

Колонизация ризобактериями корней сахарной свёклы

О.А. ФЁДОРОВА, канд. биол. наук (e-mail: fed-olga78@mail.ru)

Н.В. БЕЗЛЕР, д-р с/х наук (e-mail: bezler@list.ru)

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

Введение

В последние годы существенно выросло количество исследований, посвящённых ризобактериям, являющимся неисчерпаемым источником новых биологически активных веществ, которые могут быть использованы в производстве средств защиты растений и продуктов сельского хозяйства, лекарственных препаратов для животных и человека [1]. В развивающемся устойчивом земледелии применение ризобактерий для улучшения роста и питания сельскохозяйственных культур служит одним из перспективных подходов [2–5]. Однако пути взаимодействия компонентов растительно-микробных систем, условия реализации ростстимулирующего потенциала ризобактерий и критерии отбора наиболее эффективных ассоциативных штаммов во многом ещё требуют фундаментального изучения. Механизмы положительного влияния ризобактерий на растения различны. Хорошо изучены взаимодействия растений с фиксирующими азот ризобактериями (дiazотрофами). Показано, что ассоциативная фиксация азота вносит существенный вклад в обеспечение растений этим элементом [6]. Одними из перспективных микроорганизмов — антагонистов основных болезней растений являются актиномицеты, в основе антагонистической

активности которых к фитопатогенным микроорганизмам лежит генетически закреплённая способность продуцировать широкий спектр антибиотически активных веществ [7]. Защита растений от болезней и вредителей актуальна и в свекловодстве, где повсеместно наблюдаются негативные явления эпифитотий листовых болезней, развитие гнилей корнеплодов во время вегетации и хранения, в результате чего ежегодное снижение урожая составляет до 16 % [8].

В числе основных условий стимуляции роста и биоконтроля болезней растений, помимо наличия высокой антагонистической активности, присутствует способность микроорганизмов колонизировать ризосферу растений [9]. В связи с этим весьма актуальным направлением исследований представляется углублённое изучение процесса колонизации бактериями прикорневой зоны растений [10, 11]. Этот процесс зависит от многих факторов: 1) способности бактерий утилизировать основные компоненты корневых выделений; 2) адгезии бактерий поверхностью корней; 3) скорости размножения бактерий; 4) выживаемости в ризосфере, для которой могут быть необходимы устойчивость к токсичным соединениям растений, осмо- и холодоустойчивость; 5) взаимодействия с аборигенной микрофлорой, как благоприятные

для интродукта, так и негативные. Разработаны эффективные приёмы селекции активных колонизаторов ризосферы, учитывающие реальные условия с комплексом биотических и абиотических факторов среды [12]. Установлено, что интродукция ризобактерий примерно в ту экологическую нишу, из которой её первоначально изолировали, повышает вероятность образования эффективной растительно-бактериальной ассоциации [13].

Целью настоящего исследования является анализ способности ризобактерий колонизировать корневую систему растений сахарной свёклы.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили культуры ризобактерий *Agrobacterium tumefaciens* 184, выделенная из ризопланы ячменя, и *Streptomyces* sp. 3 — из ризосферы сахарной свёклы. Штаммы хранятся в лаборатории Агроэкологических исследований свекловичных агроценозов ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова на твёрдой среде Эшби и Чапека методом периодических пересевов. Определение филогенетического положения штаммов на основании секвенирования гена 16S рРНК показало, что штамм 184 принадлежит к семейству *Rhizobiaceae* филогенети-

ческой группы *Alphaproteobacteria* и наиболее близок к типовому штамму рода *Agrobacterium* — *A. tumefaciens*. Штамм 3 отнесён к семейству *Streptomycetaceae*, роду *Streptomyces sp.*

