

Выделение и оценка биорегуляторных свойств эндофитных бактерий

А.А.Широких¹, И.Г. Широких¹, С.Ю.Огородникова², О.В. Мерзаева¹

¹Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого РАСХН,

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

Из поверхностно стерилизованных листьев, почек и корней различных видов растений было изолировано 98 культур эндофитных бактерий. Охарактеризованы фенотипические свойства природных изолятов. Отмечен слабый рост эндофитных культур на лабораторных средах. Изучено влияние обработки семян пшеницы жидкими культурами эндофитов на накопление проростками сухой массы, содержание фотосинтетических пигментов и интенсивность перекисного окисления липидов в листьях проростков в водно-бумажной культуре.

Endophytic bacterias were isolated from surface sterilized leaves, leaf-bud and roots of diverse plant species. Several phenotypic properties of 98 endophytic strains have determined. Weak growth primary isolates on laboratory mediums is noted. The effect of treatment of seeds spring wheat (*Triticum aestivum* L.) with the culture liquid of endophytic strains on the accumulation of dry biomass, the content of photosynthetic pigments and intensity peroxidative oxidation lipides in leaf was studied in water-paper culture.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, метилотрофы, актинобактерии, ростстимуляция, антагонизм

Известно, что ткани здорового растения заселены внутри популяциями эндофитных бактерий из корневой зоны почвы [1]. Эндофитные бактерии обитают в межклеточном пространстве, клетках кортекса корней, сосудистой системе, однако, в отличие от фитопатогенных видов, имеют с растением мутуалистические взаимоотношения. Они могут выделять физиологически активные вещества, снабжать растения фиксированным азотом, оказывать губительное действие на фитопатогены [4, 2].

Практический интерес к эндофитным бактериям связан, в первую очередь, с оценкой возможности их использования в производстве биопрепаратов для повышения продуктивности культурных растений, защиты их от фитопатогенной микрофлоры, повышения качества урожая. Несмотря на широкий ассортимент микробных препаратов, сегодня среди них достаточно редко встречаются препараты, созданные на основе эндофитов. К ним относят фитоспорин и интеграл [3, 4], в основу производства которых положены различные штаммы *Bacillus subtilis* – бактерий, широко распространённых в почвах. Типичным почвенным азотфиксатором является и *Klebsiella terrigena* Е6, рассматриваемая как перспективная в плане повышения урожайности сельскохозяйственных культур [5].

Менее изучены и практически не используются для производства биопрепаратов

штаммы, изолированные непосредственно из растительных тканей. Авторы отмечают [1 – 6], что между комплексами эндофитных бактерий, выделяемых из разных видов растений, существуют значительные различия, которые связаны с такими факторами, как специфика растения-хозяина, географическое местоположение, возраст растения и тип ткани. Существенную роль играет также состав среды выделения, в зависимости от которого получают преимущество в росте те или иные бактерии.

Целью настоящей работы являлось выделение и изучение свойств природных изолятов эндофитных бактерий, ассоциированных с культурами зерновых злаков (яровой ячмень, озимая рожь, тритикале) и некоторыми видами диких древесных и кустарниковых растений (берёза, клён, сирень, шиповник) для оценки их биорегуляторного действия.

Объекты и методы

Объектом исследования служили комплексы бактерий, выделенные из различных органов и тканей растений после поверхностной стерилизации растительных сегментов (8 – 10 мм) в течение 15 мин. смесью 3%-ной перекиси водорода и 96%-ного этилового спирта (1:1). Простерилизованный растительный материал многократно отмывали в стерильной дистиллированной воде, затем

гомогенизировали в ступке и из разведений производили посев на агаризованные среды RHM [7] и с пропионатом натрия [8].

Контроль стерильности проводили высе-вом смывов с поверхности растительных сег-ментов на среды того же состава.

Для получения метилотрофных бактерий предварительно выращивали в течение 5 су-ток жидкие накопительные культуры на ми-неральной среде Кадота с метанолом [9] и использовали их для посева на агаризованную среду того же состава.

