

## АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *PHYLLOBACTERIUM SP.* ШТАММА СА8 НА УРОЖАЙНОСТЬ БОБОВЫХ КУЛЬТУР

©2013 Ан.Х.Баймиев<sup>1</sup>, Е.С.Иванова<sup>1</sup>, Р.С.Гуменко<sup>2</sup>, О.В.Чубукова<sup>1</sup>, Ал.Х.Баймиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет, г. Уфа

Поступила 01.06.2013

В данной статье проведен анализ положительного влияния инокуляции ризосферными бактериями *Phyllobacterium sp.* штамма СА8 на продуктивность бобовых культур гороха посевного и вики посевной.

**Ключевые слова:** бактерии, инокуляция, урожайность, бобовые культуры.

Интенсификация мирового сельского хозяйства дала возможность за счет новых технологий, агроприемов, использования современных удобрений и пестицидов значительно повысить продуктивность хозяйственно-полезных растений. Но она же привела к нарушениям в экологии за счет чрезмерного использования химии и сомнительным качествам получаемой продукции.

На сегодняшний день на основе высокой культуры земледелия путём научно обоснованного экологически безопасного применения удобрений и пестицидов, широкого внедрения прогрессивных технологий с минимальным использованием средств химизации есть реальная возможность получить сопоставимый урожай экологически чистой сельскохозяйственной продукции. Подобное экологическое сельское хозяйство, под которым понимается производство продукции со значительным сокращением, а иногда и полным отказом от промышленных минеральных удобрений и химических средств защиты растений при максимальном использовании биологических факторов повышения плодородия, не оказывающих отрицательного воздействия на природу, за счет минимального привлечения внешних и максимального использования внутренних ресурсов уже внедрено и продолжает внедряться в различных странах. В России также ставится вопрос о «биологизации» современного сельского хозяйства.

Основной альтернативой минеральным удобрениям, а также химическим протравителям семян и фунгицидам являются биологические препараты. Действующим началом подобных препаратов служат бактерии и микроскопические грибы, обитающие в почве. Для человека и животных такие микроорганизмы совершенно безопасны, а при внесении в почву могут существенно улучшить ее плодородие.

Одними из наиболее распространенных микроудобрений для возделывания бобовых растений являются препараты, в состав которых входят клубеньковые бактерии – ризобии, которые в симбиозе с данными растениями способны к фиксации атмосферного азота и переводу его в форму, легко усвояемую растением. Но, к сожалению, преобладание симбиотрофного питания выявлено лишь у некоторых молодых бобовых культур (вика мохнатая, клевер сходный, козлятник восточный), которые по физиологическим свойствам еще близки к своим дикорастущим предкам. Обработка подобных культур высокоэффективными специфичными штаммами клубеньковых бактерий приводит к значительному повышению их урожайности. Для «традиционных» же бобовых культур, имеющих продолжительную историю окультуривания и селекции, характерно преобладание автотрофного типа азотного питания (горох, люцерна, вика посевная) и инокуляция их клубеньковыми бактериями не всегда может сказываться на их урожайности. Связано это, скорее всего, из за того, что в ходе окультуривания и селекции растений происходило существенное снижение их симбиотического потенциала. Оно могло быть связано с тем, что селекцию растений проводили на фоне достаточного, а часто и избыточного снабжения азотом, что привело к отбору генотипов, «склонных» к энергетически менее затратному автотрофному питанию [1, 2]. Для повышения урожайности подобных растений необходимо использование других ростостимулирующих бактерий, действие которых быть может связано с другими благоприятными воздействиями. Одними из таких бактерий могут служить представители рода *Phyllobacterium*.

Бактерии рода *Phyllobacterium* принадлежат к порядку Rhizobiales охватывающему за некоторым исключением все виды клубеньковых бактерий. Впервые бактерии данного рода были описаны Кнозелем как бактерии, образующие клубенек подобные структуры на листьях некоторых тропических растений [3]. В настоящее время данные бактерии обнаружены в ризосфере широкого круга растений, так и в клубеньках бобовых [4]. Тем не менее, симбиотические гены были обнаружены только у некоторых штаммов бактерий. Примечания

Баймиев Андрей Ханифович, д.б.н., доцент, старший научный сотрудник, e-mail: baumiev@anrb.ru; Иванова Екатерина Сергеевна, аспирант, e-mail: tortoise14@yandex.ru; Гуменко Роман Сергеевич, магистрант, e-mail: o990@mail.ru; Чубукова Ольга Вячеславовна, научный сотрудник, e-mail: chubukova@bk.ru; Баймиев Алексей Ханифович, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник, e-mail: baumiev@mail.ru

