

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТ 1-АМИНОЦИКЛОПРОПАН-1-КАРБОКСИЛАТ ДЕАМИНАЗУ, ИЗ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ СОРТОВ СЕЛЕКЦИИ ТАТАРСКОГО НИИСХ

А.А. Абрамова, Г.Х. Шаймуллина

ФГБОУ ВО «Казанский ГАУ», г. Казань, РФ, e-mail: abramova92a@yandex.ru

***Аннотация.** Были проведены исследования по выделению эндофитных микроорганизмов из семян пшеницы и ячменя селекции Татарского НИИСХ с последующим изучением их способности к продуцированию 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат деаминазы (АЦК-деаминазы). В ходе проведенных исследований было выделено 7 штаммов бактерий, способных расти на средах, содержащих АЦК в качестве единственного источника азота и углерода.*

***Ключевые слова:** эндофиты пшеницы, эндофиты ячменя, продуценты АЦК-деаминазы, сельскохозяйственные культуры, защита от стрессов.*

Введение. В ходе своей эволюции растения образовали тесные связи с симбиотическими микроорганизмами. Микроорганизмы заселили как внутреннюю среду организма растений, так и их поверхность. Благодаря тесной связи, возникающей между растениями и микроорганизмами, последние играют важную роль в процессах роста и питания растений, а также, повышают их устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды [1]. Такая взаимосвязь растений и микроорганизмов находит все большее применение в области сельского хозяйства [2].

Среди микроорганизмов-симбионтов растений наиболее изученными являются ризосферные микроорганизмы. Достаточно давно стала известна их способность фиксировать атмосферный азот, обеспечивая растения большим количеством более доступного азота, и таким образом, стимулируя рост растений. Гораздо менее изученной группой являются эндофитные микроорганизмы. Эти микроорганизмы, обитая внутри организма растений, образуют с ними наиболее тесную взаимосвязь. Существовая внутри организма растений, эндофитные микроорганизмы улучшают снабжение растений питательными веществами, регулируют уровень гормонов, продуцируют витамины и оказывают непосредственное влияние на рост растения, его развитие и устойчивость к стрессам [2].

Эндофитные микроорганизмы, продуцирующие 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат деаминазу, способны защищать растения от воздействия стрессов различной природы. Данный эффект от жизнедеятельности микроорганизмов изучен при воздействии таких стрессов как засуха, засоленность почвы, затопление, загрязнение тяжелыми металлами и воздействие фитопатогенов. Благодаря ферменту АЦК-деаминазе бактерий в растениях снижается уровень 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК), предшественника этилена, накопление которого запускает стрессовые реакции растений, влекущие за собой негативные последствия, в результате которых нарушается здоровье растения и замедляется его рост. Под воздействием стрессов такие бактерии способны поддерживать рост растений на том уровне, на котором он происходит при благоприятных условиях. Таким образом, симбионтные бактерии, продуцирующие АЦК-деаминазу способны стимулировать рост растений [1].

До сих пор известно немного штаммов эндофитов, способных продуцировать АЦК-деаминазу. Большинство известных штаммов-продуцентов АЦК-деаминазы относятся к ризосферным микроорганизмам, влияющим на физиологические процессы в корнях растений, но не в целом растительном организме. Поэтому поиск полезных эндофитных

микроорганизмов из семян и создание биопрепаратов на их основе является актуальной на данный момент задачей.

Материалы и методы. Для выделения эндофитных микроорганизмов отбирали семена ячменя и пшеницы селекции Татарского НИИСХ (ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН): 4 сорта ярового ячменя (двурядные Раушан, Эндан, Камашевский и многорядный Тевкеч) и 5 сортов мягкой пшеницы (яровые Хазинэ, Ситара, Йолдыз и озимые Сабан, Дарина). Из проб каждого сорта брали по 1 г здоровых семян, среднего размера, которые помещали в колбу и стерилизовали поверхностно: 70% раствором этанола, в течение 5 минут, затем 4% раствором гипохлорита натрия с добавлением додецилсульфата натрия в течение 15 минут [3]. После стерилизации семена тщательно промывали дистиллированной водой, а затем семена размалывали в стерильных условиях при помощи ступки и пестика до образования однородной кашицы. Из полученной кашицы производили серию последовательных разведений в фосфатном буфере (PBS). 5-е и 6-е разведения высаживали на чашки Петри с агаризованной средой LB (Luria-Bertani broth) и инкубировали при температуре 28 °С в течение 2 суток. После инкубации определяли количество колоний, полученных на чашках, а также их морфологическое разнообразие. Количество полученных колоний выражали в КОЕ (количество колониеобразующих единиц) на 1 г семян.

