

## КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ СТЕБЛЕЙ И ЛИСТЬЕВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)

© Е.Н. Васильева<sup>1</sup>, Г.А. Ахтемова<sup>1</sup>, А.М. Афонин<sup>1</sup>, А.Ю. Борисов<sup>1</sup>, И.А. Тихонович<sup>1,2</sup>, В.А. Жуков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Афонин А.М., и др. Культивируемые эндофитные бактерии стеблей и листьев гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 169–184. <https://doi.org/10.17816/ecogen17915>.

Поступила: 28.11.2019

Одобрена: 06.04.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Эндофитные микроорганизмы населяют внутренние ткани практически каждого растения. В данной работе изучено разнообразие культивируемых эндофитных бактерий гороха *Pisum sativum*, изолированных из предварительно стерилизованных надземных частей растения — стеблей и листьев. Исследование проводилось на трех генотипах гороха: К-8274, К-3358 и коммерческом селекционном сорте Триумф. В общей сложности удалось получить 118 морфотипов культивируемых эндофитных бактерий, для 80 из которых было определено их таксономическое положение путем секвенирования диагностического фрагмента гена 16S рПНК. Доминирующими оказались представители порядков *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Кроме того, были обнаружены минорные представители порядка *Actinobacteria*. Идентифицированные представители микрофлоры гороха были проверены на способность проявлять ростостимулирующую активность, которая оценивалась по тесту на корнях кресс-салата (*Lepidium sativum* L.). По результатам теста, 8 изолятов эндофитных бактерий проявили способность стимулировать рост корневой системы кресс-салата, для одного из них — KV17, относящегося к роду *Rahnella*, — эта способность сохранилась при длительном хранении и пассировании.

✿ **Ключевые слова:** эндофитные бактерии; культивируемые бактерии; бобовые растения; горох посевной; *Pisum sativum*.

## CULTURABLE ENDOPHYTIC BACTERIA FROM STEMS AND LEAVES OF GARDEN PEA (*PISUM SATIVUM* L.)

© E.N. Vasileva<sup>1</sup>, G.A. Akhtemova<sup>1</sup>, A.M. Afonin<sup>1</sup>, A.Yu. Borisov<sup>1</sup>, I.A. Tikhonovich<sup>1,2</sup>, V.A. Zhukov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Vasileva EN, Akhtemova GA, Afonin AM., et al. Culturable endophytic bacteria from stems and leaves of garden pea (*Pisum sativum* L.).

*Ecological genetics*. 2020;18(2):169-184. <https://doi.org/10.17816/ecogen17915>.

Received: 28.11.2019

Revised: 06.04.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** Endophytic microorganisms inhabit internal tissues of most plants. However, little is known about endophytic community of the garden pea (*Pisum sativum* L.), an agriculturally important crop. **Materials and methods.** Culturable endophytic bacteria were isolated from sterilized stems and leaves of three pea genotypes: K-8274 (cv. Vendevil), K-3358 (unnamed cultivar), and cv. Triumph. The taxonomic position of isolates was determined by 16S rRNA gene sequencing. The plant growth-promoting capability of identified bacteria was tested on the roots of watercress (*Lepidium sativum* L.). **Results.** In total, out of 118 morphotypes of culturable endophytic bacteria identified, for 80 the taxonomic position was determined. *Proteobacteria* and *Firmicutes* were dominant phyla, and *Actinobacteria* were present in minority. Eight bacterial isolates demonstrated the plant growth-promoting capability, and one of them — KV17 (*Rahnella* sp.) maintained this capability after several passages and prolonged storage. **Conclusion.** The plant growth-promoting bacteria isolated from pea stems and leaves can become a component of microbiological preparations.

✿ **Keywords:** Endophytic bacteria; culturable bacteria; legumes; garden pea; *Pisum sativum*.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время очевидно, что прокариотические микроорганизмы распространены практи-

чески повсеместно, так или иначе взаимодействуя с другими обитателями биосферы. Эти взаимоотношения вызывают большой интерес со стороны

исследователей, поскольку являются предметом для изучения фундаментальных основ симбиоза, а также позволяют обнаружить новые пути практического применения такого рода отношений. Управление растительно-микробными взаимоотношениями особенно перспективно в области сельского хозяйства ввиду способности некоторых представителей микрофлоры оказывать положительное влияние на рост и развитие растений [1]. Так, клубеньковые бактерии (ризобии), вступая в симбиоз с растениями сем. Бобовые, фиксируют атмосферный азот, что приводит к улучшению азотного питания растений и, как следствие, к повышению урожайности и улучшению характеристик почвы. Грибы арбускулярной микоризы улучшают снабжение растений труднорастворимыми фосфатами и водой [2], а ризобактерии группы PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) оказывают ростостимулирующий эффект и защищают растения от последствий стрессовых факторов, как биотических, так и абиотических [3, 4]. Представителей микробиоты, населяющих внутренние ткани растений, называют эндофитными микроорганизмами.

Впервые понятие «эндофит» предложил Антон де Бари, немецкий микробиолог и ботаник, в 1866 г.; относился этот термин исключительно к локализации организма, то есть эндофитом мог считаться любой микроорганизм, населяющий внутренние ткани растения [5]. Со временем данный термин так или иначе уточнялся, появлялись новые трактовки [6]. В настоящее время все еще не существует единой концепции, давшей бы достаточно точное и емкое определение понятию «эндофит», поэтому стоит отметить, что в данной работе эндофитами называются микроорганизмы, выделенные из поверхностно стерилизованных тканей растений, не вызывающие патологических эффектов и какого-либо заметного отрицательного влияния на развитие растения [1, 7].

Согласно исследованиям, эндофитные бактерии способны улучшать рост, развитие и общее состояние растения-хозяина ввиду способности модулировать уровень растительных гормонов, синтезировать витамины, улучшать снабжение растения питательными веществами [8]. На основе этих микроорганизмов создаются высокоэффективные биопрепараты, применяемые в практике сельского хозяйства уже в наши дни [9, 10].