тельным является то, что *Phyllobacterium* скорее всего не имеют собственные симбиотические гены, а получают их за счет горизонтального переноса генов. Например, у штаммов из клубеньков раббитника русского, по нуклеотидной последовательности симбиотические гены оказались сходными с аналогичными последовательностям *Bradyrhizobium*, а у штаммов из клубеньков чины Гмелина - *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Видимо данный вид бактерии способен вступать в симбиоз с бобовыми за счет приобретенных симбиотических генов [4].

*Phyllobacterium* способны также и к ассоциативному симбиозу. Например, имеются данные о выделении бактерий рода *Phyllobacterium* из почвы [5-7], из корней сахарной свеклы [8, 9], известны симбиотические взаимодействия между *Phyllobacterium myrsinacearum* и водорослью *Chlorella vulgaris* [10], а также между *Phyllobacterium* sp. и *Bacillus licheniformis*, выделенных из мангровых растений [11]. Известно, что бактерии рода *Phyllobacterium* обладают свойством стимулировать устойчивость растений к болезнетворным организмам [8].

Целью данной работы было исследование влияния на урожайность гороха посевного и вики посевной инокуляции их семян при посеве бактериями *Phyllobacterium* sp. штамма СА8 и *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был штамм СА8 *Phyllobacterium* sp., выделенный из клубенька караганы древовидной *Caragana arborescens*, а также производственный штамм 1078 бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae* из коллекции ГНУ ВНИИСХМ.

Инокуляцию бактериями семян растений проводили непосредственно перед посевом. Для этого семена обрабатывали суспензией бактерий в концентрации  $10^6$  КОЕ (колонии образующих единиц) на мл до их легкой влажности.

Генетическое сравнение штаммов, выделенных из клубеньков, проводили методом RAPD с использованием нескольких произвольных олигонуклеотидных праймеров.

ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1% Triton X100 в присутствии смолы Chelex100 (1%) (BioRad, США). Для этого в 1.5 мл пробирки со 100 мкл лизирующего раствора помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспендирования инкубировали при температуре 95°C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием 12000 об/мин в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

ПЦР проводили на амплификаторах МС2 «Терцик» компании «ДНК-технология» (Россия) и «Т1 Thermocycler» фирмы «Biometra» (Германия) с использованием стандартных наборов для амплификации ДНК.

Урожайность культур определяли взвешиванием надземных частей растений, подсчетом и определением массы семян растений.

В качестве опытных растений были использованы культуры с преобладанием автотрофного типа азотного питания горох посевной сорта Чишминский 95 и вика посевная сорта Льговская 22.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Горох посевной и вика посевная относятся к культурам с преобладанием автотрофного типа азотного питания, поэтому инокуляция их культурами клубеньковых бактерий, как считается, незначительно влияет на их урожайность. В рамках развития экологического сельского хозяйства есть необходимость в подборе для данных культур штаммов бактерий с иным благоприятным для них воздействием, что сможет повлиять на их урожайность.

В качестве такой культуры нами испытан штамм СА8 бактерий *Phyllobacterium* sp. Для определения влияния данного штамма на продуктивность растений гороха посевного и вики посевной перед посевом семена растений были обработаны исследуемой культурой микроорганизмов. Для сравнения также были высеяны семена данных растений инокулированные производственным специфичным штаммом клубеньковых бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078. В качестве отрицательного контроля были использованы растения без искусственной инокуляции. Все растения были посажены в одноразовые стаканы в стерильную почву в количестве два растения на стакан. Итого было посажено по 10 растений внутри каждого опыта.

После 40 дней выращивания в условиях светоплощадки была измерена масса надземных частей опытных и контрольных растений.

В случае с горохом посевным массы растений во всех опытах не имели достоверных отличий и составили для растений инокулированных *Phyllobacterium*  $4,2 \pm 0,5$  г., для растений инокулированных *R. leguminosarum* bv. *viciae* –  $4,4 \pm 0,6$  г., для контрольных растений –  $4,1 \pm 0,4$  г.

В варианте же с викой посевной были обнаружены более значительные отличия между вариантами по массе надземных частей растений. Так, например средняя масса растений для варианта с инокуляцией *Phyllobacterium* составила  $2,3 \pm 0,4$  г., для растений инокулированных *R. leguminosarum* bv. *viciae* –  $1,9 \pm 0,3$  г., а для контрольных растений –  $1,4 \pm 0,4$  г. (рис.).