В ходе работы было получено 98 эндофит-ных культур, изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков которых проводили в соответствии

с определителем [10]. Помимо микроскопи-рования бактериальных культур, проводили окраску по Граму, тесты на наличие оксида-зы, каталазы и окислительно-ферментатив-ный тест на использование глюкозы, опреде-ляли амилалитическую, протеолитическую и целлюлозолитическую активность бактери-альных культур, способность к спорообразо-ванию.

Для оценки биорегуляторных свойств ис-пользовали бактериальные изоляты, приве-дённые в таблице 1. Влияние эндофитных бактерий на морфометрические и биохими-ческие показатели проростков изучали в ус-ловиях водно-бумажной культуры. Расти-тельным тест-объектом служил сорт мягкой

Таблица 1

Штаммы бактерий, использованные в данной работе, и источники их выделения

Вид, штамм	Откуда выделен (источник)	Среда выделения
Эндофитные бактерии		
4-220	Листья ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Фермер	Среда RHM [7]
4-221	То же	
2-212	Корни ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Фермер	
2-218	То же	
Б2-1	Почки берёзы (<i>Betula alba</i> L.)	
Б2-2	То же	
С2	Почки сирени (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	
С2-1	То же	
К2	Почки клёна (<i>Acer platanoides</i> L.)	
Ш2	Почки шиповника (<i>Rosa canina</i> L.)	
<i>Curtobacterium plantarum</i> 6-I	Корни озимой ржи (<i>Secale cereale</i> L.) Вятка 2	Среда с пропионатом натрия [8]
<i>Streptomyces</i> sp. 3s	То же	
<i>Cellulomonas</i> sp. 7	«	
<i>C. plantarum</i> 2-II	«	
4s	«	
7-1	«	
6-II шт. 1	«	
6-II шт. 2	«	
4-II	«	
<i>Methylobacterium</i> sp. Б2	Почки берёзы (<i>Betula alba</i> L.)	Среда Кадота с метанолом [9]
<i>Methylobacterium</i> sp. С1	Почки сирени (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	
<i>Methylobacterium</i> sp. Бер1	Почки берёзы (<i>Betula alba</i> L.)	
<i>Methylobacterium</i> sp. Бер2	То же	
<i>Methylobacterium</i> sp. Тр2	Листья тритикале	
<i>Methylobacterium</i> sp. К1	Почки клёна (<i>Acer plat anoides</i> L.)	
Фитопатогенные бактерии		
<i>Erwinia rhapontici</i> 1м-33	Семена оз имой ржи (<i>Secale cereale</i> L.)	Среда RHM [7]
<i>Erwinia herbicola</i> Мал 1	Почки малины (<i>Rubus idaeus</i> L.)	
<i>Erwinia rhapontici</i> Д 1-2	Семена оз имой ржи (<i>Secale cereale</i> L.)	
<i>Bacillus</i> sp.10 сл	Листья огурца (<i>Cucumis sativus</i> L.)	
<i>Pseudomonas cepacia</i> 3809	Получен из Института микробиологии МО РФ г. Киров	

яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Приокская. Предварительно семена замачивали на 20 час. в жидких 5-суточных культурах бактерий (разведение 1:100 и выше), выращенных на капустной среде [11] при 27°С на качалке (180 об./мин.). В контроле семена замачивали в неинокулированной среде. Проклюнувшиеся семена раскладывали на увлажнённую до полной влагоёмкости фильтровальную бумагу, закатывали в рулоны (по 25 шт. в каждом). Рулоны устанавливали вертикально в химические стаканы и помещали в камеру искусственного климата ПЛКА (Германия) при температуре 25/18° (день/ночь), освещённости 10 Клк и фотопериоде 16 час. Через 6 суток определяли показатели всхожести, линейные размеры и сухую массу проростков, через 10 суток проводили анализ биохимических показателей. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях проростков определяли на спектрофотометре «Specol» (Германия) в ацетоновой вытяжке [12] при длинах волн 662, 644 (хлорофиллы) и 440,5 нм (каротиноиды). Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), образующимся в процессе ПОЛ [13].