Интерес к таким симбиозам постоянно растет, а вместе с этим все больше внимания уделяется изучению бактериальных эндофитов различных сельскохозяйственных растений, например гороха посевного (*Pisum sativum* L.). В настоящее время ученые чаще обращаются к исследованию эндофитов корней и клубеньков гороха, а работы по биоразнообразию тканей листьев и стеблей встречаются реже [11]. Так, были изучены ассоциации эндофитных бактерий из клубеньков гороха и фасоли, и обнаружены бактерии, демонстрирующие ростостимулирующую активность [12]. В последующих исследованиях были выделены и охарактеризованы новые штаммы бактерий из родов *Serratia* и *Pseudomonas* из корней гороха [13], а также проведена работа по выделению эндофитных бактерий из клубеньков гороха и определению их биологической активности [14]. В частности, были опубликованы данные по перспективному ростостимулирующему штамму клубеньковых эндофитов (Ent16), принадлежащих к роду *Serratia*, для которого, помимо общей характеристики, был также продемонстрирован путь проникновения в эндосферу гороха [15]. Кроме того, в ряде работ описано разнообразие неризобияльных бактерий, населяющих клубеньки гороха [16, 17]. Работы по изучению биоразнообразия тканей стеблей и листьев гороха встречаются реже. Так, с помощью определения профиля жирных кислот было показано присутствие в листьях и стеблях гороха бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Pantoea* [18].

Так как горох посевной является ценной сельскохозяйственной культурой, целесообразно исследовать и, по возможности, улучшать его симбиотический потенциал, то есть отзывчивость на инокуляцию симбиотическими микроорганизмами [2, 19]. В ранее проведенных исследованиях в условиях совместной инокуляции клубеньковыми бактериями и грибами арбускулярной микоризы было показано, что различные генотипы гороха отличаются по признаку отзывчивости на инокуляцию [20, 21]. Однако способность гороха к образованию симбиозов с эндофитными микроорганизмами и вопрос об эффективности таких симбиозов (в отношении пользы для растения) изучены значительно хуже [22]. В связи с этим в настоящей работе исследовано биоразнообразие культивируемых представителей эндосферы гороха, а также

проведены тесты, выявляющие штаммы, претендующие на роль ростостимулирующих эндофитов, которые в дальнейшем могли бы быть использованы для создания на их основе микробиологических препаратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Растительный материал и постановка вегетационного эксперимента

Эксперимент проводили на базе ФГБНУ ВНИИСХМ (Пушкин, Санкт-Петербург) в летних вегетационных домиках, в которых температурные условия и освещенность определялись погодными условиями. Использовали следующие генотипы гороха посевного *P. sativum*: 1) К-8274 (сорт Vendevil, Франция) — из коллекции ФГБНУ ВИР им. Вавилова, является «отзывчивым» при взаимодействии с полезной почвенной микрофлорой (ППМ) (смесью клубеньковых бактерий и грибов арбускулярной микоризы); 2) К-3358 (формообразец из Саратовской обл.) — из коллекции ФГБНУ ВИР им. Вавилова, является «неотзывчивым» [23]; 3) селекционный сорт Триумф — из коллекции ФГБНУ ВНИИЗБК, полученный методом насыщающих скрещиваний линии К-8274 и сорта Classic (Дания) и унаследовавший признак «отзывчивости» на инокуляцию ППМ от К-8274 и безлисточковый тип стебля от сорта Classic [2, 24]. Под «отзывчивостью» понимается способность генотипа гороха к увеличению биомассы и семенной продуктивности при инокуляции ППМ. Следует отметить также, что, согласно данным трехлетних полевых экспериментов, генотип К-3358 характеризуется более высокой семенной продуктивностью и биомассой, чем К-8274 и Триумф [21].

Растения выращивали в сосудах объемом 5 л, в качестве субстрата использовали дерново-подзолистую легкосуглинистую почву (ФГБНУ ЛенНИИСХ «Белогорка», Ленинградская обл.). В каждый сосуд высаживали по 5 растений одного генотипа. Повторность опыта шестикратная, для выделения эндофитных бактерий использовали по 3 сосуда. Урожайность генотипов гороха оценивали в оставшихся трех сосудах в конце вегетационного периода. Полив производили по весу до 60 % полной влагоемкости почвы (аналогично эксперименту, описанному в работе В.А. Жуко-

ва и др. в 2017 г. [23]). Растительный материал был собран в фазу цветения растений, в момент наибольшей активности ризосферной микробиоты и формирования на корнях активных клубеньков (4 недели после посадки). Далее из полученных образцов выделяли эндофитные бактерии.

### Подготовка растительного материала

Растительный материал промывали под проточной водой, из трех отобранных случайно растений каждой линии готовили среднесмешанные образцы стеблей (3-е и 4-е междоузлия) и листьев (начиная с 3-го узла). Концы фрагментов листьев и стеблей парафинировали и проводили стерилизацию поверхности в три последовательных этапа: обработка 70 % этиловым спиртом (1 мин), затем 5 % гипохлоритом натрия ( $\text{NaClO}$ ) (5 мин) и повторная обработка 70 % спиртом (30 с). Каждый этап при этом сопровождался трехкратным промыванием в дистиллированной воде [25].

Часть образцов использовали для постановки контролей на чистоту стерилизации поверхности растений. Для выделения культивируемых эндофитных бактерий образцы растений измельчали в стерильной фарфоровой ступке до однородной массы. Далее гомогенат высевали на твердые микробиологические среды, инкубировали при температуре 28 °C в течение 3–4 сут.

### Микробиологические исследования

Все колонии бактерий описывали по морфолого-культуральным признакам, присваивали индивидуальный номер и далее проводили манипуляции по получению чистых культур.

Эндофитные бактерии выделяли и культивировали на питательных средах TSA и 1/20 TSA (Tryptone soya agar CM0131, Oxoid, Англия), а также на микробиологической среде № 79, состав (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,2;  $\text{NaCl}$  — 0,1;  $\text{CaCO}_3$  — следовые количества; маннит — 10; дрожжевой экстракт — 0,4; агар — 15.

Триптон-соевый агар (TSA) использовали для выделения гетеротрофных бактерий; разведенный TSA (1/20) использовали для выделения олиготрофных бактерий, которым достаточны низкие концентрации питательных элементов; селективную микробиологическую среду (№ 79) применяли для роста клубеньковых бактерий (ризобий).

