

<sup>1</sup>И.С. БРОВКО, <sup>1</sup>Л.В. ТИТОВА, <sup>1</sup>Г.О. ИУТИНСКАЯ, <sup>2</sup>М.В. СУХАЧЕВА,  
<sup>3</sup>И.К. КРАВЧЕНКО

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАНУ  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д03680

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Центр «Биоинженерия» РАН  
пр. 60-летия Октября, д. 7, корпус 1, Москва, 117312, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт микробиологии имени  
С.Н. Виноградского РАН

пр. 60-летия Октября, д. 7, корпус 2, Москва, 117312, Россия

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОФИТНЫХ НЕРИЗОБИАЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ КЛУБЕНЬКОВ СОИ**

Из клубеньков сои трех генотипов (сортов Черемош, Сузирья, и глифосат-толерантной линии 40-3-2) выделены эндофитные бактерии, не относящиеся к ризобиям. По результатам сиквенс-анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК изоляты были идентифицированы, как представители родов *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*. Установлено, что два изолята, филогенетически близкие к *Paenibacillus* и *Acinetobacter*, обладают высокой азотфиксирующей (ацетилен-редуктазной) активностью.

*Ключевые слова:* соево-ризобияльный симбиоз, эндофитные бактерии клубеньков, таксономия, азотфиксация

Среди микроорганизмов, тесно контактирующих с растениями, особое место занимают эндофиты, колонизирующие растительные ткани. Они защищены от неблагоприятных факторов внешней среды и микробной конкуренции за растение, а также, обладая определенной компетентностью к растению-хозяину, помогают ему приспособиться к стрессовым факторам внешней среды.

Наряду с ризобиями, формирующими на корнях бобовых растений специфический симбиотический аппарат в виде клубеньков, известны эндофитные бактерии, изолированные из клубеньков и других тканей бобовых (люцерны, клевера, гороха и сои), относящиеся к таким родам микроорганизмов: *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* и *Sphingomonas* [6].

Исследования последних лет показали, что бактерии-эндофиты бобовых являются широко распространенными компонентами симбиотических сообществ и способны влиять на формирование бобово-ризобияльного симбиоза, стимулировать рост и продуктивность растений, а также обеспечивать их защиту от патогенов [3, 6]. Такими свойствами обладают как отдельные штаммы, так и ассоциации бактерий, населяющие корневые клубеньки и другие органы растений [6].

Не исключено, что совместное действие эндофитных микроорганизмов с клубеньковыми бактериями может в большей мере повышать экологическую пластичность микробно-растительных систем, чем моноинкуляция.

Взаимоотношения эндофитных бактерий с бобово-ризобияльной симбиотической системой практически не изучены. Выяснение фундаментальных вопросов межпопуляционных и микробно-растительных взаимоотношений позволит установить механизмы формирования высокоэффективных комбинаций макро- и микросимбионтов для повышения продуктивности культурных растений.

Целью исследований было выделить из клубеньков сои эндофитные неризобияльные бактерии, провести их молекулярный анализ и исследовать азотфиксирующую активность.

### **Материал и методы исследований**

Клубеньки сои (*Glycine max* (L.) Merr.) сортов Черемош, Сузирья и глифосат-толерантной линии 40-3-2 отбирали в фазу бутонизации-начала цветения (период активной азотфиксации), обрабатывали дезинфицирующим средством Микробак Форте («Боде ХемигмбХ и Ко»,  
52 ISSN 2078-2357. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол., 2014, № 3 (60)

Германия) и многократно отмывали стерильной водой. Из поверхностно стерилизованных клубеньков выделяли эндофитные бактерии, выращивая их на агаризованной маннитно-дрожжевой среде при температуре 28°C в течение 2 суток. Для определения таксономической принадлежности быстрорастущих эндофитных изолятов проводили их молекулярный анализ. ДНК получали с помощью модифицированного щелочного метода Бирнбойма-Доли и Wizard-технологии фирмы Promega (США) [1]. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК выделенных изолятов проводили с использованием универсальных праймеров 27F и 1492R [5] на ДНК-амплификаторе Gradient MasterCycler (Eppendorf, Германия). Очищенные по технологии Wizard (“Promega”, США) ПЦР-фрагменты секвенировали с теми же праймерами, что и для ПЦР-анализа, с использованием набора реактивов BigDye v.3.0 согласно рекомендации производителя на автоматическом секвенаторе ABI-PRISM 3730-Avant Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США). Редактирование последовательностей проводили с помощью программного пакета BioEdit. Первичный сравнительный анализ последовательностей, полученных *de novo*, с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, проводили с использованием сервера BLAST на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> [2].

Азотфиксирующую активность эндофитных штаммов сои определяли в жидкой культуре ацетилен-редуктазным методом [2] на среде Эшби.