У всех растений, инокулированных специфичными для них клубеньковыми бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078, на корнях было образовано от 10 до 28 клубеньков. У остальных растений на корнях клубеньков обнаружено не было.



**Рис.** Влияние искусственной инокуляции бактериями на массу надземных частей растений а) гороха посевного и б) вики посевной. I – инокуляция *Phyllobacterium* sp. штамма CA8; II – инокуляция *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078; контроль (без инокуляции)

Разная отзывчивость на инокуляцию бактериями двух взятых в анализ растений можно, скорее всего, объяснить тем, что 40 дней для определения положительного воздействия бактерий на растения недостаточно, особенно в случае с горохом посевным. Дело в том, что в начальный период роста растения усваивают запасные вещества из семядолей. Поскольку семена гороха значительно больше семян вики, то можно предположить, что проростки гороха дольше подпитываются запасными веществами, и менее зависимы от другого способа питания в этот период. Но, тем не менее, например в случае с викой посевной положительный эффект от инокуляции как *Phyllobacterium* sp. штамма CA8, так и *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078 несомненно ощущается. Предположительно благоприятное влияние бактерий *Phyllobacterium* sp. не связан с фиксацией азота, поскольку на корнях растений, обработанных данными микроорга-

низмами клубеньков не было обнаружено, хотя изначально данные бактерии были нами получены из клубеньков караганы древовидной.

Для того чтобы более достоверно определить влияние исследуемых бактерий на урожайность растений, был проведен полевой опыт с горохом посевным. Эксперимент проводили на полях ОАО «Рассвет» Татышлинского района Республики Башкортостан. Было заложено 3 опытных участка площадью по 16 м<sup>2</sup>. Первый опытный участок являлся контрольным и был засеян семенами без инокуляции, второй участок был засеян семенами, инокулированными бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078, третий участок - *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078 совместно с *Phyllobacterium* sp. штамма CA8.

Урожайность растений определяли подсчетом количества бобов, семян и массы семян у 10 растений с каждого участка (табл.).

**Таблица.** Урожайность растений гороха при различных вариантах инокуляции

	контроль	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. leguminosarum</i> + <i>Phyllobacterium</i> sp.
Количество бобов	70	86	104
Количество семян	253	293	387
Масса семян	51	64	90

Из результатов, приведенных в таблице, можно видеть, что обработка бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078 не приводит к заметному увеличению урожая гороха. Это, как уже говорилось выше, может являться результатом селекционной работы с этой культурой, приведшей к преобладанию автотрофного типа питания азотом у этих растений. Кроме того, в почве почти повсеместно встречаются клубеньковые бактерии специфичные для этих растений и дополнительная инокуляция не сильно приводит к увеличению количества клубеньков на корнях данной культуры. Тем более, что аборигенная микрофлора является часто более приспособленной к местным условиям и более конкурентоспособной. В пользу этого говорит и генетический анализ клубеньковых бактерий проведенный методом RAPD показавший, что только в среднем 32% клубеньков образованы бактериями, которыми проводилась искусственная инокуляция.

Более интересным оказался результат при совместной инокуляции растений гороха

*Phyllobacterium* sp. штамма CA8 и *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078. В данном варианте обнаруживается ощутимое увеличение урожая по сравнению с контролем.

Совместное использование нескольких штаммов ризобактерий неоднократно рассматривалось как возможность улучшения эффективности инокуляции. Прием основан на расширении экологической пластичности и диапазона совместимости многокомпонентных бактериальных инокулятов с растением и использовании принципов аддитивности и синергизма при взаимодействии с растением нескольких ассоциантов. Например, в литературе есть данные об успешных экспериментах по инокуляции смесями азотфиксирующих бактерий, существенно повышающих урожай и накопление азота у различных растений [12-14]. В нашем случае вероятнее всего наблюдается подобного рода синергический эффект данных двух штаммов. Кроме того, при генетическом анализе бактерий из образовавшихся у растений клубеньков было обнаружено, что большая их часть (54%) образована бактериями



штамма 1078 *R. leguminosarum*, чего не наблюдалось при заражении растений монокультурой ризобий, Это в свою очередь за счет высокой эффективности данного штамма несомненно положительно скажется на азотном питании растений.

