



УДК 579.64:633.878.32

DOI: 10.17238/issn0536-1036.2018.4.161

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОФИТЫ ТОПОЛЯ**А.С. Аксенов¹, канд. техн. наук, доц.**Н.А. Кузьмина², мл. науч. сотр.*¹Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, д. 17, г. Архангельск, Россия, 163002; e-mail: a.s.aksenov@narfu.ru²Институт биогеографии и генетических ресурсов Федерального исследовательского центра комплексного изучения Арктики им. академика РАН Н.П. Лаверова, наб. Северной Двины, д. 23, г. Архангельск, Россия, 163000

Биотехнологии дают возможность решать глобальные проблемы устойчивого развития хозяйственной деятельности. Изучение биоразнообразия эндофитных бактерий растений позволяет создавать новые эффективные биопрепараты для адаптивного растениеводства. Цель исследования – выявление эндофитных бактерий тополя в условиях Севера (г. Архангельск). Образцы отбирали в начале октября у кронированных деревьев тополя лавролистного и тополя душистого, не имеющих внешних признаков патологий и стволовой гнили. Исследования основывались на характеристике изолятов, полученных из внутренних участков центральной древесины стволов тополей после поверхностной стерилизации. Опилки изучали методом обрастания. Питательная среда – мясо-пептонный агар. Для определения биохимической активности чистых культур бактерий использовали дифференциально-диагностические среды Гисса, которые включали мальтозу, глюкозу, сахарозу, сорбит, маннит и лактозу. Для изолятов бактерий проводили идентификацию путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК и сравнения полученных последовательностей нуклеотидов с гомологичными из базы данных NCBI's GenBank. При высева опилок на питательную среду отмечалось обрастание их бактериальной массой. Опилки тополя лавролистного обрастали более интенсивно, чем тополя душистого. Из древесины тополя лавролистного выделено 4 штамма бактерий (*Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Brenneria salicis*), из древесины тополя душистого – 2 штамма (*Bacillus safensis*, *Brenneria populi*). В статье дана морфологическая и биохимическая характеристика бактерий. Большинство бактерий успешно использовали углеродные компоненты сред Гисса, за исключением сорбита. Способность метаболизировать лактозу и маннит была особенно неустойчивой. Самый широкий спектр углеводов ферментирован штаммами, принадлежащими к роду *Brenneria*.

*Работа выполнена при финансовой поддержке, полученной в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки РФ № 15.8815.2017/8.9 «Молекулярно-биологические методы в биотехнологии термостабильных ферментов».

Авторы выражают благодарность за помощь в работе сотрудникам и студентам кафедры биологии, экологии и биотехнологии САФУ: канд. с.-х. наук О.Н. Тюкавиной, И.Г. Синельникову, А.В. Одинцовой.

Для цитирования: Аксенов А.С., Кузьмина Н.А. Бактериальные эндофиты тополя // Лесн. журн. 2018. № 4. С. 161–166. (Изв. высш. учеб. заведений). DOI: 10.17238/issn0536-1036.2018.4.161

Ключевые слова: бактериальные эндофиты, тополь лавролистный, тополь душистый, древесина.

Введение

Биоэкономика является основой устойчивого развития мировой хозяйственной деятельности. Биотехнологии открывают перед человечеством новые возможности по решению многих глобальных проблем, в том числе и в обеспечении продовольствием, снижении неблагоприятного воздействия на окружающую среду [2]. В экологически ориентированном растениеводстве большое внимание уделяется эффективным естественным биологическим методам повышения продуктивности растений и защиты их от патогенов [7]. При правильном использовании закономерностей роста и развития эндофитных микроорганизмов в ассоциации с растениями можно достичь значительных результатов во влиянии на ростовые процессы растений и стимулировании их защитных свойств от стрессов различной природы. Это происходит за счет способности эндофитных бактерий продуцировать растительные гормоны; антибиотические соединения пептидной и низкомолекулярной природы; различные сидерофоры и хелаторы, улучшающие минеральное питание или изолирующие тяжелые металлы и токсические органические вещества; ферменты, вызывающие деградацию клеточных стенок патогенов [3]. Эндофитные бактерии обнаружены в одно- и двудольных растениях, как древесных, так и травянистых [9]. Отечественные ученые выявляли эндофитные бактерии в травянистых растениях [1, 4, 5]. Большое внимание зарубежные ученые уделяют эндофитным бактериям тополя [11, 12], прежде всего в связи с тем, что это биоэнергетическое растение, способное произрастать на маргинальных почвах и использоваться в фиторемедиации [6, 8], характеризуется богатым видовым сообществом эндофитов [13]. Условия произрастания тополя влияют на состав эндофитного сообщества [13]. Изучение биоразнообразия эндофитных бактерий позволит создавать новые эффективные биопрепараты для борьбы с болезнями человека, растений и животных [10] и стимуляции роста растений [7].