Помимо описания морфологического разнообразия колоний проверяли их различия на генетическом уровне для того, чтобы исключить повторяющиеся штаммы микроорганизмов. Генетическое разнообразие полученных микроорганизмов определяли методом ВОХ-ПЦР.

Для обнаружения у выделенных штаммов способности к продуцированию АЦК-деаминазы были подобраны среды, в которых можно было заменить источники азота и углерода на 1-аминоциклопропанкарбоновую кислоту (АЦК): среда Дворкина-Фостера (DF) [4] и минимально-солевой агар [5]. Бактерии, обладающие ферментом АЦК-деаминазой, деградируют АЦК до неактивных α -кетобутирата и ионов аммония, который затем используется некоторыми рост-стимулирующими бактериями в качестве источника азота. Все выделенные штаммы высевали как на полноценные среды, так и на среды с добавлением АЦК вместо источников азота и углерода. Посевы инкубировали в течение 3 суток при температуре 28 °С. После инкубации проверяли способность штаммов расти на средах с АЦК в качестве единственного источника азота и углерода.

После выявления бактерий, способных расти на средах с АЦК, проводили определение их видовой принадлежности посредством секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и их обсуждение. Из 9 рассматриваемых сортов ячменя и пшеницы всего было выделено 52 вида колоний, различных по морфологическим признакам. После этого каждому морфотипу было присвоено свое наименование, а по каждому сорту подсчитано количество выделенных морфотипов эндофитных бактерий и КОЕ на г семян (таблица 1). Таким образом, из сорта ячменя Камашевский было выделено 8 морфотипов (K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8); из сорта Тевкеч – 7 морфотипов (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7); из сорта Раушан – 5 (R1, R2, R3, R4, R5); из сорта Эндан – 7 (An1, An2, An3, An4, An5, An6, An7); из сорта пшеницы Дарина было выделено 4 морфотипа колоний (D1, D2, D3, D4); из сорта Йолдыз – 4 морфотипа (Y1, Y2, Y3, Y4); из сорта Сабан – 6 (Sub1, Sub2, Sub3, Sub4, Sub5, Sub6); из сорта Ситара – 4 (Sit1, Sit2, Sit3, Sit4); из сорта Хазинэ – 7 (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7). При этом самое большое количество микроорганизмов было выделено из сортов пшеницы Дарина и Сабан ($3 \cdot 10^5$ КОЕ/г), а самое меньшее – из сорта пшеницы Йолдыз ($0,011 \cdot 10^5$ КОЕ/г). Количество микроорганизмов, выделенное из разных сортов ячменя, было в целом достаточно небольшим (таблица 1).

Таблица 1. Количество морфотипов бактерий, наименование полученных из семян каждого сорта эндофитных бактерий и КОЕ/г семян

Сорт	Количество морфотипов бактерий	Наименования выделенных морфотипов	КОЕ/г семян ($\times 10^5$)
Камашевский	8	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8	1
Тевкеч	7	T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7	0,058
Раушан	5	R1, R2, R3, R4, R5	0,12

Эндан	7	An1, An2, An3, An4, An5, An6, An7	0,035
Дарина	4	D1, D2, D3, D4	3
Йолдыз	4	Y1, Y2, Y3, Y4	0,011
Сабан	6	Sub1, Sub2, Sub3, Sub4, Sub5, Sub6	3
Ситара	4	Sit1, Sit2, Sit3, Sit4	2
Хазинэ	7	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7	0,64

По результатам ВОХ-ПЦР были выявлены и исключены 12 повторяющихся штаммов микроорганизмов. Для оставшихся 40 штаммов микроорганизмов проводили эксперимент по выявлению АЦК-деаминазной активности. Итоги данного эксперимента показали практически одинаковые результаты для обеих используемых сред. В ходе данного эксперимента выяснилось, что из всех выделенных штаммов только 7 способно расти на средах с АЦК. Это штаммы, обозначенные как An3, K5, K6, T2, T4, H2, H3. Для данных штаммов отмечен рост на средах с АЦК в качестве единственного источника азота и углерода (рисунок 1.1-1.7).