### Молекулярно-генетические исследования

Выделение ДНК из полученных культур проводили с использованием фенол-хлороформного метода [26]. Биомассу бактерий с твердых питательных сред отмывали от слизи в буфере (0,5 М EDTA; 4 М NaCl; H<sub>2</sub>O). Осадок ресуспендировали в 567 мкл TE (pH 8), к нему добавляли 30 мкл SDS (10 %) и 3 мкл протеиназы К. При необходимости для улучшения лизиса использовали 6 мкл лизоцима (25 мг/мл). Далее смесь инкубировали при температуре 37 °С 1 ч. К раствору добавляли 110 мкл 5 М NaCl и 80 мкл СТАВ/NaCl и вновь инкубировали 10 мин при 65 °С.

К полученной смеси добавляли 0,7 объема хлороформа, перемешивали и центрифугировали 15 мин (13000 об./мин). Супернатант отбирали в отдельную пробирку, к нему добавляли равный объем фенол-хлороформной смеси (в объемном соотношении 1 : 1). Раствор перемешивали и центрифугировали в тех же условиях. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку, осаждение ДНК проводилось с использованием изопропанола (0,6 объема). Концентрация соли в растворе уже была достаточно велика, а потому ее добавление не требовалось. Раствор центрифугировали 15 мин (13000 об./мин), осадок промывали 70 % этиловым спиртом. Остатки спирта удаляли при помощи центрифужного испарителя Concentrator plus (Eppendorf, Германия). Осадок растворяли в 100 мкл TE (pH 8) в течение суток при 4 °С.

### Идентификация культивируемых эндофитных бактерий

Идентификация бактерий была проведена при помощи секвенирования диагностического фрагмента гена *16S* рРНК (V3-V9) с использованием праймеров 642F и 1451R, либо секвенирования полного гена (праймеры 27F и 1451R). Последовательности использованных праймеров приведены в Приложении 1. Для амплификации фрагмента проводилась полимеразная цепная реакция с использованием смеси ScreenMix (Evrogen, Москва, Россия) при следующих условиях: 34 цикла, денатурация 30 с при 95 °С, отжиг 45 с при 55,5 °С, элонгация 1 мин 45 с при 72 °С.

Очистку амплифицированных фрагментов проводили смесью ферментов экзонуклеазы 1 (Exo1)

и термочувствительной щелочной фосфатазы (FastAP) (Thermo Scientific, США). Для этого использовали 5 мкл продукта полимеразной цепной реакции, 1 мкл FastAP, 0,5 мкл Exo1, раствор инкубировали 15 мин при 37 °С и 15 мин при 85 °С. Очищенные продукты секвенировали на приборе ABI Prism 3500XL (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя. Полученные последовательности сравнивали с представленными в базе Nucleotide collection при помощи программы NCBI BLASTN 2.6.1 [27].

### Оценка ростостимулирующей активности выделенных штаммов

Ростостимулирующую активность бактериальных эндофитов оценивали по способности положительно влиять на рост корней тестового растения кресс-салата (*Lepidium sativum* L.). Использовали семена кресс-салата сорта Забава (Агрофирма АЭЛИТА, Россия). Два диска фильтровальной бумаги помещали в чашки Петри, смачивали дистиллированной водой (контроль) или культуральной жидкостью. Бактерии выращивали в жидкой питательной среде TSA в течение 2 сут. до получения титра бактерий 10<sup>9</sup> КОЕ. Затем готовили разведения культуральной жидкости в соотношениях 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 для достижения необходимого титра (10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> и 10<sup>6</sup> соответственно). Семена кресс-салата стерилизовали при помощи 70 % этилового спирта, после чего промывали в дистиллированной воде и выкладывали на фильтровальную бумагу по 20 семян на чашку Петри. Семена проращивались в фитотронах Vötsch Industrietechnik VB1014 (Германия) в течение 3 сут. при заданных параметрах: день/ночь — 16/8 часов, 21 °С, относительная влажность воздуха 75 %, освещенность 7–8 тыс. люкс. Через три дня измеряли длину корня каждого растения [28].

### Статистическая обработка данных ростостимуляции

Результаты, полученные при проведении теста на корнях кресс-салата, обработали при помощи программы GraphPad Prism v7.00 (GraphPad Software, США, <https://www.graphpad.com>). Статистическая значимость влияния эндофитных бактерий на рост корневой системы определялась непараметрическим критерием Данна. Этот критерий

был выбран ввиду того, что в тестах длина корней не соответствовала распределению Гаусса, а потому применение параметрических критериев было невозможно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Результаты вегетационного эксперимента

Из поверхностно стерилизованных листьев и стеблей четырехнедельных растений гороха посевного трех генотипов было выделено 118 морфотипов эндофитных бактерий (табл. 1). Наибольшее количество морфотипов эндофитных бактерий (50), было обнаружено в растениях гороха «отзывчивого» генотипа К-8274. Сопоставимое количество морфотипов бактерий (49) было выделено из растений «неотзывчивого» генотипа К-3358. Из растений коммерческого сорта гороха Триумф было выделено наименьшее число культивируемых бактериальных эндофитов. Следует отметить, что у растений всех генотипов количество морфотипов, выделенных из стеблей, было ниже, чем выделенных из листьев (прилистников). Морфотипы колоний эндофитных бактерий, выделенных из эндосферы растений, приведены на рис. 1. Стоит отметить, что колонии в основном имели круглую форму с ровными или фестончатыми краями. Цвет колоний был, как правило, неярким: чаще всего встречались колонии белого, бежевого, кремового цветов или полупрозрачные колонии. Так, штамм KV75.1 имел белые выпуклые колонии среднего размера с ровным гладким краем. Также присутствовали колонии складчатой формы и колонии, имеющие лопастной край или край неправильной формы. К редким морфотипам относились колонии, имевшие яркую окраску (желтую, оранжевую, розовую).

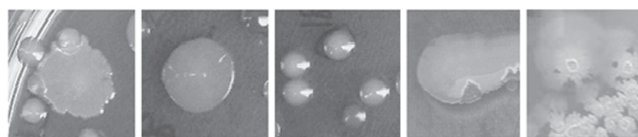


Рис. 1. Морфотипы эндофитных бактерий, изолированные из внутренних тканей стеблей и листьев гороха

В конце вегетационного периода (3 мес.) учитывали урожайность гороха посевного (сухую вегетативную массу и массу семян) (Приложение 2). Полученные значения соответствуют таковым из экспериментов других лет, проведенных в тех же условиях [23, 29].

