции роста корней (+38,2±4,1 мм) (таблица 3).

Таблица 3 — Морфометрические показатели длины корня проростков (8-е сутки после посева)

Варианты обработки семян твёрдой яровой пшеницы	Длина корня проростков сортов яровой твёрдой пшеницы, Ме [Q1-Q3], мм			Среднее по медианам, мм	Разность средних с отрицательным контролем, мм	Разность средних с положительным контролем, мм
	Саратовская золотистая	Памяти Васильчука	Луч 25			
Положительный контроль	18 [13-23]	29 [25-34]	19 [11-25]	22±6,9	-27,8±6,4	
Отрицательный контроль	46 [29-58]	56 [37-77]	48 [32-64]	50±6		27,8±6,4
<i>P. agglomerans</i>	51 [36-59]	68 [45-77]*	50 [32-59]	56,3±11,4	6,3±9,1	34,3±9,4*
<i>P. chlororaphis</i>	55 [32-64]*	52 [36-64]	55 [39-71]*	54±1,6	4,0±3,1*	32±4,2*
<i>B. altitudinis</i>	52 [38-59]	55 [40-75]	53 [42-65]*	53,3±1,7	3,5±3,8	31,3±5,0*
<i>B. pumilis</i>	53 [38-69]*	58 [45-80]*	70 [52-76]*	60,2±8,3	10,3±6,8*	38,3±7,1*

Примечание — * статистически значимые различия $p < 0,05$

Все тестируемые бактериальные штаммы также статистически достоверно превосходили NAA по способности стимулировать рост корней ($p < 0,05$), не проявляя фитотоксического эффекта, характерного для синтетического ауксина.

Выводы. Анализ полученных нами в данной работе результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. Всего из семян и органов растений трех сортов был выделен 31 штамм эндофитных микроорганизмов, принадлежащих к 9 видам, 6 родам бактерий.
2. Исследование выявило вертикальную передачу *P. agglomerans* у пшеницы, зависимость распределения микроорганизмов от сорта, стадии роста и ткани растения. Наиболее сходный состав эндофитной микробиоты был зафиксирован у Луч 25 и Саратовская золотистая (KJ=40%).

3. Проведена оценка ростостимулирующей активности штаммов *P. agglomerans*, *P. chlororaphis*, *B. altitudinis*, *B. pumilus* на прорастание семян твердой пшеницы. Установлено, что штамм *B. pumilus* способен статистически значимо увеличивать показатели начального роста первого листа сеянцев всех исследуемых сортов. Использование *B. pumilus* показало статистически значимое увеличение среднее по медианам длины первого листа на $(22,6 \pm 3,9)$ мм и $(10,3 \pm 6,8)$ мм -- корня, *B. altitudinis* -- на $(6,3 \pm 6,6)$ мм длину первого листа, *P. chlororaphis* на $(4,0 \pm 3,1)$ мм длину корня., обработка суспензией

4. *B. pumilus* статистически значимо увеличила показатели длины первого листа относительно обработанных 1-нафтилуксусной кислотой семян на $(16,3 \pm 3,2)$ мм и корня на $38,3 \pm 7,1$ мм, кроме того все остальные участвующие в эксперименте по ростостимуляции штаммы также значительно превосходили 1-нафтилуксусную кислоту в ростостимуляции корня.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Эффективность биопрепаратов эндофитных бактерий на яровой пшенице и устойчивость агроэкосистемы / А.А. Алферов [и др.] // Плодородие. – 2019. – № 1 (106). – С. 41-44.
- 2 Screening of wheat endophytes as biological control agents against Fusarium head blight using two different in vitro tests / M. Comby [et al.] // Microbiological Research. – 2017. – Vol. 202. – P. 11–20.
- 3 Хачатуров, Э.Г. Морфолого-анатомические аспекты роста и развития *Triticum durum* Desf. сортов саратовской селекции / Э.Г. Хачатуров, В.В. Коробко, С.А. Степанов [Электронный ресурс] // [сайт]. – URL: http://elibrary.sgu.ru/VKR/2021/06-04-01_008.pdf (дата обращения: 20.03.2024). Загл. с экрана. – Яз. рус.
- 4 Гапонов, С.Н. 25 лет сорту Саратовская золотистая / С.Н. Гапонов [и др.] // Зерновое хозяйство России. – 2018. – № 5. – С. 57-60.
- 5 Щербаков, А.В. Эндофитные сообщества сфагновых мхов как источник бактерий – эффективных ассоциантов сельскохозяйственных культур: дис. ... канд. биол. наук / А.В. Щербаков. – СПб., 2013. – 179 с.
- 6 Whitman, W.B., ed. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / W.B. Whitman. – Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2015.
- 7 Advanced Bacterial Identification Software [Электронный ресурс] // [сайт]. – URL: https://tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html (дата обращения: 20.02.2024). Загл. с экрана. – Яз. англ.
- 8 Отзывчивость линий гексаплоидной пшеницы с Rht генами к андрогенезу и влияние условий получения удвоенных гаплоидов на полевые характеристики регенерантов / И. С. Замбриборщ [и др.] // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры. – 2012. – С. 303-307
- 9 Гушин, И.В. Твердая пшеница / И.В. Гушин, Л.А. Германцев, Д.К. Нефедова. – Саратов: Приволжское книжное издательство, 1984. – 64 с.

10 ГОСТ Р 52325-2005. Семена сельскохозяйственных растений. Сортные и посевные качества. Общие технические условия [Электронный ресурс] // [сайт]. – URL: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/posev-4%D1%81%D1%85_2023.xlsx (дата обращения: 08.04.2025). Загл. с экрана. – Яз. рус.

11 Акимов Д.А. Влияние углеводов на содержание суммарного белка в прорастающих семенах пшеницы / Д.А. Акимов, А.К. Подшивалова // Вестник ИРГСХА. – 2018. – № 85. – С. 46-52.

12 Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности: Методические рекомендации / И.В. Пирталия [и др.]. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 15 с.