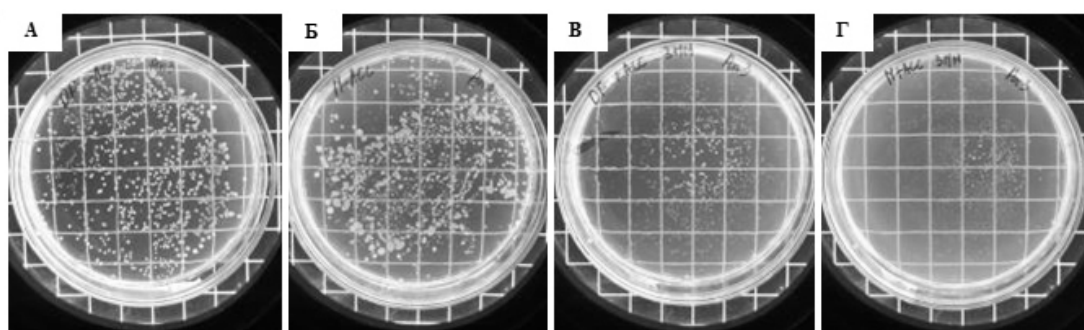


Рисунок 1.1. Культура штамма An3 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

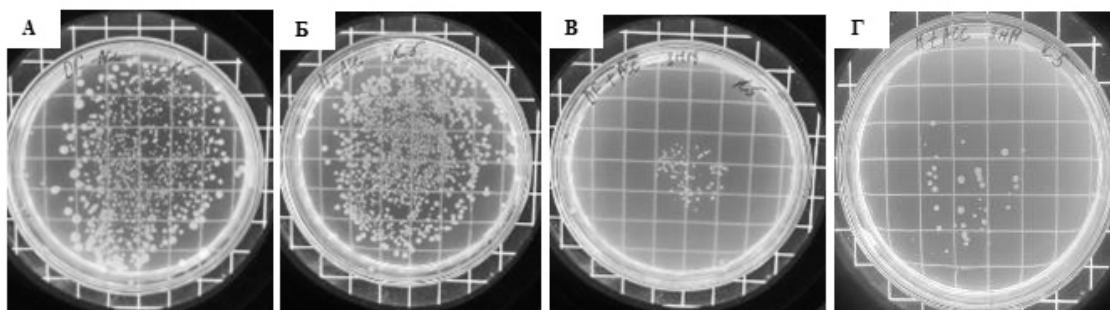


Рисунок 1.2. Культура штамма K5 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

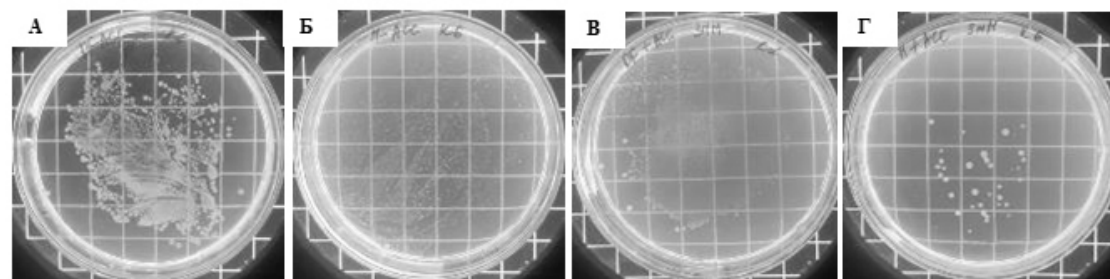


Рисунок 1.3. Культура штамма K6 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

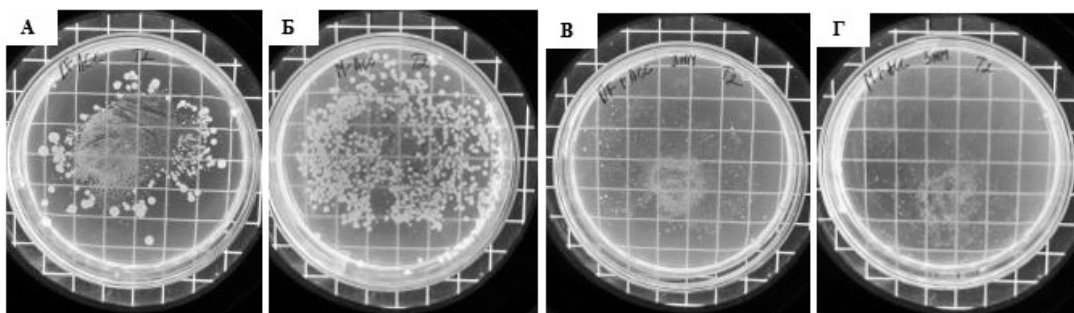


Рисунок 1.4. Культура штамма Т2 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