### Результаты исследований и их обсуждение

С помощью молекулярного анализа изучены шесть характерных быстрорастущих изолятов, выделенных из клубеньков сои разных генотипов: из клубеньков сои сорта Черемош – изоляты 1 и 2, трансгенной сои – изоляты 3 и 4, сои сорта Сузирья – изоляты 5 и 6. По результатам сиквенс-анализа последовательности амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК изоляты 1 и 6 были идентифицированы как *Paenibacillus polymyxa* и *Pseudomonas brassicacearum* с вероятностью сходства 100% (табл. 1). При молекулярной идентификации изолята 2 с меньшей вероятностью (80% сходства) установлено, что выделенный изолят наиболее близок к представителям рода *Ochrobactrum*. Изоляты 3 и 4 по морфологии колоний и клеток были идентичны изоляту 1 и проявили сходство последовательности фрагмента гена 16S рРНК с микроорганизмами рода *Paenibacillus* на уровне 80%. Изолят 5 оказался наиболее близким к представителям рода *Acinetobacter* (80% сходства).

Таблица 1

Результаты сиквенс-анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК эндофитных бактерий, изолированных из клубеньков сои.

| Изолят | Ближайший известный организм (номер в GenBank)                                    | Сходство нуклеотидных последовательностей, % |
|--------|---|--|
| 1      | <i>Paenibacillus polymyxa</i> E681 (CP000154.1)                                   | 100  |
|        | <i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2 (CP002213.1)                                    | 100  |
| 6      | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subs. <i>brassicacearum</i> NFM421 (NR074834.1) | 100  |
|        | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> MA250 (DQ886486.1)                              | 100  |

При исследовании нитрогеназной активности эндофитных бактерий из клубеньков сои установлено, что среди шести изученных изолятов такую активность на жидкой среде Эшби проявили только изоляты 4 и 5.

Таблица 2

Азотфиксирующая активность эталонного штамма азотобактера и изолированных из клубеньков сои неризобияльных бактерий.

| Вариант                                   | Активность азотфиксации, нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /мл.кл. Ч 2 часа |
|---|---|
| <i>Azotobacter chroococcum</i> УКМ В-6003 | 110   |
| Изолят 4                                  | 192   |
| Изолят 5                                  | 210   |

Активність даних ізолятів перевищала активність еталонного штамма *Azotobacter chroococcum* УКМ В-6003 в 1,7 і 1,9 рази відповідно (табл. 2), що дозволяє зробити припущення про їх участь в забезпеченні рослин сої зв'язаним азотом.

### Висновки

Из клубеньков сои разных генотипов выделены эндофитные неризобийные бактерии, филогенетически близкие к представителям родов *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*. Два изолята принадлежали к видам *Paenibacillus polymyxa* и *Pseudomonas brassicacearum*. Изоляты 4 и 5, согласно молекулярному анализу родственные *Paenibacillus* и *Acinetobacter*, проявляли азотфиксирующую активность, почти в 2 раза превосходящую показатель эталонного штамма азотобактера.

1. *Выделение ДНК из различных пищевых продуктов с помощью модифицированного щелочного метода* / [Булыгина Е.С., Колганова Т.В., Сухачева М.В. и др.] // Биотехнология. — 2009, № 2. — С. 83—90.
2. Режим доступу : URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. — [Електронний ресурс]. — Назва з екрана.
3. *Шавалеева Д.В.* Ростстимулирующая и антагонистическая активность эндофитов, выделенных из разных тканей гороха / Д.В. Шавалеева // Экология и научно-технический прогресс: Вторая Всероссийская конференция с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов. Пермь, 2009. — С. 85—86.
4. *Hardy R.W. F.* Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation / Hardy R.W. F., Burns R.C., Holsten R.D // Soil. Biol. Biochem. — 1973. — 5, № 1. — P. 41—83.
5. *Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematic. Wiley, New York, 1991. — P.115—175.
6. *Microbes for Legume Improvement* / Khan M.S., Zaidi A., Musarat J. (Eds.). Wien: Springer-Verlag, 2010. — 554 p.

*I.S. Brovko, L.V. Tytova, G.O. Iutynska M.V. Sukhacheva, I.K. Kravchenko*

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України

Федеральна державна бюджетна установа науки Центр «Біоінженерія» РАН

Федеральна державна бюджетна установа науки Інститут мікробіології імені С. М. Виноградського РАН

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ І АЗОТФІКСУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ЕНДОФІТНИХ НЕРИЗОБІАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ ІЗ БУЛЬБОЧОК СОЇ

Дослідження останніх років показали, що бактерії-ендофіти – широко розповсюджені компоненти мікробно-рослинних угруповань і здатні впливати на формування симбіотичних систем, а також на ріст і продуктивність рослин.

З бульбочок сої трьох генотипів (сортів Черемош, Сузір'я і гліфосат-толерантної лінії 40-3-2) виділені ендоситні неризобіальні бактерії. За результатами сиквенс-аналізу нуклеотидних послідовностей фрагменту гена 16S рРНК ізоляти близькі до представників родів *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*. Дослідження ацетилен-редуктазної активності виділених ендоситів у чистій культурі показало, що два ізоляти, філогенетично близькі до родів *Paenibacillus* і *Acinetobacter*, мають високу азотфіксувальну активність.