### Результаты микробиологических исследований, молекулярно-генетическая идентификация

Все 118 изолятов эндофитных бактерий, выделенных из поверхностно стерилизованных органов растений гороха посевного, культивировали на твердых питательных средах для получения чистых культур и дальнейшей их идентификации. Часть из выделенных эндофитных бактерий оказалась не способна поддерживать рост на твердых питательных средах сразу после их первичного выделения. Другая часть утрачивала способность к росту спустя некоторое количество пассажей. По этим причинам около  $1/5$  изолятов не удалось выделить в чистые культуры. Некоторые колонии эндофитов разделились на 2 или 3 морфотипа после пассирования. В целом, из 118 морфотипов было получено 80 чистых культур эндофитных бактерий. Все чистые культуры поддерживались на чашках Петри, а также хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Идентификация чистых культур эндофитных бактерий методом секвенирования гена *16S rDNA*

Таблица 1

Количество выделенных морфотипов эндофитных бактерий с указанием соответствующих питательных сред

Генотип растения	Орган растений, из которого был выделен эндофит						Всего
	лист/прилистник			стебель			
	TSA	1/20TSA	79	TSA	1/20TSA	79	
Сорт Триумф	5	5	2	3	2	2	19
К-8274	21	17	5	4	1	2	50
К-3358	8	14	6	5	8	8	49
Всего	34	36	13	12	11	12	118

Примечание. Поскольку Триумф является безлисточковым сортом, для него были проанализированы прилистники вместо отсутствующих листьев.

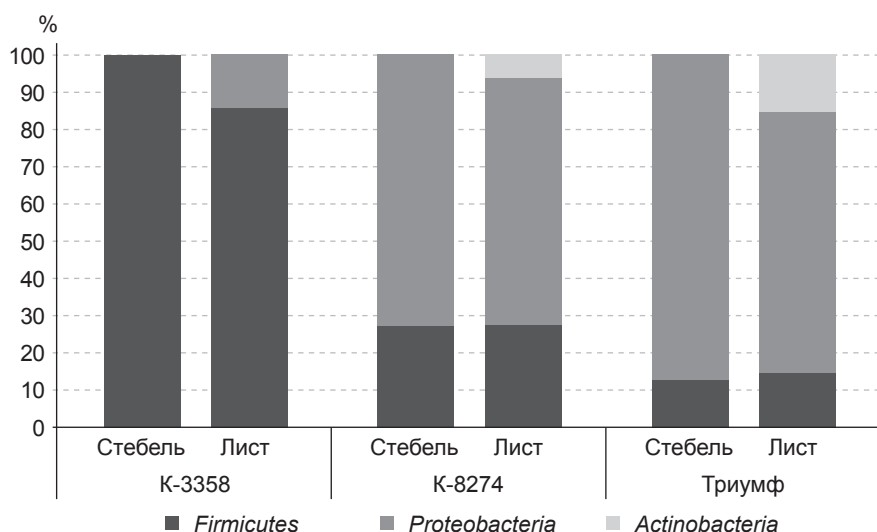


Рис. 2. Представленность фил эндифитных бактерий, изолированных из стеблей и листьев растений гороха различных генотипов (в случае растений безлисточкового сорта Триумф вместо листьев исследовали прилистники)

показала, что в растениях гороха посевного (как в листьях, так и в стеблях) присутствуют бактерии из фил *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Стебли «неотзывчивого» генотипа К-3358 в основном населяли бактерии филы *Proteobacteria* с доминированием семейств *Yersiniaceae* и *Pseudomonadaceae*. Из листьев К-3358 были выделены, в основном, бактерии, принадлежащие к филе *Firmicutes*, которая была представлена семейством *Bacillaceae* и доминировала в данном сообществе. Бактерии из филы *Proteobacteria* занимали здесь небольшую долю по отношению к грамположительным спорообразующим бактериям (рис. 2).

В стеблях и в листьях «отзывчивого» генотипа К-8274 доминировали эндифитные бактерии филы *Proteobacteria*, представленной семействами *Bradyrhizobiaceae*, *Yersiniaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Ralstoniaceae* и *Sphingomonadaceae*. Фила *Firmicutes* была второй по представленности как стеблей, так и листьев в эндифитном сообществе К-8274. Кроме того, в листьях растений К-8274 были найдены эндифитные бактерии, принадлежащие к филе *Actinobacteria* (рис. 3).

Эндифитное сообщество стеблей и прилистников гороха сорта Триумф по содержанию представителей фил сходно с генотипом К-8274: здесь так же доминирует фила *Proteobacteria* (в которой преобладающим семейством оказалось *Yersiniaceae*), на втором месте — фила *Firmicutes*. Также в при-

листниках растений сорта Триумф были выявлены бактерии филы *Actinobacteria*, обнаруженные в листьях К-8274, но не К-3358.

Рассматривая более подробно разнообразие эндифитных бактерий, можно отметить, что в листьях «неотзывчивого» генотипа К-3358 доминирующее положение в бактериальном сообществе занимают грамположительные бактерии из рода *Bacillus*, а в листьях «отзывчивого» генотипа К-8274 — бактерии из родов *Serratia* и *Bacillus*. Вместе с тем, в листьях этой линии обнаружены грамотрицательные бактерии из родов *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* и *Acinetobacter*.

В стеблях «неотзывчивого» генотипа К-3358 доминируют грамотрицательные бактерии из родов *Rahnella* и *Pseudomonas* и в минорном положении находятся бактерии из родов *Enterobacter* и *Luteibacter*.

В стеблях «отзывчивого» генотипа К-8274 обнаружены представители шести родов грамотрицательных бактерий: *Rahnella*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum*, *Bradyrhizobium*, и два различных штамма грамположительных бактерий из рода *Bacillus*.