Цель работы – выявление эндофитных бактерий тополя в условиях г. Архангельска.

Объекты и методы исследования

Исследования проводили в г. Архангельске в рядовых посадках тополя вдоль Ленинградского проспекта. Образцы отбирали в двукратной повторности в начале октября у кронированных деревьев тополей лавролистного и душистого без внешних признаков патологий и с отсутствием стволовой гнили. Исследования основывались на характеристике изолятов, полученных из внутренних центральных участков древесины стволов тополей после поверхностной стерилизации. Из центральной части кусочков керна получали опилки, которые изучали методом обростания. В качестве питательной среды использовали мясо-пептонный агар. Посевы выдерживали в термостате в течение 3...10 сут при температуре 26...28 °С. Для определения биохимической активности изучаемых чистых культур бактерий применяли дифференциально-диагностические среды Гисса, которые включали мальтозу, глюкозу, сахарозу, сорбит, маннит и лактозу. Посевы инкубировали при температуре 27 °С в течение 48 ч.

Для изолятов бактерий была проведена идентификация путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК и сравнения полученных последовательностей нуклеотидов с гомологичными из базы данных NCBI's GenBank. Секвенирование по Сенгеру производили в ООО «Синтол».

Результаты исследования и их обсуждение

При высеве опилок на питательную среду отмечалось обрастание их бактериальной массой. Опилки тополя лавролистного обрастали более интенсивно по сравнению с опилками тополя душистого.

Из древесины тополя лавролистного выделено 4 штамма бактерий, тополя душистого – 2 штамма бактерий. Изоляты относились к родам *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Brenneria*:

изолят 1 (штамм *Staphylococcus pasteuri*) – грамположительные кокки, которые образуют бежевую колонию круглой формы с неровным краем и плоским профилем;

изолят 2 (штамм *Bacillus pumilus*) – грамположительные бациллы, образующие бледно-желтую колонию круглой формы с нитевидным краем, плоским профилем, центр которой приподнят;

изолят 3 (штамм *Bacillus safensis*) – грамположительные бациллы, аналогичные по анатомическим и морфологическим признакам изоляту 2. Колонии штамма *Bacillus safensis* характеризуются бледно-желтой или кремовой окраской, круглой формой, ровным краем, плоским профилем и приподнятым центром;

изолят 4 (штамм *Lysinibacillus fusiformis*) – грамположительные бациллы, которые образуют бежевую колонию круглой формы с ровным краем, плоским профилем и приподнятым центром;

изолят 5 (штамм *Brenneria salicis*) – грамотрицательные бациллы, которые образуют бледно-желтую колонию овальной формы с зубчатым краем и плоским профилем;

изолят 6 (штамм *Brenneria populi*) – грамотрицательные бациллы, которые образуют бежевую колонию круглой формы.

При определении биохимической активности установлено, что большинство бактерий успешно использовали сахара, за исключением сорбита. Способность использовать лактозу и маннит была особенно неустойчивой. Самый широкий спектр углеводов был ферментирован штаммами, принадлежащими к роду *Brenneria*. В изоляте 5 (штамм *Brenneria salicis*) наблюдались пузырьки воздуха, что указывает на их способность расти в анаэробных условиях.

Заключение

По результатам исследования дана морфологическая и биохимическая характеристика штаммов бактерий, выделенных из древесины тополя:

лавролистного – 4 штамма бактерий видов *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteuri*, *Brenneria salicis*;