Способность эндофитных бактерий к синтезу ауксинов определяли с помощью реактива Сальковского (0,5М FeCl₃ в 35%-ной HClO₄). Бактерии выращивали в жидких культурах, используя среды, по составу соответствующие средам выделения, с добавлением 200 мкг/мл триптофана. Бактериальные клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием в течение 10 мин. (6000 об./мин.). Количество индольных соединений в надосадочной жидкости определяли колориметрически с длиной волны 540 нм. Для построения калибровочного графика использовали разведения стандартного раствора ИУК («Fluca», Швейцария). Контролем служила неинокулированная среда с добавлением реактива.

Для изучения антагонистических свойств эндофитных бактерий использовали в качестве тест-культур фитопатогенные бактерии, выделенные из тканей больных растений, и коллекционный штамм *Pseudomonas cepacia* 3809 (табл. 1). Антагонистические свойства бактерий определяли методом посева культур на поверхность картофельного агара в виде пересекающихся штрихов [14]. Искусственные ассоциации для определения антагонистических свойств получали путём попарного

смешивания в объёме стерильной воды клеток штаммов из различных групп бактерий (в соотношении 1:1). Антагонистическую активность оценивали по величине зоны подавления роста тест-культуры на 2 – 4-е сутки инкубации. Каждый тест проводили в 3-х кратной повторности.

Статистическая обработка данных проведена стандартными методами с использованием программ EXCEL и STATGRAFICS. В таблицах и на рисунках представлены средние значения показателей по 4 повторностям и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

На минеральной агаризованной среде с метанолом из различных растительных субстратов (листья и корни озимой ржи, овса, тритикале, почки деревьев) в чистую культуру было выделено 22 штамма, которые оказались фенотипически сходны и были представлены подвижными грамотрицательными палочками размером 0,8 - 1,0x2,0-4,0 мкм, часто собранными в характерные «розетки». Колонии блестящие, гладкие, слабо выпуклые, розовые до почти красных, диаметр 1 – 3 мм. Морфологические и физиолого-биохимические свойства природных изолятов совпадали с признаками бактерий рода *Methylobacterium*, описанными в определителе Берджи [10].

На богатой органической среде РНМ из поверхности стерилизованных листьев и корней зерновых культур (ячмень Фермер и озимая рожь Фалёнская 4) была изолирована 21 культура бактерий. Изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных культур показало, что комплекс эндофитных бактерий зерновых злаков представлен в основном подвижными (67 – 100%) неспороносными (67 – 89%) грамотрицательными (67 – 89%) одиночными (75 – 89%) палочками, различающимися по форме края и размерам. Среди изолятов, полученных из тканей озимой ржи, факультативно-анаэробным типом метаболизма по результатам теста Хью-Лейфсона обладали 92% штаммов. Среди изолятов, полученных из тканей ячменя, факультативно-анаэробным типом метаболизма обладала лишь половина культур, а остальные штаммы характеризовались как микроаэрофилы. Способность к образованию растворимых и нерастворимых пигментов отмечена у 23 – 42% эндофитных бактерий зерновых злаков. Охарактеризовать амилолитическую

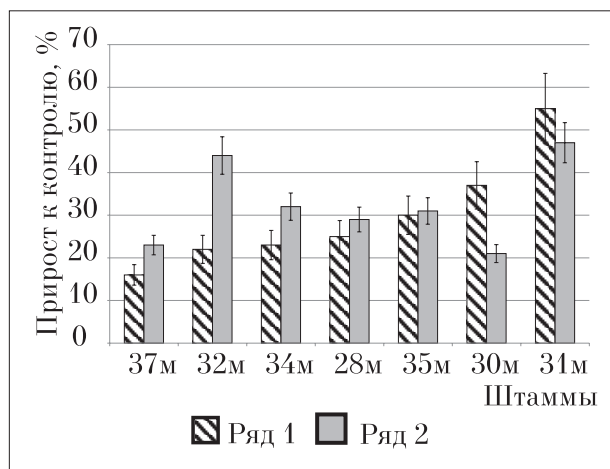


Рис. 1. Изменение линейных размеров (1 – корень, 2 – росток) проростков пшеницы под влиянием обработки семян жидкими культурами (1:100) эндофитных микробов