В органах растений гороха коммерческого сорта Триумф наблюдается равномерное распределение в бактериальном сообществе по разнообразию родов. В стеблях присутствуют бактерии из родов *Rahnella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* и *Staphylococcus*. В прилистниках

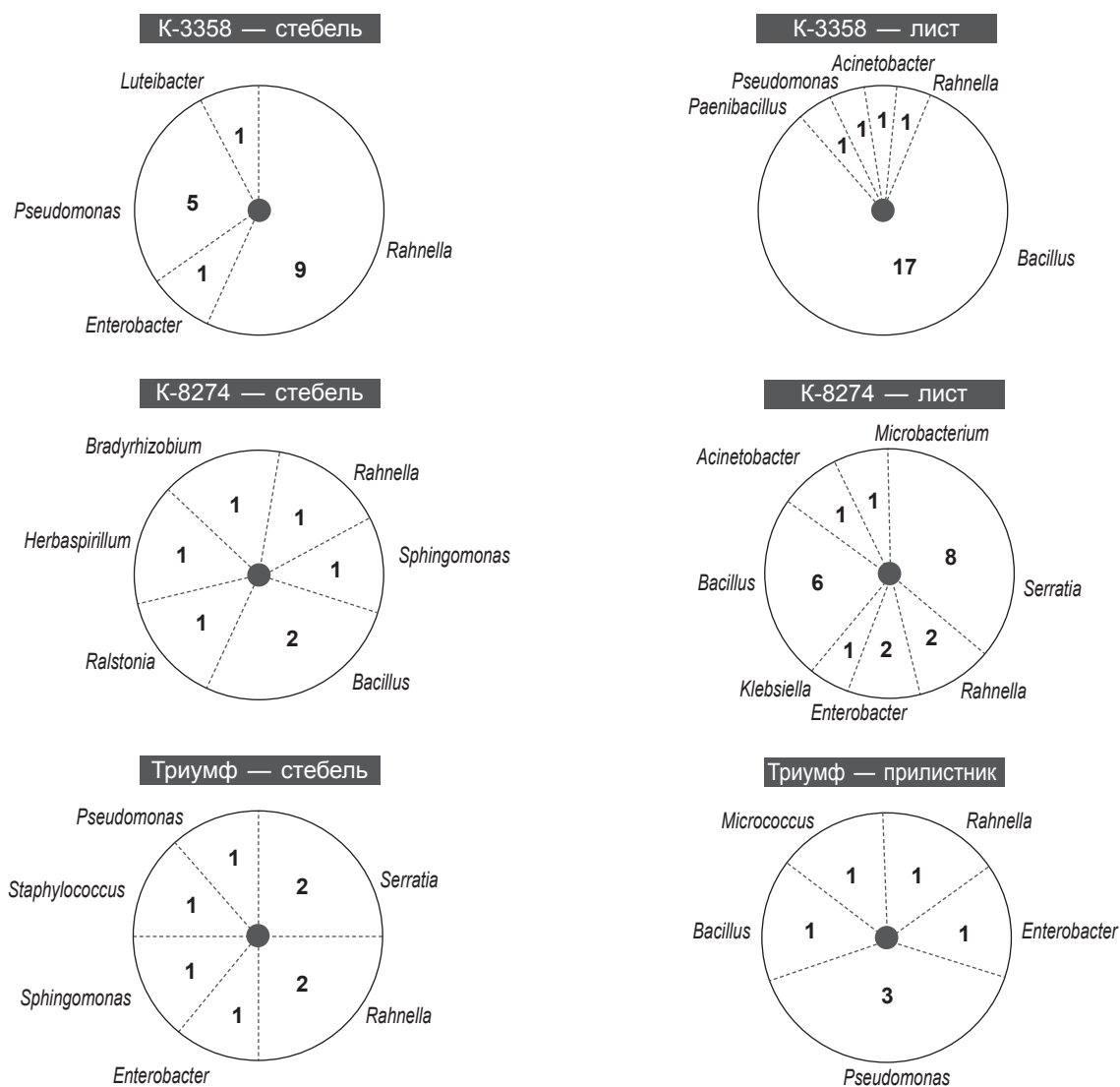


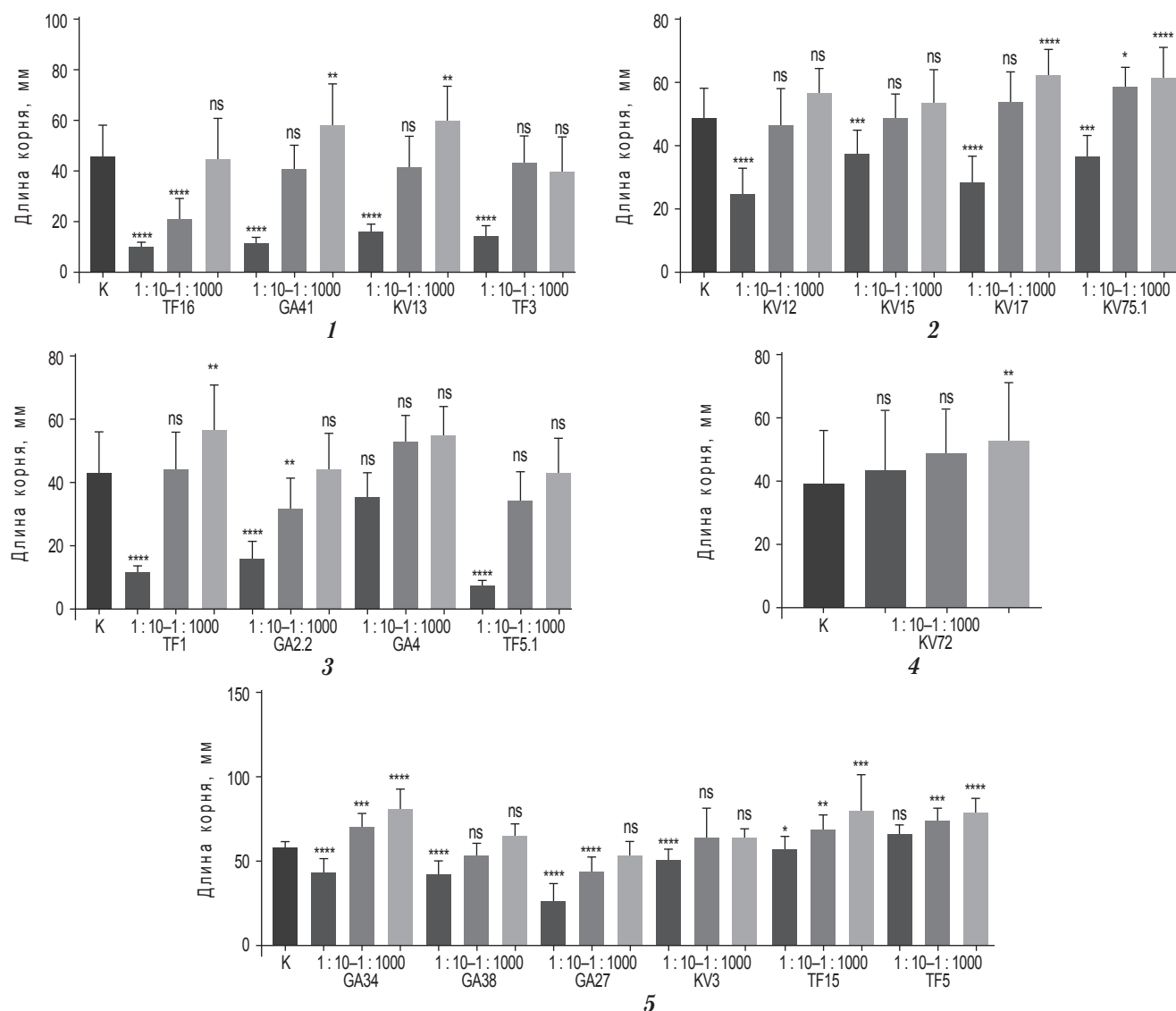
Рис. 3. Представители эндофитного сообщества растений гороха. На диаграммах показано количество представителей различных родов бактерий