душистого – 2 штамма бактерий видов *Bacillus safensis*, *Brenneria populi*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Благова Д.К., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М. Выделение и характеристика бактериальных эндофитов моркови (*Daucus carota* L. VAR. SATIVUS) // Вестн. ОГУ. 2014. № 13(174). С. 10–12.
2. Лыжин Д.Н. Перспективы развития биоэкономики в условиях глобализации // Проблемы национальной стратегии. 2014. № 2(23). С. 79–94.
3. Максимов И.В., Абизильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 4. С. 373–385.
4. Шеховцова Н.В., Маракаев О.А., Первушина К.А., Холмогоров С.В., Цаплева К.Г. Образование ауксинов эндофитными бактериями подземных органов *Dactylorhiza maculata* (L.) SOO (ORCHIDACEAE) // Вестн. ОГУ. 2011. № 12(131). С. 366–368.
5. Щербаков А.В., Брагина А.В., Кузьмина Е.Ю., Берг К., Мунтян А.Н., Макарова Н.М., Мальфанова Н.В., Кардинале М., Берг Г., Чеботарь В.К., Тихонович И.А. Эндофитные бактерии сфагновых мхов как перспективные объекты сельскохозяйственной микробиологии // Микробиология. 2013. Т. 82, № 3. С. 312–322.
6. Barac T., Weyens N., Oeyen L., Taghavi S., van der Lelie D., Dubin D., Spliet M., Vangronsveld J. Field Note: Hydraulic Containment of a BTEX Plume Using Poplar Trees // International Journal of Phytoremediation. 2009. Vol. 11, iss. 5. Pp. 416–424.
7. Khan Z., Guelich G., Phan H., Redman R., Doty S. Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses // International Scholarly Research Network. ISRN Agronomy. 2012. Vol. 2012. 11 p. DOI: 10.5402/2012/890280
8. Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R.B. Endophytic Bacterial Diversity in Poplar Trees Growing on a BTEX-Contaminated Site: the Characterization of Isolates with Potential to Enhance Phytoremediation // Systematic and Applied Microbiology. 2006. Vol. 29, iss. 7. Pp. 539–556.
9. Posada F., Vega F.E. Establishment of the Fungal Entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an Endophyte in Cocoa Seedlings (*Theobroma cacao*) // Mycologia. 2005. Vol. 97, iss. 6. Pp. 1195–1200. DOI: 10.3852/mycologia.97.6.1195
10. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. Natural Products from Endophytic Microorganisms // Journal of Natural Products. 2004. Vol. 67, iss. 2. Pp. 257–268. DOI: 10.1021/np030397
11. Taghavi S., Garafola C., Monchy S., Newman L., Hoffman A., Weyens N., Barac T., Vangronsveld J., van der Lelie D. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees // Applied and Environmental Microbiology. 2009. Vol. 75, iss. 3. Pp. 748–757.
12. Ulrich K., Ulrich A., Ewald D. Diversity of Endophytic Bacterial Communities in Poplar Grown Under Field Conditions // FEMS Microbiology Ecology. 2008. Vol. 63, iss. 2. Pp. 169–180.
13. van der Lelie D., Taghavi S., Monchy S., Schwender J., Miller L., Ferrieri R., Rogers A., Wu X., Zhu W., Weyens N., Vangronsveld J., Newman L. Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony // Plant Science. 2009. Vol. 28, iss. 5. Pp. 346–358.

Поступила 03.05.18

UDC 579.64:633.878.32

DOI: 10.17238/issn0536-1036.2018.4.161

Bacterial Endophytes of Poplar*A.S. Aksenov*¹, Candidate of Engineering Sciences, Associate Professor*N.A. Kuz'mina*², Research Assistant¹Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Naberezhnaya Severnoy Dviny, 17, Arkhangelsk, 163002, Russian Federation; e-mail: a.s.aksenov@narfu.ru²Institute of Biogeography and Genetic Resources, N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Russian Academy of Sciences, Naberezhnaya Severnoy Dviny, 23, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation

Biotechnologies provide an opportunity to solve global problems of sustainable development of economic activity. The study of biodiversity of plant endophytic bacteria allows creating new effective biologics for adaptive plant growing. The goal of research is to identify endophyte poplar bacteria in the North (Arkhangelsk). Samples were selected at the beginning of October in the crowned trees of laurel-leafed poplar and fragrant poplar, which had no external signs of pathology and stem rot. The studies were based on the characteristics of isolates obtained from the internal parts of the central wood of poplar tree stems after surface sterilization. Sawdust was examined by the fouling method. Meat-peptone agar was used as the nutrient medium. To determine the biochemical activity of pure bacterial cultures, Hiss's differential diagnostic media were used, including maltose, glucose, sucrose, sorbitol, mannitol, and lactose. For bacterial isolates, identification was carried out by sequencing fragments of the 16S rDNA gene and comparing the resulting nucleotide sequences with those homologous from the NCBI's GenBank database. When the sawdust was sowed in the nutrient medium, fouling with bacterial mass was noted. The sawdust of laurel-leafed poplar overgrew more intensively in comparison with fragrant poplar. Four strains of bacteria (*Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Brenneria salicis*) were isolated from the laurel-leafed poplar wood, and 2 strains were isolated from fragrant poplar (*Bacillus safensis*, *Brenneria populi*). The article presents the morphological and biochemical characteristics of bacteria. Most bacteria successfully use the carbon components of the Hiss' media, with the exception of sorbitol. The ability to metabolize lactose and mannitol is particularly unstable. The widest range of carbohydrates is fermented by strains belonging to the genus *Brenneria*.