Бактерии *Phyllobacterium* sp. в клубеньках обнаружены не были. Вероятно положительное действие данных бактерий не на прямую или вообще не связано с азотным питанием растения и имеют иной механизм.

Несомненно, подбор вариантов опыта и способы подсчета урожая растений не дает пока права с уверенностью говорить о том, на сколько совместная обработка *Phyllobacterium* sp. штамма SA8 и *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма 1078, повышает урожайность гороха посевного, но то, что такой положительный эффект существует является очевидным. В настоящее время данная система проходит полевые опыты и после трех лет ее испытания в различных почвенно-климатических условиях она может быть рекомендована для применения в сельском хозяйстве.

Данная работа проводилась при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы» (Госконтракт 16.740.11.0671, Соглашения 8115, 8046), РФФИ (Соглашения 12-04-31277, 12-04-31284).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проворов Н.А. Соотношение симбиотрофного и автотрофного питания азотом у бобовых растений: генетико-селекционные аспекты // Физиология растений. 1996. Т. 43. С. 127-135.
2. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Принципы селекции растений на взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами // Вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 3. С. 295-305.
3. Knosel D.H. Prüfung von bakterien auf Fähigkeit zur Stembildung // Zentralbl Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene. 1962. V. 116. P. 79-100 (in German).
4. Баймиев Ан.Х., Птицын К.Г., Мулдашев А.А., Баймиев Ал.Х. // Экологическая генетика. 2011. № 2. С. 3-8.
5. Megan M., McCoy. Determination of the presence of the catabolic alkane monoxygenase gene from soil microorganisms isolated from coastal sand dunes // Biological Sciences Department, College of Science and Mathematics, California Polytechnic State University. San Luis Obispo, 2000. P. 1-15.
6. Hallmann J., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control // Soil Biology and Biochemistry. 1999. N. 31. P. 551-560.
7. Lauer A. Diversität und Dynamik nitratreduzierender und denitrifizierender Bakteriengruppen eines Ackerbodens: Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Kiel, 2001. 206 p.
8. Lambert B., Joos H., Dierickx S., Vantme R., Swings J., Kersters K., VanMontagu M. The identification and plant interaction of a *Phyllobacterium* sp. a predominant rhizobacterium of young sugar beet plants // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 1093-1102.
9. Mergaert J., Cnockaert M.C., Swings J. *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52 (Pt 5). P. 1821-1823.
10. Lebsky V.K., Gonzalez-Bashan L.E., Bashan Y. Ultrastructure of interaction in algininate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* // Can. J. Microbiol. 2001. V. 47 (1). P. 1-8.
11. Rojas A., Holguin G., Glick B.R., Bashan Y. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N<sub>2</sub>-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere // FEMS Microbiology Ecology. 2001. V. 35. P. 181-187.
12. Okon Y., Labandera-Gonzalez C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation // Soil Biol. Biochem. 1994 V. 26. P. 1591-1601.
13. Fayez M. Untraditional N<sub>2</sub>-fixing bacteria as biofertilizers for wheat and barley // Ann. Agri. Sci. 1989. V. 34. P. 731-740.
14. Maudinas B., Chemardin M., Yovanovich E. et al. Gnotobiotic cultures of rice plants up to ear stage in the absence of combined nitrogen source but in the presence of free living nitrogen fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospseudomonas capsulate* // Plant and Soil. 1981. V. 60. P. 85-97.

#### IMPACT ANALYSIS OF RHIZOSPHERE BACTERIA *PHYLLOBACTERIUM* SP. STRAIN SA8 ON LEGUME YIELD

©2013 An.Kh. Baymiev<sup>1</sup>, E.S. Ivanova<sup>1</sup>, R.S. Gumenko<sup>2</sup>, O.V. Chubukova<sup>1</sup>, Al.Kh. Baymiev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

<sup>2</sup>Bashkir State University, Ufa

This article analyzes the positive impact of inoculation with rhizosphere bacteria *Phyllobacterium* sp. strain SA8 on the productivity of pea and vetch.

**Keywords:** bacteria, inoculation, yield, legumes.

Andrey Baymiev, Doctor of Biology, senior researcher, e-mail: baymiev@anrb.ru; Ekaterina Ivanova, postgraduate student, e-mail: tortoise14@yandex.ru; Roman Gumenko, student, e-mail: o990@mail.ru; Olga Chubukova, Doctor of Biology, researcher, e-mail: chubukova@bk.ru; Alexey Baymiev, Doctor of Biology, leading researcher, e-mail: baymiev@mail.ru