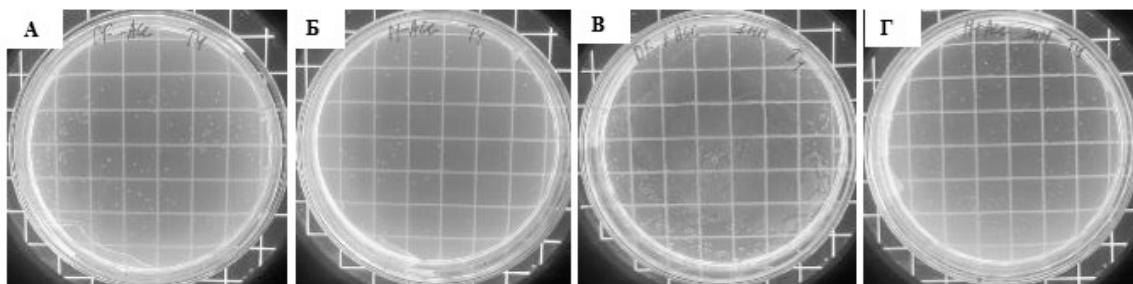


Рисунок 1.5. Культура штамма Т4 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

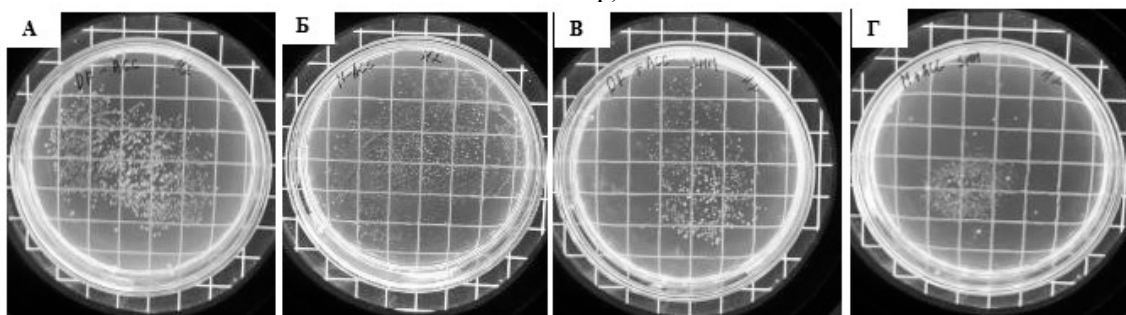


Рисунок 1.6. Культура штамма Н2 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

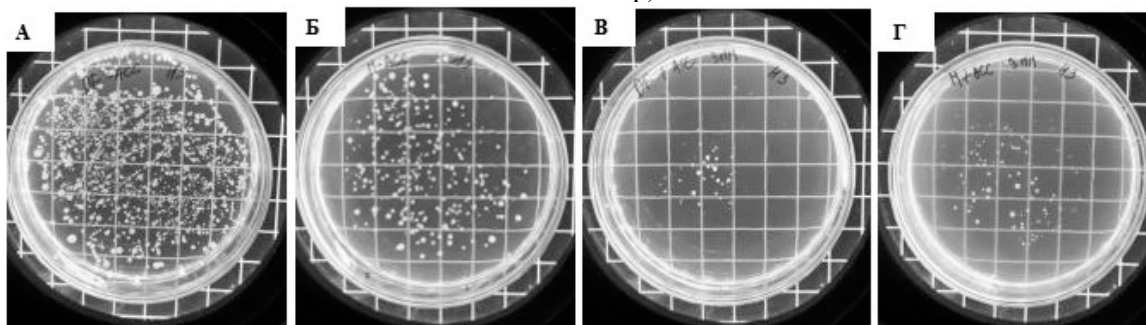


Рисунок 1.7. Культура штамма Н3 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

В отличие от 7-ми перечисленных, все остальные штаммы не проявили рост на используемых средах (рисунок 2.1-2.2).