гороха сорта Триумф обнаружены бактерии из родов *Bacillus*, *Rahnella*, *Enterobacter*, *Micrococcus* и *Pseudomonas* (доминирующая группа).

#### Результаты теста на ростостимулирующую активность изолированных из гороха штаммов с использованием кресс-салата в качестве тест-растения

Из 80 изолятов эндофитных бактерий, выделенных из гороха трех генотипов, были выбраны 36 штаммов для определения их ростостимулирующей активности. В эксперименте по оценке ростостимулирующей активности эндофитных бактерий было установлено, что большинство бактерий в используемых концентрациях не оказывали стимулирующего воздействия на рост корней кресс-

салата. Для 28 штаммов наблюдалась следующая закономерность: суспензия бактерий в культуральной жидкости при разведении 1 : 10, как правило, оказывала ингибирующее воздействие на рост корней, по сравнению с контролем (дистиллированная вода). При разведении 1 : 100 влияние на рост корней было незначительным. Суспензия клеток некоторых бактерий в культуральной жидкости в разведении 1 : 1000 стимулировала рост корней кресс-салата (рис. 4, Приложение 3). Штаммы, оказавшие наиболее выраженные ростостимулирующие свойства, представлены с указанием их родовой принадлежности в табл. 2. Всего 8 штаммов из 36 протестированных оказались способны стимулировать рост корневой системы кресс-салата.



**Рис. 4.** Длина корня кресс-салата при инокуляции эндофитными бактериями, выделенными из стеблей и листьев (прилистников). Номерами 1–5 обозначены эксперименты, для каждого из которых был поставлен отдельный контроль. Достоверность отличия длины корней растений от контроля: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns — отсутствие достоверных различий

Таблица 2

**Бактериальные эндофиты, проявившие ростостимулирующие свойства**

Генотип растения	Орган растения	Порядковый №	Штамм	Таксономическая принадлежность	Прирост средней длины корня, %
Сорт Триумф	Стебель	1	TF1	<i>Serratia</i> sp.	33,63
		2	TF5	<i>Rahnella</i> sp.	27,79
	Прилистник	3	TF15	<i>Enterobacter</i> sp.	30,27
К-3358	Стебель	4	KV13	<i>Rahnella</i> sp.	47,55
		5	KV17	<i>Rahnella</i> sp.	28,61
	Лист	6	KV72	<i>Bacillus</i> sp.	36,73
		7	KV75.1	<i>Acinetobacter</i> sp.	30,48
К-8274	Лист	8	GA34	<i>Serratia</i> sp.	38,18

Как видно из табл. 2, все три исследованных генотипа гороха содержали в эндосфере бактерии, проявляющие способность стимулировать рост и развитие растений. Повторный тест на ростостимуляцию, проведенный для штамма KV17, показал, что данный штамм сохраняет свои свойства после длительного хранения и пассирования (рис. 5). Прирост средней длины корня относительно контроля составил 23,53 %.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были исследованы эндофитные сообщества листьев (прилистников) и стеблей гороха трех различных генотипов: К-8274, К-3358, а также селекционного сорта Триумф. Ранее, в полевых испытаниях, генотип К-3358 показал более высокую семенную продуктивность и биомассу по сравнению с К-8274 и Триумфом [21]. В настоящей работе в вегетационном эксперименте К-3358 сформировал на 37,83 % большую биомассу, чем К-8274 и на 26,46 %, чем Триумф. Также его семенная продуктивность превосходила эти генотипы на 39,07 и 22,81 % соответственно.

Из растительного материала удалось выделить 118 морфотипов культивируемых эндофитных бактерий. Стоит заметить, что примерно сходное количество изолятов (99) было получено в работе с растениями фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) [30]. Установлено, что у гороха всех трех генотипов количество выявленных эндофитных бактерий в листьях выше по сравнению с числом бактерий, обитающих в стеблях (табл. 1). Возможно, листья являются более благоприятной нишей для жизни бактерий, либо проникновение в листья (через устьица) более легко осуществимо, чем в стебли (для чего необходимо поранение стебля или корня, либо нарушение внешних тканей корня в ходе образования боковых корней [15, 31]). При этом эндофитное сообщество листьев растений гороха генотипа К-8274 оказалось самым разнообразным по сравнению с другими генотипам, а у наиболее продуктивного К-3358, напротив, наибольшее разнообразие было характерно для стеблевых эндофитов. Коммерческий сорт гороха посевного Триумф, в свою очередь, содержал небольшое количество эндофитных бактерий в прилистниках и стеблях.

Наибольшее разнообразие эндофитов стебля у генотипа К-3358, а также наличие в сте-

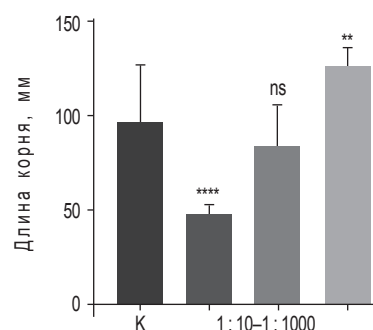


Рис. 5. Результаты повторного теста KV17 на ростостимулирующую активность. Достоверность отличия длины корней растений от контроля: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns — отсутствие достоверных различий

блях и листьях активных и стабильных штаммов ростостимуляторов из родов *Rahnella* (KV17) и *Acinetobacter* (KV75.1) может влиять на увеличение вегетативной массы растений (как видно по результатам оценки урожайности, Приложение 2) и, соответственно, с наибольшим размером растения. Возможно, ростостимулирующие эндофитные бактерии способствуют увеличению вегетативной массы растения и его урожайности, однако для подтверждения этого тезиса требуются дальнейшие исследования.

