

УДК 634.11: 58.071

**СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ
ЭНДОФИТНОЙ МИКРОБИОТЫ ЯБЛОНИ**

Дубровский Максим Леонидович

кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией
element68@mail.ru

Маслова Марина Витальевна

кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник
Marinamaslova@mail.ru

Сысоев Артем Михайлович

аспирант

Ильичёв Алексей Сергеевич

аспирант

Хорошкова Юлия Викторовна

аспирант

Мичуринский государственный аграрный университет
г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Рассмотрены результаты нескольких зарубежных исследований по изучению эндофитной микробиоты яблони. Отмечено, что многие эндофитные бактерии оказывают стимулирующее действие на рост и развитие яблони как растения-хозяина благодаря синтезу различных соединений.

Ключевые слова: яблоня, эндофитная микробиота, бактерии, грибы, симбионты, фитопатогенные микроорганизмы.

В тканях практически всех растений обитают эндофиты – различные микроорганизмы, которые имеют полезное значение, не причиняют вред или являются патогенными. Часто к эндофитам относят только виды с нейтральной реакцией на организм хозяина и симбионтов. Большинство эндофитных микроорганизмов являются бактериями или грибами. Часть видов используют внутренние ткани растения-хозяина для прохождения отдельных стадий своего развития. Так, у бактерий может наблюдаться миграция между поверхностью и внутренней средой растения в период их эндофитной фазы. Внутри растения они распространяются по сосудам и заселяют межклеточные пространства [1, 2].

Микроорганизмы, находясь в тканях растения-хозяина, выделяют продукты своего метаболизма и с помощью них могут оказывать существенное влияние на физиологические реакции и морфоанатомические признаки. Так, эндофитные бактерии способствуют росту растений тремя различными способами: синтезируют определенные соединения для растений, способствуют усвоению определенных питательных веществ из почвы и контролируют или предотвращают болезни (биологический контроль). Стимуляция роста растения-хозяина продуктами метаболизма эндофитных бактерий включает несколько механизмов: производство жизненно важных ферментов, гормонов (в основном ауксинов, например, ИУК – индолилуксусной кислоты); симбиотическая азотфиксация; антагонизм против фитопатогенов, вызванный выработкой специальных соединений защитного действия (сидерофоров, хитиназ или антибиотиков); солюбилизация (коллоидное растворение) и минерализация питательных веществ, особенно минеральных фосфатов. В свою очередь, от растения-хозяина эндофиты получают относительно стабильные условия среды для проживания и постоянное питание органическими веществами [11-13].

Использование естественных механизмов взаимодействий между эндофитами и растениями-хозяевами может способствовать здоровью последних и играть важную роль в устойчивом сельском хозяйстве с низкими затратами производства как для пищевых, так и для непищевых культур. Понимание механизмов, позволяющих эндофитным бактериям

взаимодействовать с растениями, необходимо для реализации биотехнологического потенциала этих микроорганизмов. В настоящее время увеличилось использование эндофитных бактерий в биотехнологических целях, особенно для биологической борьбы с вредителями и болезнями растений, а также для стимулирования их роста [7]. Для основной плодовой культуры большинства стран мира – яблони (*Malus domestica* Borkh.) различными коллективами ученых были детально изучены механизмы функционирования эндофитных микроорганизмов-симбионтов, их влияние на физиологию растительных тканей и плодоношение деревьев.

Большое значение для корневого питания растений имеет содержание макро- и микроэлементов в почве. Показатели нормального роста и развития побегов возможны только в условиях наличия и необходимых концентраций почвенных соединений, иначе возможно угнетение растений. Благодаря процессам почвенной азотфиксации и выработки растительных гормонов бактериями-эндофитами, у деревьев яблони, выращенных в условиях ограниченного содержания азота в почве, отмечено улучшенные биометрических характеристик. После инокуляции симбиотических эндофитов показатели развития таких растений заметно превосходили контроль. Для детального анализа развития контрольных и опытных растений яблони был использован комплекс экофизиологических показателей: скорость фотосинтеза, устьичная проводимость и плотность распределения устьиц в эпидермисе листьев, транспирация, прирост биомассы, содержание хлорофилла и уровень его флуоресценции, а также показатели плодоношения – урожай, масса плодов и содержание в них растворимых сахаров. Установлено, что заселение растений яблони эндофитными микроорганизмами-симбионтами приводит к снижению плотности устьиц, замедленному старению листьев и увеличению биомассы боковых корней. Важной хозяйственной особенностью также является значительное увеличение урожайности деревьев, массы плодов и содержания растворимых сахаров в них. Было выдвинуто предположение, что эндофитная микробиота может изменять метаболизм углеводов растения-хозяина в условиях

дефицита азота [3].