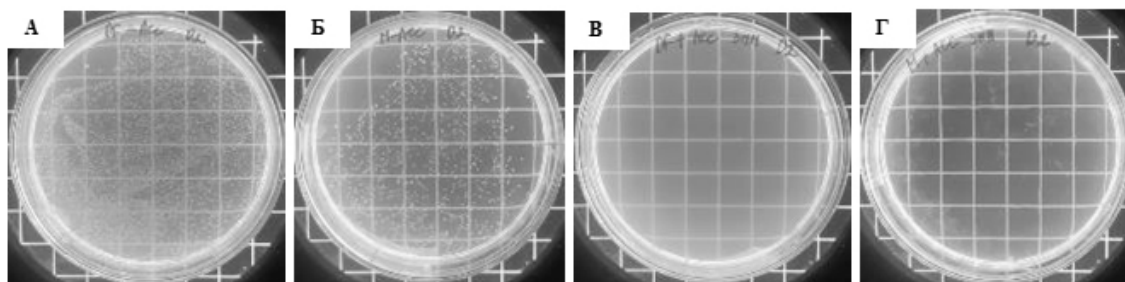


Рисунок 2.1. Культура штамма D2 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

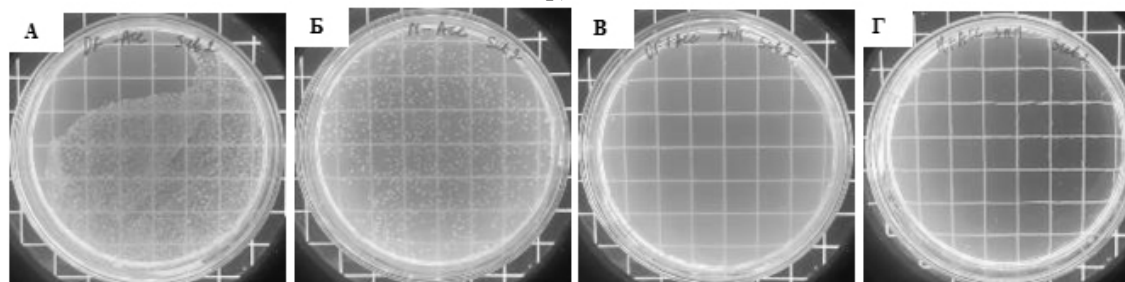


Рисунок 2.2. Культура штамма Sub2 на средах с нормальными источниками азота и углерода (А – среда DF, Б – минимальный солевой агар) и с заменой их на АЦК (В – среда DF, Г – минимальный солевой агар).

По результатам секвенирования был установлен видовой состав штаммов, способных расти на средах с АЦК (таблица 2).

Таблица 2. Видовой состав штаммов, способных расти на средах с АЦК

Обозначение штамма	Организм
An3	<i>Bacillus pumilus</i>
K5	<i>Bacillus cereus</i>
K6	<i>Bacillus megaterium</i>
T2	<i>Bacillus megaterium</i>
T4	<i>Bacillus pumilus</i>
H2	<i>Bacillus subtilis</i>
H3	<i>Bacillus cereus</i>

Закключение. Таким образом, в ходе исследований было выделено 7 штаммов бактерий, способных продуцировать АЦК-деаминазу. Все исследуемые штаммы принадлежали к роду *Bacillus* и являлись эндофитами семян. Предполагается, что данные штаммы, обладая способностью продуцировать АЦК-деаминазу, смогут способствовать защите растений от воздействия стрессов. Авторами работы предлагается дальнейшее изучение влияния данных штаммов на рост и развитие растений при воздействии стрессовых факторов. При получении положительных результатов в таких испытаниях, данные штаммы смогут стать основой для производства биологических препаратов защиты растений от стрессов.

Работа выполнена за счет средств молодежного гранта Академии наук РТ (договор № 11-21-юГ).

Библиографический список

1. Малков Н.В., Зиновкина Н.Ю., Сафронова В.И., Белимов А.А. Повышение устойчивости бобово-ризобиального симбиоза к кадмию с помощью ризосферных бактерий, содержащих АЦК-деаминазу // Достижения науки и техники АПК. 2012. №9. С. 53-57.

2. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндوفитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. 2019. Т17. №1. С. 19-32.
3. Афанасьева Д.С., Абрамова А.А., Дмитриева П.А., Сафина Д.Р., Чупина Е.Н., Ярмиева А.И., Сафин Р.И. Оценка различных сортов ячменя по эндوفитной микрофлоре семян // Агробиотехнологии и цифровое земледелие. 2022. №1. С. 12-17.
4. Gupta S., Pandey S. ACC Deaminase Producing Bacteria With Multifarious Plant Growing Promoting Traits Alleviates Salinity Stress in French Bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants // Frontiers in Microbiology. 2019. 10: 1506.
5. Сиволодский Е.П., Фрейхлихман О.А. Генетическая и фенотипическая характеристика изолятов *Klebsiella michiganensis* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9. №5-6. С. 648-654.