Способность бактерий колонизировать поверхность корней исследовали на растениях диплоидного гибрида сахарной свёклы РМС 127 по методике, описанной В.С. Ржевской и др. [14]. Используемые семена стерилизовали смесью (перекись водорода : спирт 70 % 1:1). Затем семена асептически помещали в биологические пробирки, заполненные 7–10 мл 0,6%-ного голодного агара, в которые предварительно вносили суспензии исследуемых микроорганизмов (с титром инокулята 10^8 КОЕ *Agrobacterium tumefaciens* 184 и 10^5 КОЕ *Streptomyces sp.*). Контроль — пробирки с голодным агаром и высаженными в них семенами сахарной свёклы. Штамм *Agrobacterium tumefaciens* 184 выращивали на термостатирующем шейкере (180 об/мин) при 28 °С на жидкой среде Эшби в течение 5–7 суток. Стрептомицеты выращивали при тех же условиях на среде Чапека. Пробирки с проростками размещали на свету при температуре +25 °С и освещении 1000 люкс. Способность бактерий колонизировать прикорневую зону растений оценивали по образованию микроколоний бактерий у поверхности корня на 3–14-е сутки выращивания проростков. На 15-е сутки у сеянцев отделяли корневую систему и исследовали наличие на ней бактерий в раздавленных микропрепаратах, окрашенных основным фуксином Циля.

Результаты и их обсуждение

Использование метода выращивания проростков растений в полужидком агаре, инокулированном микроорганизмами, позволяет за относительно короткий

период оценить способность исследуемых бактерий колонизировать поверхность корня и размножаться в ризосфере. Выделенные нами штаммы *Agrobacterium tumefaciens* 184 и *Streptomyces sp.* 3 оказывают стимулирующее действие на рост проростков сахарной свёклы, а также проявляют высокую антагонистическую активность в отношении широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов — возбудителей болезней сахарной свёклы [7].

В процессе роста и развития растения выделяют корневые экссудаты, которые обуславливают интенсивное развитие микроорганизмов в почве, непосредственно примыкающей к поверхности корня — ризосфере [14]. Поэтому интродукция в агроэкосистему микробных препаратов в значительной степени будет определяться способностью микроорганизмов колонизировать ризосферу и ризоплану растений [15].

Результаты исследований по выращиванию сахарной свёклы в полужидком агаре, инокулированном *Agrobacterium tumefaciens* 184 и *Streptomyces sp.* 3, позволили дать первичную оценку их колонизирующей способности и показать, что исследуемые культу-

ры способны приживаться в зоне корней растения. В контрольном варианте (семена, высаженные в голодный агар без внесения микроорганизмов) в агаре, окружающем корни, рост колоний не наблюдался, все зоны корня просматривались отчётливо (рис. 1). В опытном варианте на вторые сутки внесения в питательную среду штамма 184 и на пятые сутки внесения штамма 3 вокруг корней растений образовывалось видимое облако колоний.

С увеличением времени культивирования до 14 суток интенсивность колонизации прикорневой зоны микроорганизмами возрастала, колонии становились крупнее. При этом в различных зонах корней интенсивность их колонизации неодинакова: наибольшая скорость образования колоний отмечена на верхушке корня, наименьшая — в зоне роста. Вероятно, это связано с тем, что рост клеток микроорганизмов происходит по градиенту кислорода — в толще агара из-за недостатка кислорода рост микроорганизмов, являющихся типичными аэробами, замедляется. Из-за высокой плотности облака колоний микроорганизмов вокруг корней опытных растений корне-

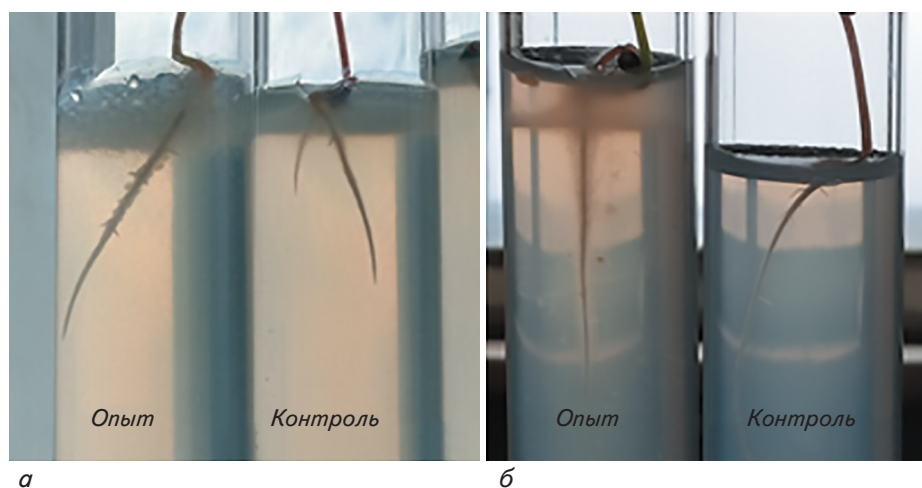


Рис. 1. Колонизация штаммами ризобактерий *Agrobacterium tumefaciens* 184 (а) и *Streptomyces sp.* 3 (б) поверхности корней сахарной свёклы на третьи сутки

вые волоски не просматривались (рис. 2).