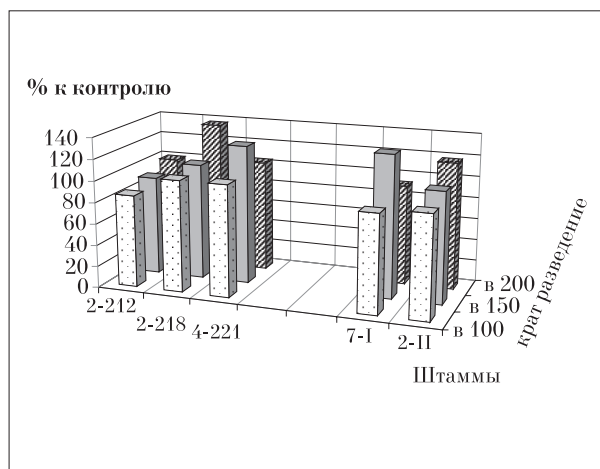


Рис. 2. Накопление сухой биомассы проростками пшеницы в зависимости от разведения жидкой культуры гетеротрофных эндофитных бактерий

и протеолитическую активность эндофитных культур не представилось возможным, поскольку первичные изоляты прекращали рост при пересевах на диагностические среды.

В комплексе эндофитных бактерий, выделенных на среде РНМ из почек деревьев и кустарников (11 штаммов), не встречались пигментированные формы. Большинство (73%) представителей отнесены на основании особенностей роста к микроаэрофилам. В остальном эндофиты, изолированные из почек, проявили свойства, сходные с эндофитными бактериями зерновых злаков.

На селективной среде с пропионатом натрия из корней озимой ржи Вятка 2 были выделены в чистую культуру 44 бактерии, из них 14 актиномицетов. Комплекс немикелиальных прокариот был представлен в основном подвижными (70%) неспороносными (97%) грамположительными (80%) бактериями, различающимися по форме и размерам: грамположительные палочки – 13%, грамположи-

тельные кокки – 13%, грамтрицательные палочки – 20%, коринеформные бактерии – 53% от общего количества изолятов. Среди эндофитных изолятов преобладали факультативно-анаэробные формы, только 3,3% изолятов обладали окислительным типом метаболизма по результатам теста Хью-Лейфсона. Протеолитическая и амилитическая активность выявлена у 40% культур. Целлюлозолитической активностью характеризовались 17% эндофитных изолятов.

Среди выделенных из корней озимой ржи на среде с пропионатом натрия актиномицетов обнаружены виды родов *Streptomyces* и *Micromonospora*. Амилитическая активность отмечена у 79% изолятов, целлюлозолитическая – у 71% изолятов. В целом изучение фенотипических свойств эндофитных бактерий затруднялось слабым ростом первичных изолятов на лабораторных средах.

В результате замачивания семян пшеницы в жидких культурах, содержащих как

Таблица 2
Содержание пигментов в листьях пшеницы в зависимости от варианта обработки семян культуральной жидкостью эндофитных бактерий ячменя

Вариант обработки	Разведение	Хлорофиллы, мг/г		Каротиноиды, мг/г	Соотношение	
		а	в		Хлорофиллов а/в	Хлорофиллы/каротиноиды
Контроль	-	9,09±0,36	3,00±0,03	2,78±0,16	3,03	4,35
шт. 2-212	1:100	8,87±0,43	3,07±0,17	2,60±0,12	2,89	4,60
	1:150	10,36±0,40	3,22±0,12	3,04±0,12	3,21	4,46
	1:200	9,76±0,18	3,19±0,06	2,99±0,05	3,06	4,33
шт. 4-221	1:100	9,76±0,28	3,19±0,11	2,91±0,08	3,06	4,45
	1:150	9,87±0,62	3,31±0,26	2,98±0,16	2,98	4,42
	1:200	9,85±0,28	3,16±0,09	2,96±0,09	3,11	4,40

Таблица 3

Содержание пигментов в листьях пшеницы в зависимости от варианта обработки семян культуральной жидкостью эндофитных актинобактерий озимой ржи

