

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕНОСА ЭНДОФИТОВ МЕДОНОСНЫХ РАСТЕНИЙ

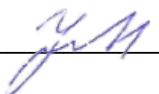
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета

Поливанова Дмитрия Алексеевича

Научный руководитель

проф., д-р биол. наук, доц.

 06.06.25
подпись, дата

Д. В. Уткин

Зав. кафедрой

зав. каф., д-р биол. наук, проф.

 06.06.25
подпись, дата

С.А. Степанов

Саратов 2025

Введение

Актуальность темы. Растительные сообщества представляют собой сложные экосистемы, в которых эндофиты — микроорганизмы, колонизирующие внутренние ткани растений, — играют ключевую роль во взаимодействии с растениями-хозяевами [1]. Особый интерес вызывает малоизученный механизм передачи эндофитов, сохраняющих независимость от хозяев. Углубление знаний о путях их переноса важно для фундаментальных и прикладных исследований в агроценозах и природных экосистемах.

Эндофитные микроорганизмы существенно влияют на жизнедеятельность растений, участвуя в снабжении питательными веществами, защите от биотических и абиотических стрессов, а также в регуляции биогеохимических циклов [1–5]. Однако механизмы их передачи остаются недостаточно изученными. Основные пути колонизации включают вертикальный (через семена и пыльцу) и горизонтальный (через почву, атмосферу, насекомых-векторов) перенос. Наименее исследованы передача через надземные части растений и возможный вертикальный перенос.

Современные исследования как за рубежом, так и в России посвящены, в основном, не самим механизмам передачи, а отдельным представителям микробиоты, их способам переноса [6]. В РФ изучение транспорта эндофитов связано с антропогенным воздействием, при этом преобладают работы по ветроопыляемым злаковым, а не насекомоопыляемым растениям.

Изучение механизмов переноса эндофитов имеет важное практическое значение для:

- 1) способствует разработке микробных препаратов экологической направленности для повышения устойчивости растений к абиотическим и биотическим факторам, а также для снижения загрязнения почв химическими удобрениями;
- 2) позволяет установить контроль распространения эндофитов для защиты экосистем.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы стало определение видового биоразнообразия эндофитов медоносных растений и оценка возможности вертикального и горизонтального переноса микроорганизмов.

Для решения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. анализ биоразнообразия эндофитных микроорганизмов 3-х видов медоносных растений;
2. исследование возможности вертикальной передачи эндофитов последующему поколению растений;
3. проверка способности эндофитов к горизонтальному переносу с помощью насекомых-опылителей;
4. установление степени безопасности/патогенности для растений и насекомых видов бактерий, способных к горизонтальному и вертикальному переносу;
5. характеристика генотипической и фенотипической изменчивости бактерий, выявляемых в разных экологических нишах в результате переноса.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили семена и органы культурных медоносных растений: душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L., 1753), горчицы сарептской (*Brassica juncea* Czern., 1859), гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench., 1794). Так же для исследования были взяты медоносные пчёлы (*Apis mellifera* L., 1758), обножка и продукты пчеловодства (мед, перга).

Материалы исследования проходили тщательную стерилизацию для удаления эпифитной микробиоты [7]. Гомогенаты растительных тканей и семян высевали на ГРМ-агар из разведений 1:10⁴–1:10⁵. Содержимое медового зобика и пергу суспензировали в 3 мл физраствора, перемешивали 1 мин, 200 мкл высевали на РУЕ-агар [8]. Мед высевали штриховым методом на ГРМ-агар. Посевы инкубировали при температуре плюс 28 °С в течение 24-48 ч. Подсчитывали КОЕ/г сырой массы.

Биохимическую идентификацию видов выделенных штаммов проводили с использованием Руководства Берджи по систематике архей и бактерий [12] и on-line определителя ABIS [13]. Верификацию и идентификацию эндофитных микроорганизмов с неустановленным систематическим положением осуществляли с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии. Кроме идентификации, результаты MALDI-TOF-масс-спектрометрии использовали для сравнительного анализа белковых профилей штаммов.