Ранее генотипы гороха К-3358, К-8274 и Триумф были охарактеризованы в отношении признака «эффективность взаимодействия с полезной почвенной микрофлорой» (ЭВППМ) [21]. Под ЭВППМ, также называемой «отзывчивостью», понимается способность генотипа гороха к увеличению биомассы и семенной продуктивности при инокуляции ППМ. Показано, что генотип К-3358, характеризующийся большей биомассой и семенной продуктивностью, является при этом «неотзывчивым», в отличие от К-8274 и его потомка Триумфа (унаследовавшего признак «отзывчивости» на инокуляцию ППМ от К-8274) [21]. Учитывая, что генотип К-3358, в котором обнаружено наибольшее количество эндофитов, проявивших ростостимулирующие свойства, является «неотзывчивым» на инокуляцию клубеньковыми бактериями и грибами арбускулярной микоризы (в отличие от К-8274 и сорта Триумф) [29], можно предполагать существование различных механизмов позитивного воздействия на урожай стеблевых эндофитов (потенциальных ростостимуляторов), клубеньковых бактерий и грибов арбускулярной микоризы.

Молекулярно-генетическая идентификация эндофитных штаммов позволила определить состав эндофитного сообщества в надземных частях у разных генотипов гороха. Так, из всех образцов были выделены культивируемые эндофитные бактерии, относящиеся к филе *Proteobacteria*, и во всех изученных тканях, кроме стеблей К-3358, присутствовали представители филы *Firmicutes*. В листьях генотипов К-8274 и Триумф были обнаружены представители филы *Acinetobacter*. По богатству родов и разнообразию семейств выделялся «отзывчивый» генотип К-8274, в эндосфере стеблей которого были выявлены 6, а в листьях 5 представителей различных семейств бактерий. В целом, бактериальное сообщество эндофитов, выделенных из растений сорта Триумф, сходно с сообществом эндофитов генотипа К-8274. Это может быть объяснено тем, что генотип К-8274 является родительской формой для коммерческого сорта Триумф, однако, вопрос влияния генотипа растения на состав эндофитного сообщества должен стать предметом более масштабного генетического анализа.

Согласно многочисленным литературным данным (см. обзор Е.Н. Васильевой и коллег [11]), многие представители эндофитной микробиоты способны оказывать стимулирующее влияние на рост и развитие растения. Полученные в настоящем исследовании штаммы культивируемых эндофитов были протестированы на присутствие ростостимулирующей активности в модельной системе (удлинение корней кресс-салата). В результате чего удалось выявить 8 потенциальных штаммов бактерий, для одного из которых (KV17, отнесенного к роду *Rahnella*) было подтверждено сохранение ростостимулирующей активности после длительного хранения и пассирования. Этот и подобные ему штаммы могут в дальнейшем послужить основой для создания микробного препарата после проведения дополнительных тестов на других сельскохозяйственных культурах. Так, на основе штамма *Rahnella aquatilis* БИМ В-704Д, штамма *Pseudomonas putida* БИМ В-702Д, а также гриба арбускулярной микоризы из рода *Glomus* в 2015 г. был создан препарат «Бактопин», используемый для предпосевной обработки семян, а также вегетирующих растений. Препарат показал улучшение приживаемости сеянцев,

увеличение их высоты, а также способствовал раннему началу фаз бутонизации и цветения [32]. Сообщалось и о других штаммах рода *Rahnella*, демонстрирующих ценные для практики сельского хозяйства свойства: синтез ауксинов [33, 34] и сидерофоров, а также способность переводить азот и фосфор в доступную для растений форму [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время растения, вступающие в симбиоз с ППМ, рассматриваются как надорганизменные системы, в которых геном растения дополняется генами микроорганизмов («принцип дополнительности геномов») [35]. Таким образом, эндофитное сообщество, формируемое внутри тканей растения, может придавать растению дополнительные свойства, что приводит к повышению адаптивного потенциала растительно-микробной системы как «холобионта». Для выяснения деталей взаимовыгодного влияния микроорганизмов на растения необходимо использование подходов метагеномики для максимально полной характеристики микробных сообществ, населяющих ткани растения. Секвенирование геномов штаммов эндофитных бактерий, проявляющих ростостимулирующие свойства, также позволит выявить их ключевые особенности и таким образом продвинуться в понимании механизмов полезного влияния эндофитных бактерий на растения.

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является важной сельскохозяйственной культурой в Российской Федерации и в мире (FAOSTAT, 2018), а также ценным модельным объектом для изучения различных растительно-микробных симбиозов. Применение микробиологических препаратов способно стабилизировать урожай гороха, в том числе снизить потери, связанные с воздействием стрессовых факторов. Отобранные в настоящем исследовании ростостимулирующие бактерии могут стать одним из компонентов микробиологических препаратов.

## Благодарности

Работа Е.Н. Васильевой и В.А. Жукова по выделению эндофитных бактерий из растений сорта Триумф и их молекулярно-генетической

идентификации выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00194. Работа Г.А. Ахтемовой, А.М. Афонина, А.Ю. Борисова и И.А. Тихоновича по оценке ростостимулирующей активности бактерий осуществлена при поддержке гранта РНФ № 17-76-30016. Авторы статьи выражают благодарность Людмиле Евгеньевне Дворяниновой и Наталье Николаевне Степановой (Новоселовой) за помощь в проделанной работе.