Вариант обработки	Разведение	Хлорофиллы, мг/г		Каротиноиды, мг/г	Соотношение	
		а	в		Хлорофиллы а/в	Хлорофиллы/каротиноиды
Контроль	-	15,6±0,74	6,1±0,49	5,5±0,34	2,6	3,9
6-II шт. 1	1:100	16,3±0,53	5,0±0,21	4,8±0,19	3,2	4,4
6-II шт. 2	1:100	16,0±1,60	5,3±0,38	4,8±0,48	3,0	4,4
7	1:100	17,1±0,42	5,7±0,43	5,2±0,10	3,0	4,4
4-II	1:100	15,0±0,81	5,2±0,67	4,8±0,12	2,9	4,2
7-I	1:150	14,5±0,62	4,8±0,19	4,4±0,22	3,0	4,4
	1:200	16,7±0,44	5,3±0,50	5,0±0,14	3,1	4,4
2-II	1:150	14,4±0,85	4,9±0,08	4,3±0,15	2,9	4,5
	1:200	15,1±0,57	5,1±0,13	4,7±0,22	3,0	4,3

живые клетки, так и водорастворимые метаболиты выделенных бактерий, происходили изменения биоморфологических показателей проростков. Жидкие культуры большинства мезофильных штаммов в разведении 1:100 не оказывали ингибирующего действия на проростки тест-культуры. Если значительная часть (64%) мезофильных изолятов способствовала увеличению массы и линейных размеров проростков пшеницы на 16 – 55% по сравнению с контролем (рис. 1), то жидкие культуры эндофитных бактерий, не усваивающих метанол, наоборот, часто угнетали рост проростков на 7 – 24% к контролю. Ростстимулирующий эффект эндофитных бактерий, выделенных на средах с пропионатом натрия и РНМ, проявлялся в ряде случаев при больших разведениях культуральной жидкости, чем 1:100. Жидкие культуры эндофитных бактерий, изолированных, например, из ячменя (шт. 4-221 и 2-218) и озимой ржи (*Curvobacterium plantarum* 2II и шт. 7-I), оказали стимулирующий эффект на проростки пшеницы в разведениях 1:150 и 1:200 (рис. 2).

Обработка семян жидкими культурами эндофитных бактерий в различных разведениях сопровождалась изменениями в содержании фотосинтетических пигментов в листьях проростков пшеницы. В результате обработки семян шт. 2-212 (в разведении 1:150) существенно возросло в листьях содержание хлорофиллов а и в, по сравнению с контролем (табл. 2). Аналогичная тенденция прослеживалась в результате обработки семян пшеницы шт. 4-221 (1:150). Стимулирующий эффект при использовании для обработки семян жидких культур этих же бактерий в разведениях 1:100 не наблюдался или проявлялся в меньшей степени. Среди актинобак-

терий, выделенных из корней озимой ржи, также обнаружены штаммы, обработка семян которыми приводила к изменениям в пигментном комплексе листьев проростков. Так, культуры *Cellulomonas sp.* 7 и шт. 7-I (1:200) способствовали возрастанию в листьях содержания хлорофилла а (табл. 3). Под воздействием культур *C. plantarum* 2-II, 6 II шт.1, 4-II, 7-I (1:150) содержание хлорофилла в и каротиноидов в листьях снижалось.

В окислительной деструкции хлорофилла и других компонентов фотосинтетического аппарата участвуют активные формы кислорода (АФК), которые образуются в процессе жизнедеятельности растений и концентрация которых в норме контролируется антиоксидантной системой растений. Одним из механизмов детоксикации АФК в клетке является поглощение активированного кислорода веществами с антиоксидантными свойствами. Для оценки способности исследуемых

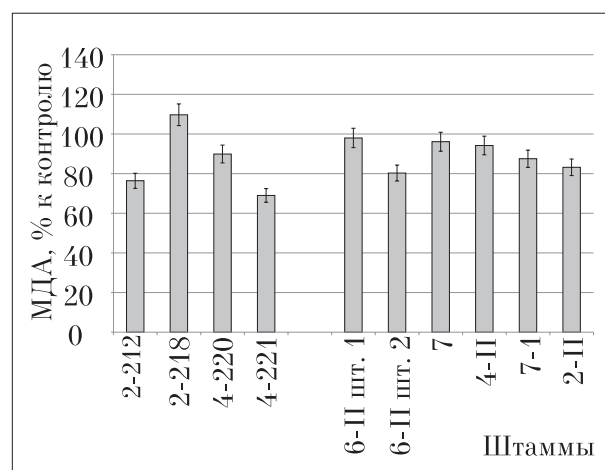


Рис. 3. Содержание малонового диальдегида в листьях проростков пшеницы в зависимости от варианта обработки семян культуральной жидкостью эндофитных бактерий