Для изучения патогенных свойств доминирующих видов проводили оценку способности к мацерации растительных тканей, деградации пектиновых веществ, целлюлолитической активности и индукции некроза растительных тканей, а также тестировали активность ферментов агрессии - плазмокоагулазы, лецитиназы, гемолизина и дезоксирибонуклеазы. Все исследования выполнены по стандартным методикам.

Для оценки генетического полиморфизма и установления степени родства между штаммами бактерий использовали RAPD-ПЦР. Наличие или отсутствие ампликонов регистрировали в бинарной матрице. Генетическое сходство оценивали на основе коэффициента Жаккара, а для построения дендрограммы по методу Уорда использовали программу Past v. 4.04 [11].

Структура и объём работы. Работа, изложенная на 60 страницах, включает в себя введение, 3 раздела, заключение, выводы, список использованных источников. Исследование проиллюстрировано 10 рисунками и содержит 8 таблиц. Список использованных источников включает в себя 59 наименований.

Основное содержание работы

В разделе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об эндофитных бактериях, их влиянии на различные биохимические процессы, протекающие в растительных организмах. Также изложена информация об основных способах переноса микроорганизмов: вертикальном пути переноса от родительских организмов дочерним и горизонтальном — между разными растениями, никак не связанными между собой. Подробно разбирается роль

насекомых в формировании микробиоты растений: пути передачи и влияние занесённых бактерий на растительный организм.

В разделе «Результаты исследования» описаны и проанализированы экспериментально полученные данные о биоразнообразии медоносных растений и патогенности доминирующих видов, а также о генотипической и фенотипической изменчивости видов в зависимости от места его изоляции.

Из микробиома изученных объектов было изолировано 57 штаммов микроорганизмов, относящихся к 12 родам и 19 видам. Наибольшее разнообразие эндофитных микроорганизмов наблюдалось в растении душицы обыкновенной (*Origanum vulgare*) и её семенах. Наименьшее разнообразие микробиоты наблюдалось в растении горчицы сарептской (*Brassica juncea*) и гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum*) — по 7 видов в каждом объекте исследований. Низкое видовое разнообразие микроорганизмов, вероятно, связано с наличием в этих растениях различных антибактериальных веществ [12–14].

У всех штаммов были рассчитаны индексы встречаемости и количественные показатели выделенных культур микроорганизмов, что позволило выделить группы доминирующих микроорганизмов, гипотетически способных к горизонтальному и вертикальному переносу.

Проведён анализ доминирующих видов микроорганизмов. Были определены патогенные свойства штаммов преобладающего вида *Bacillus amyloliquefaciens* по отношению к растительным организмам и животным. Все штаммы обладали мацерирующей и пектинолитической активностями. Штаммы, выделенные из мёда и медового зобика были способны к разрушению целлюлозы, так же штаммы, выделенные из мёда, ускоряли некроз. Штаммы 11m, 6m, 15m, 2 m способствовали замедлению некроза растительных тканей, что говорит о возможно антагонистической активности выделенных штаммов по отношению к патогенным микроорганизмам. Из зоопатогенных свойств все изолированные штаммы *B. amyloliquefaciens* были способны к разрушению лецитина. Плазмокоагулязной и фибринолитической активностями не обладал

ни один из штаммов эндофитных и эндобионтных микроорганизмов. Наличие лецитиназной и пектинолитической активностей может положительно влиять на пищеварение пчёл при эндосимбионтном типе взаимодействий [15].

Методом RAPD-анализа были получены электрофоретические профили исследуемых штаммов *B. amyloliquefaciens*. Пять из шести штаммов (1m, 2m, 11m, 15m, 30) демонстрировали идентичные ПЦР-фингерпринты с восемью общими локусами, включая три мономорфных, присутствовавших также у штамма 1b (исходные семена). Штаммы 1m, 2m, 11m, 15m не имели различий между собой. У штамма 30 выявлены два дополнительных полиморфных локуса. Наибольший полиморфизм отмечен у штамма 1b, содержащего шесть уникальных локусов.