Для почвенного питания растений важен и другой макроэлемент – калий. В ризосфере яблони было выделено 118 штаммов бактерий, способных связывать калий из соединений и переводить его в форму, доступную для усвоения растением-хозяином. В лабораторных экспериментах удалось идентифицировать 5 штаммов эндофитных бактерий, которые наиболее эффективно связывали катионы калия из единственного используемого источника – калиевого полевого шпата. Для количественной оценки способности усваивать калий был использован пламенный фотометр. Среднее содержание растворимого калия в культуральной среде составило 41,47 мг/л. Штамм K105 показал самую высокую способность связывать калий, увеличивая до 23,1% долю доступных для усвоения растением его катионов. После добавления раствора перекиси водорода доступность поглощения калия повысилась до 31,2%. По итогам комплексного анализа морфологических, физиологических и биохимических характеристик выделенных микроорганизмов, а также филогенетического анализа на основе последовательностей гена 16S рРНК удалось установить принадлежность данных штаммов к 4 родам бактерий: K1 – к *Acinetobacter* sp.; K98, K105 и K115 – к *Pseudomonas* sp., K168 – к *Bacillus* sp. Отмечается, что данные исследования в дальнейшем послужат основой для выделения и анализа новых эффективных калий-соллюбилизирующих бактерий, способствующих улучшению роста и развития плодовых деревьев в условиях почвоутомления, и будут способствовать разработке специальных микробных удобрений для яблони [6].

Из почек деревьев яблони сортов Гала, Голден Делишес и Орловим, выращиваемых в полевых условиях, были выделены тридцать восемь различных штаммов бактерий, из которых 13 изолятов по итогам генетического анализа были отнесены к родам *Curtobacterium*, *Pantoea* и *Pseudomonas*. Биохимические тесты выявили у них признаки, важные для стимуляции роста растения-хозяина, – азотфиксацию, синтез ИУК, соллюбилизацию фосфатов, образование сидерофоров – хелатных соединений железа [8-10].

Из почек яблони было выделено 9 штаммов эндофитных бактерий, способных синтезировать индолилуксусную кислоту в диапазоне концентраций 0,12-0,24 микрограмм на миллиграмм белка в культуре. У ряда других культурных растений также были установлены эндофиты, синтезирующие ауксины из содержащих триптофан субстратов. Так, бактерия *Pseudomonas stutzeri*, выделенная из тканей эхинацеи, способна производить до 18,8 мкг/мл ИУК, актиномицеты синтезировали 77-83 мкг/мл, а эндофиты озимой ржи – 94-95 мкг/мл ИУК [5, 9].

Эндофитные микроорганизмы формируют сложную систему взаимоотношений друг с другом и с растением-хозяином, оказывая влияние на многие важные физиологические и биохимические процессы. Было исследовано разнонаправленное действие семи штаммов бактерий-эндофитов на рост и развитие растений яблони сорта Гала в условиях *in vitro*. Три штамма *Bacillus* sp. (Da_1, Da_4 и Da_5) и штамм *Pseudomonas fluorescens* Ga_1 способствовали пролиферации и росту микропобегов яблони, в то время как штаммы *Bacillus* sp. Oa_4, *P. fluorescens* Ga_3 и *P. orientalis* G_12 подавляли развитие побегов. Экспериментально было установлено, что в клеточной суспензии эффекты ассоциации между эндофитными бактериями и растительными клетками были специфичными для каждого штамма. Модуляцию клеточного окислительно-восстановительного баланса в клетках яблони контролировали с помощью зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетата (H₂DCFDA), при этом наблюдая штамм-специфические эффекты, которые коррелировали с результатами развития побегов в условиях *in vitro*. Протеомный анализ выявил различия в экспрессии белков в клетках яблони, совместно культивируемых с разными штаммами *Bacillus* sp., которые оказывали противоположное влияние на клеточный окислительно-восстановительный баланс и развитие побегов. Штамм *Bacillus* sp. Da_4, усиливающий развитие побегов и окисление H₂DCFDA, индуцировал дифференциальную экспрессию белков, которые в основном участвуют в защитной реакции и регуляции окислительного стресса. Штамм *Bacillus* sp. Oa_4, тормозящий рост побегов яблони, способствует сильной

активации PLAT1, HSC70-1 и некоторых других белков, участвующих в белковом метаболизме и развитии клеток. Данные результаты подтверждают, что разные клеточные сигналы на ранней стадии взаимодействия «растение – эндوفит» могут быть важны для штамм-зависимой регуляции клеточного окислительно-восстановительного баланса и развития фенотипа побегов растения-хозяина [4].