Таблица 4

Содержание малонового диальдегида в листьях пшеницы в зависимости от варианта обработки семян культуральной жидкостью эндофитных бактерий ячменя

Вариант обработки	Разведение	Малоновый диальдегид, нмоль/г сырой массы
Контроль	-	49,27±3,39
шт. 2-212	1:100	37,63±0,67
	1:150	45,87±5,51
	1:200	47,31±6,78
шт. 4-221	1:100	34,60±1,48
	1:150	36,44±1,36
	1:200	46,02±2,64

штаммов эндофитных бактерий оказывать на растения антиоксидантное действие изучали интенсивность ПОЛ в листьях. Активность процесса оценивали по накоплению в тканях одного из его конечных продуктов – малонового диальдегида (МДА). Как следует из приведённых на рисунке 3 данных, снижению по сравнению с контролем интенсивности ПОЛ в листьях проростков пшеницы способствовала обработка семян эндофитными бактериями большинства штаммов. Наиболее активным антиоксидантным действием отличались культуры бактерий 4-221 и 2-212 в разведении 1:100, выделенные из тканей ячменя. По мере усиления степени разведения жидких культур для обработки семян антиоксидантное действие эндофитных бактерий ослаблялось, о чём свидетельствует более высокое содержание МДА в листьях проростков пшеницы (табл. 4). Способность эндофитных бактерий воздействовать на морфометрические

(масса, длина стебля и корня) и биохимические (содержание фотосинтетических пигментов, интенсивность ПОЛ) показатели растений может быть обусловлена фитогормональной активностью эндофитных культур. Выборочный скрининг изолятов по способности продуцировать ауксины подтвердил это предположение (табл. 5). Практически все исследованные бактерии в каждой из трёх групп изолятов, полученных на различных по составу селективных средах, обеспечивали накопление в культуральной жидкости индольных соединений в количествах от 12 до 94 мкг/мл.

Следующим этапом работы явилось изучение антагонистических свойств выделенных бактериальных штаммов. Все эндофитные бактерии, независимо от состава среды выделения, характеризовались низкой антагонистической активностью (зоны ингибирования от 0 до 12 мм) и узким спектром действия (против 0-3 тест-культур) в отношении фитопатогенных бактерий (табл. 6). Более активно подавляли рост фитопатогенов искусственные микробные ассоциации, содержащие одновременно клетки штаммов из разных групп бактерий (выделенные на среде РНМ и метилотрофы). Смешанные культуры с участием штамма С2-1 и одного из штаммов метилобактерий (МБер1; МБер2) проявили более широкий спектр антагонистического действия (против 5 культур), чем собственно штамм С2-1 (против 3-х культур). Более сильное угнетающее действие, чем монокультура бактерии С2-1, оказали на фитопатогенные бактерии *Erwinia herbicola*, *Bacillus sp.*10сл. и *Pseudomonas cepacia* смешанные культуры бактерий С2-1+ МБер1 и С2-1+ Бер1. Искусственные ассоциации эндофитной бактерии С2-1, в состав которых входили метилобактерии МБер1 и МБер2, подавляли рост фитопатогенных бактерий *E. rhapontici* 1м-3к, тогда как самостоятельно ни один из штаммов

Таблица 5

Образование ауксинов представителями эндофитных бактерий на среде с триптофаном

Бактериальная культура	Ауксины, мкг/мл
<i>Methylobacterium</i> sp. Б2	25,1±0,12
<i>Methylobacterium</i> sp. С1	29,2±1,04
МТр2	17,8±0,12
МК1	12,0±0,06
4-220	44,0±0,7
2-218	18,5±0,7
<i>Curtobacterium plantarum</i> 6-I	68,0±0
<i>Streptomyces</i> sp. 3s	83,0±0
<i>Cellulomonas</i> sp. 7	43,2±2,5
<i>C. plantarum</i> 2-II	32±0,0
4s	54,5±0,7
7-I	94,0±0
6-II шт.1	31,5±0
6-II шт. 2	22,0±0
4-II	66,0±0,7