Keywords: bacterial endophyte, laurel-leafed poplar, fragrant poplar, wood.

REFERENCES

1. Blagova D.K., Sarvarova E.R., Khayrullin R.M. Vydelenie i kharakteristika bakterial'nykh endofitov morkovi (*Daucus carota* L. VAR. SATIVUS) [Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes from Carrots (*Daucus carota* L. VAR. SATIVUS)]. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta* [Vestnik of the Orenburg State University], 2014, no. 13(174), pp. 10–12.
2. Lyzhin D.N. Perspektivy razvitiya bioekonomiki v usloviyakh globalizatsii [Prospects of Bioeconomic Development in the Context of Globalization]. *Problemy natsional'noy strategii* [National Strategy Issues], 2014, no. 2(23), pp. 79–94.

For citation: Aksenov A.S., Kuz'mina N.A. Bacterial Endophytes of Poplar. *Lesnoy zhurnal* [Forestry journal], 2018, no. 4, pp. 161–166. DOI: 10.17238/issn0536-1036.2018.4.161

3. Maksimov I.V., Abizgil'dina R.R., Pusenkova L.I. Stimuliruyushchie rost rasteniy mikroorganizmy kak al'ternativa khimicheskim sredstvam zashchity ot patogenov (obzor) [Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Alternative to Chemical Crop Protectors from Pathogens (Review)]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], 2011, vol. 47, no. 4, pp. 373–385.
4. Shekhovtsova N.V., Marakaev O.A., Pervushina K.A., Kholmogorov S.V., Tsaplyaeva K.G. Obrazovanie auksinov endofitnymi bakteriyami podzemnykh organov *Dactylorhiza maculata* (L.) SOO (ORCHIDACEAE) [Auxine Production by Endophytic Bacteria from Underground Organs of *Dactylorhiza maculata* (L.) SOO (ORCHIDACEAE)]. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta* [Vestnik of the Orenburg State University], 2011, no. 12(131), pp. 366–368.
5. Shcherbakov A.V., Bragina A.V., Kuz'mina E.Yu., Berg K., Muntyan A.N., Makarova N.M., Mal'fanova N.V., Kardinale M., Berg G., Chebotar' V.K., Tikhonovich I.A. Endofitnye bakterii sfagnovykh mkhov kak perspektivnye ob'ekty sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii [Endophytic Bacteria of Sphagnum Mosses as Promising Objects of Agricultural Microbiology]. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 2013, vol. 82, no. 3, pp. 312–322.
6. Barac T., Weyens N., Oeyen L., Taghavi S., van der Lelie D., Dubin D., Spliet M., Vangronsveld J. Field Note: Hydraulic Containment of a BTEX Plume Using Poplar Trees. *International Journal of Phytoremediation*, 2009, vol. 11, iss. 5, pp. 416–424.
7. Khan Z., Guelich G., Phan H., Redman R., Doty S. Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses. *International Scholarly Research Network. ISRN Agronomy*, 2012, vol. 2012, 11 p. doi: 10.5402/2012/890280
8. Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R.B. Endophytic Bacterial Diversity in Poplar Trees Growing on a BTEX-Contaminated Site: the Characterization of Isolates with Potential to Enhance Phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, vol. 29, iss. 7, pp. 539–556.
9. Posada F., Vega F.E. Establishment of the Fungal Entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an Endophyte in Cocoa Seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, 2005, vol. 97, iss. 6, pp. 1195–1200. doi: 10.3852/mycologia.97.6.1195
10. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 2004, vol. 67, iss. 2, pp. 257–268. doi: 10.1021/np030397.
11. Taghavi S., Garafola C., Monchy S., Newman L., Hoffman A., Weyens N., Barac T., Vangronsveld J., van der Lelie D. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, vol. 75, iss. 3, pp. 748–757.
12. Ulrich K., Ulrich A., Ewald D. Diversity of Endophytic Bacterial Communities in Poplar Grown Under Field Conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, vol. 63, iss. 2, pp. 169–180.
13. van der Lelie D., Taghavi S., Monchy S., Schwender J., Miller L., Ferrieri R., Rogers A., Wu X., Zhu W., Weyens N., Vangronsveld J., Newman L. Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. *Plant Science*, 2009, vol. 28, iss. 5, pp. 346–358.

Received on May 03, 2018