После извлечения корня из системы выращивания его помещали в чашки Петри на агаризованные среды Эшби и Чапека. Дальнейшее культивирование проводили в термостате при $t = 28^\circ$ (рис. 3). Через пять суток наблюдались выросшие характерные колонии микроорганизмов.

Однородные колонии были расположены равномерно по всей длине корешков сахарной свёклы. Последующее микроскопирование раздавленных корней (рис. 4.) при помощи фиксированных окрашенных препаратов подтвердило, что по всей длине корней были обнаружены исходные клетки *Agrobacterium tumefaciens* 184 (а) и *Streptomyces* sp. 3 (б).

Таким образом, можно говорить о том, что клетки ризобактерий *Agrobacterium tumefaciens* 184 и *Streptomyces* sp. 3, внесённые в среду при прорастании семян, развиваются вместе с корневой системой, по всей видимости, покрывая её. Поскольку среда для культивирования не содержит никаких источников углерода и энергии, это может происходить только за счёт выделений, образующихся при прорастании семян. Согласно литературным данным экссудаты корней растений состоят из сложной смеси органических веществ: анионов кислот, сахаров, аминокислот, витаминов, пуринов, нуклеозидов, неорганических ионов, газообразных соединений, ферментов, фенольных соединений. Именно они и будут в значительной степени определять интеграцию микроорганизмов с растением и дальнейшее совместное их функционирование [13].

Заключение

Рост и развитие микробного сообщества в ризосфере растений обеспечивают корневые ризодепозиты, которые согласно ли-

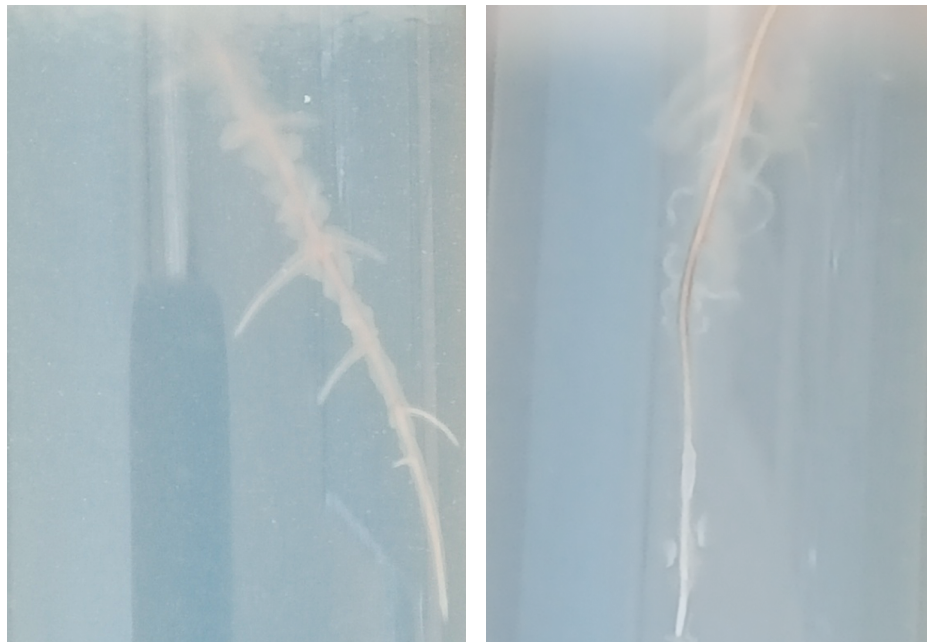


Рис. 2. Колонизация корневой системы сахарной свёклы *Agrobacterium tumefaciens* 184 (а) и *Streptomyces* sp. 3 (б) через 14 суток культивирования