Антагонистические свойства эндофитных культур и их ассоциаций с мезофитными бактериями

Штаммы бактерий и их ассоциации	Зона подавления роста тест-культур, мм				
	<i>Erwinia rhapontici</i> 1м-3к	<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Erwinia rhapontici</i> Д1-2	<i>Bacillus sp.</i> 10 сл.	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Б2-1	0	0	0	0	0
Б2-1 + МБер 1	0	0	0	0	0
Б2-1 + МБер 2	1,3±0	0	5±0,10	0	0
Б2-2	0	1,7±0	1,7±0	0	0
Б2-2 + МБер 1	0	0	2,3±0,05	0	0
С2	0	3±0,25	0	0	0
С2 + МБер 1	0	3±0,20	0	0	0
С2 + МБер 2	0	3±0	0	0	0
С2-1	0	12±0,12	0	7,7±0,55	6,0±0,40
С2-1+ МБер 1	13±0,05	24,7±1,30	7±0,08	18,3±1,05	15,3±0,80
С2-1+ МБер 2	10,5±0,12	20±1,05	15,5±0,75	20±1,00	19,5±0,75
К2	0	10±0,80	0	5,3±0,03	6,3±0,20
К2 + МБер 1	0	11,7±0,25	0	11,7±0,10	11,7±0,50
Ш2	0	11,3±1,60	0	10±0,05	6,0±0,25
Ш2+МБер 1	0	23,7±1,25	1±0	14,7±0,15	11,3±0,30
МБер 1	0	1,7±0	2±0	0	0
МБер 2	0	2,3±0,05	3,3±0,01	0	0
7-1	0	4±0,15	0	2±0	2±
4-П	0	7±0,20	0	2±0,01	2±0

искусственной ассоциации не оказывал угнетающего действия на рост этого фитопатогена. Полученные данные подтверждают обнаруженный ранее для эпифитных бактерий факт [15], что мезофиты, являясь компонентами смешанных культур, могут быть антагонистами фитопатогенных бактерий. Искусственные ассоциации, в состав которых входили эндофитные мезобактерии, в сравнении с монокультурами, также проявили более высокую антагонистическую активность в отношении фитопатогенных бактерий или угнетали рост большего числа использованных в работе тест-культур фитопатогенов.

Таким образом, можно заключить, что эндофитные бактерии, ассоциированные с культурами зерновых злаков (яровой ячмень, озимая рожь, тритикале) и некоторыми видами диких древесных и кустарниковых растений (берёза, клён, сирень, шиповник) продуцируют и выделяют в культуральную жидкость физиологически активные метаболиты, способные оказывать на растения как стимулирующее, так и угнетающее действие. В зависимости от степени разведения жидких бактериальных культур, используемых для обработки семян, изменяются морфометрические и биохимические показатели проростков тест-культуры. Способность к фиторегуляции может быть обусловлена достаточно высокой продукцией ауксинов (до 94 мкг/мл), обнаруженной у исследованных штаммов.

Эндофитные бактерии в чистых культурах проявили низкую антагонистическую активность в отношении фитопатогенных бактерий. С одной стороны, это согласуется с данными литературы о меньших, в сравнении с эпифитными штаммами, адаптивных возможностях эндофитов, связанных, по мнению авторов, со способностью проникать внутрь корня, уходя от прямого контакта с компонентами почвы и ризосферы [16], с другой – расходится с многочисленными литературными данными об участии эндофитных бактерий в ограничении заболеваемости растений [1, 17, 18]. Очевидно, основным механизмом защиты растения от поражения фитопатогенными микроорганизмами является регуляторное действие эндофитов на иммунитет [19]. Полученные результаты согласуются с данными о существовании тесной метаболической связи эндофитных бактерий с растениями, но едва ли свидетельствуют о большом потенциале эндофитов в разработке новых биопрепаратов для повышения эффективности растениеводства.