Дендрограмма, построенная по RAPD-данным, разделила штаммы на два кластера: 1) 1m, 2m, 11m, 15m; 2) 1b и 30. Наблюдаемые различия геномных профилей коррелируют с биохимическими особенностями материалов изоляции штаммов: Бактерицидные свойства некоторых соединений могли обусловить селективное преимущество специфических геномных вариантов у бактерий, ассоциированных с растениями и насекомыми [16]. Распространение эфирных масел через нектар в медовый зобик пчел способствовало формированию сходных геномных профилей у бактерий из этих сред.

Различия в условиях существования бактерий предполагают изменения в экспрессии белков. Для проверки данной гипотезы был проведен MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ белковых профилей исследуемых штаммов. В диапазоне 2-20 кДа с относительной интенсивностью >1% идентифицировано 90-109 пиков. С помощью программы mMass обнаружено 46 консервативных белков, присутствующих у всех шести штаммов.

В спектрах штаммов 1m, 2m, 11m, 15m доминировали высокомолекулярные рибосомальные белки. Штамм 30 характеризовался максимальной интенсивностью пика 6152 ± 2 Да. Спектр штамма 1b существенно отличался преобладанием низкомолекулярных белков и отсутствием пика 6152 ± 2 Да.

Попарные сравнения выявили минимальные различия между штаммами 1m, 2m, 11m, 15m, 30 ($dJ=0,075-0,158$) и максимальные — со штаммом 1b ($dJ=0,239-0,267$).

Масс-спектрометрический анализ подтвердил различия белковых профилей штаммов из семян, что коррелирует с их уникальным биохимическим окружением. При этом наблюдаемые вариации экспрессии у генетически сходных штаммов (1m, 2m, 11m, 15m, 30) отражают их адаптацию к различным экологическим нишам (растительные ткани, пыльца, медовый зобик).

Выводы

1. Из исследуемых материалов было выделено 57 штаммов микроорганизмов, принадлежащих 19 видам и 12 родам. Среди выделенных микроорганизмов 81% принадлежали к грамположительным бактериям типа *Bacillota*, 19% — к грамотрицательным бактериям типов *Bacteroidota*, *Pseudomonadota*.

2. Численность микроорганизмов варьировала в пределах от $1,2 \times 10^3$ до $2,6 \times 10^6$ КОЕ/г. Наибольшее разнообразие микроорганизмов было отмечено в растении душицы обыкновенной, в горчице и гречихе биоразнообразие было сравнительно ниже, вероятно, из-за способности этих растений к выработке антибактериальных веществ, входящих в состав эфирных масел. Самым низким уровнем разнообразия эндомикробиоты обладали медоносные пчёлы из-за стрессовых факторов для жизнедеятельности бактерий: резких изменений pH среды, низкого уровня влажности и наличия пищеварительных ферментов.

3. На основании полученных результатов подтверждена теория о способности эндофитов к горизонтальному и вертикальному переносу внутри растительного сообщества. Установлены виды эндофитов наиболее приспособленные к горизонтальному и вертикальному переносу (*B. amyloliquefaciens*, *B. pseudomycoides*, *B. pumilus*).

4. Преобладающий вид, *Bacillus amyloliquefaciens* демонстрировал из зоопатогенных факторов лецитиназную активность из фитопатогенных —

пектинолитическую, что может улучшать пищеварение медоносных пчёл при эндобионтном симбиозе. При этом у всех штаммов также наблюдалась вариабельность экспрессии патогенных факторов в зависимости от места их выделения.

5. Установленное генетическое сходство штаммов, изолированных из различных субстратов (пыльца, медоносные пчелы, генеративные и вегетативные органы растений), указывает на их общее филогенетическое происхождение.