*Ключові слова: соєво-ризобіальний симбіоз, ендоситні бактерії бульбочок, таксономія, азотфіксація*

*I.S. Brovko, L.V. Tytova, G.O. Iutynska, M.V. Sukhacheva, I.K. Kravchenko*

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU, Ukraine

Federal State Institution of Science Centre "Bioengineering" RAS, Russia

Federal State Institution of Science Winogradsky Institute of Microbiology RAS, Russia

### IDENTIFICATION AND NITROGEN-FIXING ACTIVITY OF ENDOPHYTIC RHIZOBIAL BACTERIA FROM SOYA TUBERS

Recent studies showed that the endophytic bacteria are common components of microbe-plant communities and are able to influence on the symbiotic systems formation, as well as on growth and productivity of plants.

Non-rhizobial endophytic bacteria were isolated from soybean nodules of three genotypes (cultivars Cheremosh, Suzirya and glyphosate-tolerant line 40-3-2). According to the results of sequence-

analysis of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene fragment isolates are close to the representatives of the *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*. Study of the endophytic bacteria acetylene-reductase activity in pure culture showed that two isolates, phylogenetically close to the *Paenibacillus* and *Acinetobacter*, are able to fix the atmospheric nitrogen. Their nitrogen-fixing activity was larger than the *Azotobacter* reference strain rate.

*Keywords: soybean-rhizobial symbiosis, endophytic bacteria of nodules, taxonomy, nitrogen fixation*

Рекомендує до друку

Надійшла 10.04.2014

В.П. Патика

УДК 579.266.2:574.38

А.А. БУНАС, Я.В. ЧАБАНЮК, О.М. ДМИТРУК

Інститут агроекології і природокористування НААН України  
вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143

## **АЗОТФІКСУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІЗОЛЯТІВ РИЗОСФЕРИ РОСЛИН ЗАЛЕЖНО ВІД ЕКОТОПУ ІЗОЛЮВАННЯ**

Вивчено вплив різних доз азотного добрива на структуру та функціонування мікробіоценозу ризосфери рослин ріпаку. Виявлено, що 78% бактеріальних ізолятів, виділених з рослин ризосфери ріпаку, можуть використовувати в своїх трофічних ланцюгах мінеральний і органічний азот або за відсутності зв'язаних форм цього елемента, фіксувати інертний молекулярний азот атмосфери з різною активністю. Встановлено, що бактеріальні ізоляти А-29 та К-11, виділені з контрольного варіанту, володіли найвищим рівнем азотфіксації.

*Ключові слова: ріпак, ризосферні мікроорганізми, нітрогеназна активність*

Високородючі ґрунти України еволюційно сформувались здебільшого під степовими фітоценозами, в яких найважливішу роль азотонакопичувачів виконують бактерії, які фіксують азот атмосфери в умовах вільного існування, або в асоціативній взаємодії з рослинами [3, 5]. Основна частина мікроорганізмів ризосфери рослин представлена гетеротрофами, що використовують у своїх трофічних шляхах кореневі виділення рослин. Таким чином, взаємодії мікроорганізмів у ризосфері рослин базуються на фоні міжвидової конкуренції за трофічні ресурси [1]. В умовах конкурентних взаємовідносин у ґрунті домінуюча роль належить популяціям, що володіють високим рівнем адаптивності до чинників середовища існування.

З метою вивчення особливостей функціонування трофічних взаємодій в угрупованні мікроорганізмів основних еколого-трофічних та таксономічних груп ризосфери рослин ріпаку залежно від доз внесеного азоту мінеральних добрив проведено скринінг та дослідження азотфіксувальних властивостей діазотрофних ізолятів, виділених із ризосферного ґрунту досліджуваних агроценозів.

### **Матеріал і методи досліджень**

Ґрунтові зразки ризосфери рослин ріпаку відбирали впродовж вегетації в тимчасовому польовому досліді Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН: у II декаді травня (фаза цвітіння); II декаді червня (фаза дозрівання врожаю); II декаді липня (після збору врожаю). Культура – ріпак озимий сорту Чорний велетень. Облікова площа ділянок – 25 м<sup>2</sup>. Розміщення варіантів дослідів – систематичне послідовне. Повторність – чотирикратна.

Схема дослідів: 1. Контроль (без внесення добрив); 2. N<sub>120</sub>P<sub>80</sub>K<sub>140</sub>; 3. N<sub>150</sub>P<sub>80</sub>K<sub>140</sub>; 4. N<sub>180</sub>P<sub>80</sub>K<sub>140</sub>.

Використовували мінеральні добрива: аміачну селітру, суперфосфат простий та калій хлористий. На дослідній ділянці перед посівом ріпаку озимого створювали фон фосфорних та калійних добрив у концентрації 80 кг/га та 140 кг/га відповідно. Підживлення рослин ріпаку