Утрата значительной частью первичных эндофитных изолятов жизнеспособности при лабораторном культивировании может быть связана с их облигатной зависимостью от ассоциации с растением. Причём трудность культивирования эндофитов объясняется не только их сложными ростовыми потребностями, но и может быть обусловлена понижением жизнеспособности под действием защитных

систем хозяина [20]. В последнем случае предполагается, что микроорганизм настолько адаптирован к внутренней среде хозяина, что не может существовать в других условиях. Примерами таких адаптаций может служить специфический жирнокислотный состав, обеспечивающий стабильность мембран в системах эндосимбиоза [21], или неспособность эндофитных бактерий к внутриклеточному биосинтезу поли-3-гидроксипутрата, который рассматривают как специфический клеточный ответ на некоторые виды стресса [22]. В связи с этим более перспективным можно считать использование биорегуляторного потенциала эндофитных бактерий для создания искусственных микробно-растительных ассоциаций, комбинируя методы культуры ткани и инокуляции растений *in vitro*.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ (№ 08-04-13590-офи_ц).

Литература

1. Kobayashi D. Y., Palumbo J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture/ Ed. C.W. Bacon and J. F. White. Microbial endophytes. N.Y.: Marcel Dekker Inc., 2000. P. 199-233.
2. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops // Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. P. 895-914.
3. Хайруллин Р.М., Недорезков В.Д., Мубинов И.Г., Захарова Р.Ш. Повышение устойчивости пшеницы к абиотическим стрессам эндофитным штаммом *Bacillus subtilis*// Вестник Оренбургского гос. университета. 2007. № 2. С. 129-134.
4. Мубинов И.Г. Реакции пшеницы на действие клеток эндофитного штамма 26Д *Bacillus subtilis* – основы биофунгицида фитоспорин. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа: БГУ. 2007. 22 с.
5. Злотников А.К., Казакова М.Л., Злотников К.М., Казаков А.В. Новый бактериальный эндофит сельскохозяйственных культур// С.-х. биология. Сер. биология растений. 2006. № 3. С.62-66.
6. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Barletta R.G., Anne K.V. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants //Appl Environ Microbiol. 2002. V. 68 (5). P. 2198-2208.
7. Belimov A.A., Dietz K.-J. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations // Microbiol. Res, 2000. V. 155. P. 113-121.
8. Rowbotham T.J., Cross T. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats//J. Gen. Microbiol. 1977. V. 100. P. 231-240.
9. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений/ Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
10. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса. М.: Мир, 1997. 432 с. и - 800 с.
11. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. Л., «Колос». 1969. 240 с.
12. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зелёных листьев// Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С.154-171.
13. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
14. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высшая школа. 1965, 221 с.
15. Широких А.А., Широких И.Г. Изучение полезных для растений свойств мезофильных бактерий // Агрехимия. 2007. №9. С.53-57.
16. Камнев А.А., Тугарова А.В., Антонюк Л.П. Эндофитный и эпифитный штаммы *Azospirillum brasilense* по-разному отвечают на стресс, вызываемый тяжёлыми металлами // Микробиология. 2007. Т. 76. №6. С. 908-911.
17. Бирюкова О.В. Эндофитная ризобактерия *Klebsiella planticola*, взаимодействие с растением и ценозом микромицетов в фитоплане и ризосфере. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2001. М.: МСХА им. К.А.Тимирязева. 20 с.
18. Raupach G. S., Kloepper J. W. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. // Plant Dis. 2000. V. 84. P. 1073-1075.
19. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops// Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. P. 895-914.
20. Квиспел А. Эволюционные аспекты симбиотических адаптаций: вклад *Rhizobium* в эволюцию ассоциации/ Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнк, А. Кондорози, П. Хукас. СПб.: Бионт. 2002. С. 519-539.
21. Selim S., Delacour S., Schwencke J. Accumulation and intracellular distribution of palmitic and propionic acid // Arch. Microbiol. 1996.V. 165. № 4. P. 252-257.
22. Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y., Castro-Sowinski S. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates// Crit. Rev. Microbiol. 2005. V. 31. № 2. P. 55-67.