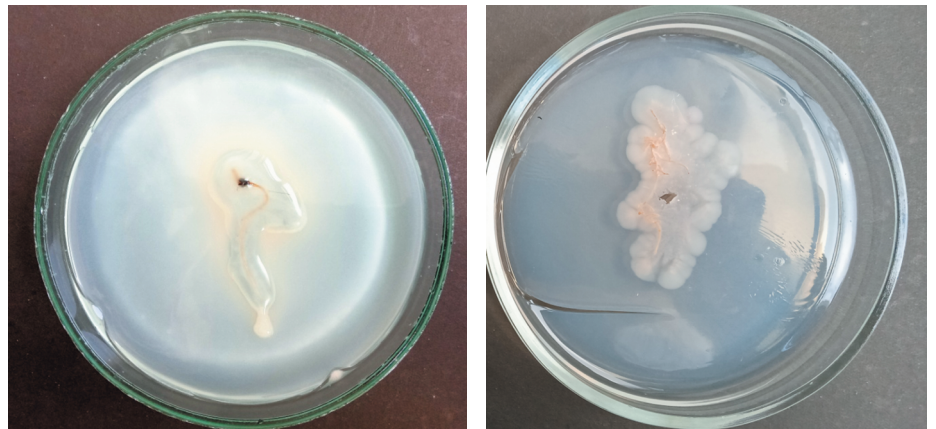


Рис. 3. Развитие *Agrobacterium tumefaciens* 184 (а) и *Streptomyces* sp. 3 (б) на корневой системе сахарной свёклы

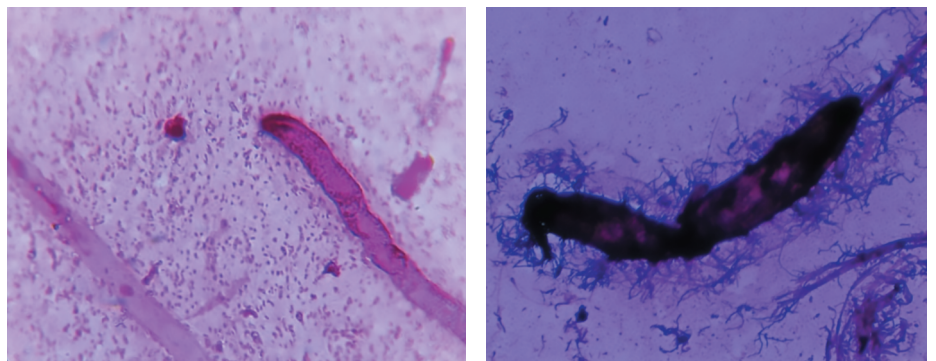


Рис. 4. Давленный препарат на 14-е сутки культивирования (увеличение 1000). *Agrobacterium tumefaciens* 184 (а) и *Streptomyces* sp. 3 (б)

тературным данным включают, помимо корневых экссудатов, высокополимерные слизи полисахаридной и белковой природы, утраченные части растения (корневой чехлик, корневые волоски, отмершие участки корня) [4, 11]. Использование метода выращивания растений сахарной свёклы в 0,7%-ном полужидком голодном агаре, инокулированном ризобактериями *Agrobacterium tumefaciens* 184 и *Streptomyces sp.* 3, позволило дать первичную оценку колонизирующей способности культур, а также показать перспективность их использования в посевах сахарной свёклы.

Список литературы

1. Ризосферные бактерии / А.М. Феоктистова, Г.Ф. Марданова, М.Р. Хадиева, Н.В. Шарипова // Учёные записки Казанского университета. Серия : естественные науки. — 2016. — Т. 158. — С. 207–224.
2. Беззубенкова, О.Е. Микрофлора ризосферы и ризопланы и её влияние на растительный организм / О.Е. Беззубенкова, М.Н. Юхлимова, Н.И. Нестерова // Естественные и технические науки. — 2012. — Т. 4. — С. 99–102.
3. Фатина, П.Н. Применение микробиологических препаратов в сельском хозяйстве / П.Н. Фатина // Вестник АГТУ. — 2007. — № 4 (39).
4. Муродова, С.С. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике / С.С. Муродова, К.Д. Давранов // Biotechnologia acta. — 2014. — V. 7. — № (6). — С. 92–101.
5. Петров, В.Б. Микробиологические препараты — базовый элемент современных интенсивных агротехнологий растениеводства / В.Б. Петров, В.К. Чеботарь // Достижения науки и техники АПК. — 2011. — № 8. URL: [https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskie-preparaty-](https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskie-preparaty-bazovyy-element-sovremennykh-intensivnykh-agrotekhnologiy-rastenievodstva)