Таким образом, эндофитные микроорганизмы, находящиеся в симбиотическом взаимоотношении с растением-хозяином, рассмотренном на примере яблони, могут стимулировать ряд его биохимических и физиологических процессов с помощью различных продуктов своего метаболизма.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания МСХ РФ «Селекция зимостойких слаборослых клоновых подвоев с использованием методов биотехнологии» на 2021 г. (№ госрегистрации АААА-А21-121011190007-9).

Список литературы:

1. Микробиологическая обсемененность столовых сортов винограда / Д.В. Акишин, М.В. Маслова, Е.В. Грошева, И.В. Поленин // Наука и Образование. - 2020. - Т. 3. - № 4. - С. 237.
2. Assessment of fire blight resistance in apple clonal rootstocks using molecular markers / I.N. Shamshin, M.V. Maslova, N.V. Drenova [et al.] // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. - 2020. - Т. 181. - № 4. - С. 185-191.
3. Endophytes Increased Fruit Quality with Higher Soluble Sugar Production in Honeycrisp Apple (*Malus pumila*) / H. Rho, V. Van Epps, S.-H. Kim et al. // Microorganisms. – 2020. – V. 8, Is. 699. – P. 1-17. – DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050699>.
4. Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. Modulate Apple Shoot Growth, Cellular Redox Balance, and Protein Expression Under in Vitro Conditions / I. Tamošiūnė, G. Stanienė, P. Haimi et al. // Front. Plant Sci. – 2018. – Vol. 9, Art. 889.

– P. 1-14. – DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00889>.

5. Inside the Plants: Endophytic Bacteria and their Functional Attributes for Plant Growth Promotion / P.K. Pandey, M.C. Singh, S. Singh [et al.] // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2017. – V. 6. – N 2. – P. 11-21. – DOI: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.002>.

6. Isolation and Identification of Potassium-Solubilizing Bacteria from Rhizosphere Soil of Apple Tree / J. Jiang, X. Peng, Z. Yan et al. // Chinese Journal of Agrometeorology. – 2017. – P. 738-748. – DOI: <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1000-6362.2017.11.006>.

7. Lacava P.T., Azevedo J.L. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System // Maheshwari D., Saraf M., Aeron A. (eds) Bacteria in Agrobiological: Crop Productivity. – Springer, Berlin, Heidelberg. – 2013. – DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_1.

8. Microbial antagonism of putative bacterial endophytes from apple (*Malus × domestica* Borkh) / O. Buzaitė, I. Miliūtė, D. Gelvonauskienė et al. // Molecular plant-microbe interactions (IS MPMI, 2014) [electronic resource]: 16th international congress, 6-10 July, 2014, Rhodes, Greece. – Athens: Agricultural University of Athens, 2014. – P. 127.

9. Miliūtė I., Buzaitė O. IAA production and other plant growth promoting traits of endophytic bacteria from apple tree // Biologija. – 2011. – V. 57. – Is. 2. – P. 98-102.

10. Plant growth promoting and antagonistic properties of endophytic bacteria isolated from domestic apple / I. Miliute, O. Buzaitė, D. Gelvonauskiene [et al.] // Zemdirbyste-Agriculture. – 2016. – Vol. 103, No. 1. – P. 77-82. – DOI: <http://dx.doi.org/10.13080/z-a.2016.103.010>.

11. Shamshin, I.N. The use of molecular markers in searching for tomato fusarium blight resistance genes / I.N. Shamshin, Y.V. Gryazneva, M.V. Maslova // International Journal of Recent Technology and Engineering. - 2019. - T. 7. - № 6. - C. 1800-1803.

12. The effect of laser irradiation on the activity of the bacteria bacillus

subtilis and pseudomonas fluorescens / M.V. Maslova, E.V. Grosheva, A.V. Budagovsky, O.N. Budagovskaya // Amazonia Investiga. - 2019. - T. 8. - № 21. - C. 610-616.

13. The impact of pseudomonas syringae bacteria on the plant pathogenic fungi and cherry plants / M. Maslova, E. Grosheva, I. Shamshin [et al.] / Сб.: Bio Web of Conferences, 2020. - C. 00019.

UDC 634.11: 58.071

**MODERN ACHIEVEMENTS IN RESEARCH OF
ENDOPHYTIC MICROBIOTA IN APPLE TREE**

Dubrovsky Maxim Leonidovich

Candidate of Agricultural Sciences, Head of Laboratory
element68@mail.ru

Maslova Marina Vitalievna

Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher
Marinamaslova@mail.ru

Sysoev Artem Mikhailovich

graduate student

Ilyichev Alexey Sergeevich

graduate student

Yulia Khoroshkova

graduate student

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. The results of several foreign research of the endophytic microbiota in apple tree are considered. It is noted that many endophytic bacteria have a stimulating effect on the growth and development of apple tree as a host plant due to

the synthesis of various compounds.

Key words: apple tree, endophytic microbiota, bacteria, fungi, symbionts, phytopathogenic microorganisms.