6. Выявленные различия в белковых профилях демонстрируют адаптационные изменения микроорганизмов к специфическим условиям среды, выражающиеся в дифференциальной экспрессии генов и модификации метаболических путей. Полученные данные подтверждают значимую роль фенотипической пластичности микроорганизмов в обеспечении их выживания в разнообразных экологических нишах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Эндофитные бактерии в микробных препаратах улучшающих развитие растений / В. К. Чеботарь [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2015. — Т. 51, N 3. — С. 283–289.
2. Al-Hamdani, S. Influence of Symbiotic Interaction between Fungus, Virus, and Tomato Plant in Combating Drought Stress / S. Al-Hamdani, O. Stoelting, M. Morsy // American Journal of Plant Sciences. — 2015. — Vol. 6, N 6. — P. 1633–1640.
3. Doolotkeldieva, T. Effects of Streptomyces Biofertilizer to Soil Fertility and Rhizosphere's Functional Biodiversity of Agricultural Plants / T. Doolotkeldieva, S. Bobusheva, M. Konurbaeva // Advances in Microbiology. — 2015. — Vol. 5, N 7. — P. 555–571.
4. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition / A. P. Dias da Silveira [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. — 2019. — Vol. 112. — P. 283–295.
5. Endophytic Bacteria: Role in Phosphate Solubilization / A. Walia [et al.] // Endophytes: Crop Productivity and Protection. — 2017. — Vol. 2. — P. 61–93.
6. Ulrich, K. Paenibacillus — a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants / K. Ulrich, T. Stauber, D. Ewald // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2008. — Vol. 93, N 3. — P. 347–351.
7. Выделение и оценка биорегуляторных свойств эндофитных бактерий / А. А. Широких [и др.] // Теоритическая и прикладная экология. — 2008. — N 3. — С. 73–80.
8. Typing of Pantoea agglomerans isolated from colonies of honey bees (*Apis mellifera*) and culturability of selected strains from honey / I. Loncaric [et al.] // Apidologie. — 2009. — N 40. — P. 40–54.
9. Определитель бактерий Берджи; В 2-х томах. / Дж. Хоулт [и др.]. — М.: Мир. — 1997 — 800 с.

10. ABIS online. Биохимическая идентификация. [Электронный ресурс]: https://tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html (дата обращения: 11.05.2025) Загл. с экрана.

11. Hammer, O. Paleontological statistica software package for education and data analysis / O. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // *Paleontologia*. — 2001. — Vol. 4, № 1. — 9 pp.

12. Жакова, К. И. Масложировая промышленность. Обзор фундаментальных исследований / К. И. Жакова, В. Н. Бабодей, А. В. Пчельникова // *Пищевая промышленность: наука и технологии*. — 2021. — Т. 14, № 2. — С. 60–73.

13. Табакаева, О. В. Органолептическая оценка качества симбиотического йогурта с биологически активными веществами облепихи и шиповника / О. В. Табакаева, А. В. Табакаев, В. В. Мелькунов // *АПК России*. — 2020. — Т. 27, № 5. — С. 860–866.

14. Фаткуллин, Р. И, Оценка влияния рутина на формирование функциональных свойств кисломолочного продукта / Р. И, Фаткуллин, И. В. Калинина, А. Д. Брызгалова // *Вестник Южно-уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии*. — 2024. — Т. 12, № 1. — С. 43–52.

15. Содержание биологически активных веществ и минеральных элементов в цветочной пыльце в зависимости от региона сбора / В. Л. Захаров [и др.] // *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета — сборник научных трудов*. — Елец: Мичуринский государственный аграрный университет, 2019. — С. 38–43.

16. Сизова, Е. А. Фитобиотики как потенциальные регуляторы функциональной активности микробиома кишечника у цыплят-бройлеров / Е. А. Сизова, К. С. Нечитайло, С. В. Лебедев // *Сельскохозяйственная биология*. — 2022. — Т. 57, № 6. — С. 1071–1082.