[bazovyy-element-sovremennykh-intensivnykh-agrotekhnologiy-rastenievodstva](https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskie-preparaty-bazovyy-element-sovremennykh-intensivnykh-agrotekhnologiy-rastenievodstva)

6. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) / А.И. Шапошников, А.А. Белимов, Л.В. Кравченко, Д.М. Виванко // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — № 3. — С. 16–22.

7. Фёдорова, О.А. Антифунгальный потенциал актиномицетов из ризосферы сахарной свёклы / О.А. Фёдорова, Н.В. Безлер // Сахарная свёкла. — 2021. — № 4. — С. 29–32.

8. Стогниенко, О.И. Патокомплексы микобиоты сахарной свёклы и методы снижения их вредности в ЦЧР России : специальность 06.01.07 «Защита растений» : дисс. ... д-ра биол. наук / Стогниенко Ольга Ивановна; Рос. гос. аграрн. ун-т. — М., 2018. — 474 с.

9. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. Пер. с венг. И.Ф. Куренного ; под ред. и с предисл. Г.С. Муромцева. — М. : Колос, 1983. — 296 с.

10. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bio-inoculants / L. Wu, H.-J. Wu, J. Qiao [et al.] // Front. Microbiol. — 2015. — V. 6. — P. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2015.01395.

11. Dietel, K. Bacterial traits involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amylolique-*

faciens FZB42 / K. Dietel, B. Beator, A. Budiharjo [et al.] // Plant Pathol. J. — 2013. — V. 29. — No 1. — P. 59–66. doi:10.5423/PPJ.OA.10.2012.0155.

12. Иванов, В.П. Корневые выделения и их значение в жизни фитоценозов / В.П. Иванов. — М. : Наука, 1973. — 193 с.

13. Тычинская, И.Л. Повышение эффективности возделывания сортов сои при формировании ассоциаций с АЦК-утилизирующими ризобактериями : специальность 06.01.01 «Общее земледелие, растениеводство» : дис. ... канд. с/х наук / Тычинская Ирина Леонидовна ; Орлов. гос. аграр. ун-т. — Орёл, 2016. — 128 с.

14. Ржевская, В.С. Колонизация ризопланы корней огурцов микроорганизмами, входящими в состав микробного препарата «Эмбико» / В.С. Ржевская, Л.М. Теплицкая, И.П. Отурина // Regulatory Mechanisms in Biosystems. — 2013. — № 4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kolonizatsiya-rizoplany-korney-ogurtsov-mikroorganizmami-vhodyashimi-v-sostav-mikrobnogo-preparata-embiko>

15. Ассоциативное взаимодействие почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* с высшими растениями / Т.М. Фунг, Н.А. Манучарова, А.Л. Степанов [и др.] // Вестник Московского университета. Почвоведение. — 2015. — № 3. — С. 46–52.

Аннотация. Методом выращивания сахарной свёклы в полужидком (0,7%-ном) голодном агаре, инокулированном *Agrobacterium tumefaciens* 184 и *Streptomyces sp.* 3, была дана первичная оценка их колонизирующей способности. Показано, что за счёт корневых экссудатов сахарной свёклы исследуемые культуры способны приживаться и функционировать в зоне корней растения, что важно для осуществления их фитопротекторной и ростстимулирующей функций.

Ключевые слова. Ризобактерии, сахарная свёкла, колонизирующая способность, *Agrobacterium tumefaciens* 184 и *Streptomyces sp.* 3.

Summary. The method of growing sugar beets in semi-liquid (0.7%) empty agar inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* 184 and *Streptomyces sp.* 3 gave an initial assessment of their colonizing ability. It has been shown that, due to sugar beet root exudates, the studied crops are able to take root and function in the root zone of the plant, which is important for their phytoprotective and growth-stimulating functions.

Keywords. Rhizobacteria, sugar beet, colonizing ability, *Agrobacterium tumefaciens* 184 and *Streptomyces sp.* 3.