## ЛИТЕРАТУРА

- Partida-Martínez LP, Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front Plant Sci.* 2011;2:100. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>.
- Штарк О.Ю., Жуков В.А., Сулима А.С., и др. Перспективы использования многокомпонентных симбиотических систем бобовых // Экологическая генетика. — 2015. — Т. 13. — № 1. — С. 33–46. [Shtark OYu, Zhukov VA, Sulima AS, et al. Prospects for the use of multi-component symbiotic systems of the legumes. *Ecological genetics.* 2015;13(1):33-46. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen13133-46>.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57:233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.
- Цавкелова Е.Л., Климова С.Ю., Чердынцева Т.Л., Нетрусов Л.И. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42. — № 2. — С. 133–143. [Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TL, Netrusov LI. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2006; 42(2): 133-143. (In Russ.)]
- Wilson D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos.* 1995;73(2):274-276. <https://doi.org/10.2307/3545919>.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 2008;16(10):463-471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem.* 2010;42(5): 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda Mdel C, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res.* 2016;183:92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.
- Чеботарь В.К., Макарова Н.М., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 продуцента биопрепаратов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45. — № 4. — С. 465–469. [Chebotar VK, Makarova NM, Shaposhnikov AI, Kravchenko LV. Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2009;45(4):465-469. (In Russ.)]
- Чеботарь В.К., Заплаткин А.Н., Щербakov А.В. и др. Микробные препараты на основе эндофитных и ризобактерий, которые перспективны для повышения продуктивности и эффективности использования минеральных удобрений у ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и овощных культур // Сельскохозяйственная биология. — 2016. — Т. 51. — № 3. — С. 335–342. [Chebotar VK, Zaplatkin AN, Shcherbakov AV, et al. Microbial preparations on the basis of endophytic and rhizobacteria to increase the productivity in vegetable crops and spring barley (*Hordeum vulgare* L.), and the mineral fertilizer use efficiency. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya.* 2016;51(3):335-342. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.3.335rus>.
- Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 1. — С. 19–32. [Vasileva EN, Akhtemova GA, Zhukov VA,

- Tikhonovich IA. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture. *Ecological genetics*. 2019;17(1):19-32. (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>.
12. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., и др. Изучение бактериальных ассоциаций эндофитов клубеньков, способствующих увеличению продуктивности бобовых растений // *Агрохимия*. — 2010. — № 11. — С. 50–58. [Garipova SR, Garifullina DV, Markova OV, et al. Bacterial endophyte associations of nodules increasing the productivity of legumes. *Agrochemistry*. 2010;(11):50-58. (In Russ.)]
  13. Гарифуллина Д.В. Эндофитные бактерии растений гороха как активный компонент бобово-ризобияльной симбиотической системы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Уфа, 2012. [Garifullina DV. Endofitnyye bakterii rasteniy gorokha kak aktivnyy komponent bobovo-rizobial'noy simbioticheskoy sistemy. [dissertation abstract] Ufa; 2012. (In Russ.)]. Доступно по: [https://revolution.allbest.ru/agriculture/00982191\\_0.html](https://revolution.allbest.ru/agriculture/00982191_0.html). Ссылка активна на 02.02.2020.
  14. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., и др. Комплексная биологическая активность *in vitro* эндофитных бактерий, выделенных из клубеньков гороха и фасоли // *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. — 2015. — № 4–1. — С. 25–28. [Garipova SR, Garifullina DV, Markova OV, et al. Complex biological activity in vitro of endophytic bacteria isolated from pea and bean nodules. *Izvestiya Ufimskogo Nauchnogo Tsentra Rossiyskoy Akademii Nauk*. 2015;(4-1):25-28. (In Russ.)]
  15. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Баймиев А.Х., Хайруллин Р.М. Межмикробные взаимоотношения бактерий *Serratia* sp. Ent16 — симбионта клубенька гороха и колонизация ими эндоризосферы хозяина // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2017. — Т. 53. — № 3. — С. 299–307. [Garipova SR, Garifullina DV, Baimiev AH, Khairullin RM. Intermicrobial relationships of the pea nodule symbiont *Serratia* sp. Ent16 and its colonization of the host endorhizosphere. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2017;53(3):299-307. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0555109917030060>.
  16. Selvakumar G, Kundu S, Gupta AD, et al. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of *Kudzu* (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. *Curr Microbiol*. 2008;56(2):134-139. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9062-z>.
  17. Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Ali A. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Afr J Biotechnol*. 2012;11:15012-15019. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3438>.
  18. Elvira-Recuenco M, van Vuurde JW. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can J Microbiol*. 2000;46(11):1036-1041. <https://doi.org/10.1139/w00-098>.
  19. Shtark OY, Borisov AY, Zhukov VA, Tikhonovich IA. Mutually beneficial legume symbioses with soil microbes and their potential for plant production. *Symbiosis*. 2012;58(1-3):51-62. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0226-2>.
  20. Штark О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С., и др. Анализ исходного материала гороха посевного (*Pisum sativum* L.) для селекции сортов с высоким симбиотическим потенциалом и выбор параметров для его оценки // *Экологическая генетика*. — 2006. — Т. 4. — № 2. — С. 22–28. [Shtark OYu, Danilova TN, Naumkina TS et al. Analysis of pea (*Pisum sativum* L.) source material for breeding of cultivars with high symbiotic potential and choice of criteria for its evaluation. *Ecological genetics*. 2006;4(2):22-28. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen4222-28>.
  21. Данилова Т.Н. Эффективность взаимодействия гороха (*Pisum sativum* L.) с комплексом полезной почвенной микрофлоры. Новый признак селекции зернобобовых культур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2011. — 18 с. [Danilova T.N. Effektivnost' vzaimodeistviya gorokha (*Pisum sativum* L.) s kompleksom poleznoi pochvennoi microflory. Novyi priznak selektsii zarnobobovykh kul'tur. [dissertation abstract] Saint Petersburg; 2011. 18 p. (In Russ.)]. Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01004859442>. Ссылка активна на 02.02.2020.

22. Гарипова С.Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве // Успехи современной биологии. — 2012. — Т. 132. — № 5. — С. 493–505. [Garipova SR. The ecological role of endophytic bacteria in symbiosis with legumes and their use in plant breeding. *Advances in modern biology*. 2012;132(5): 493-505. (In Russ.)]
23. Жуков В.А., Ахтемова Г.А., Жернаков А.И., и др. Симбиотическая эффективность генотипов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) при моделировании в вегетационном эксперименте // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 3. — С. 607–614. [Zhukov VA, Akhtemova GA, Zhernakov AI, et al. Evaluation of the symbiotic effectiveness of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes in pot experiment. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya*. 2017;52(3):607-614. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.3.607rus>.
24. Наумкина Т.С., Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., и др. Использование симбиозов бобовых при создании высокоэффективных растительно-микробных систем для адаптивного растениеводства // Аграрная Россия. — 2011. — № 3. — С. 35–37. [Naumkina TS, Borisov AYu, Shtark OYu, et al. Use of symbioses of pod-bearing plants for building of highly effective plant-microbic systems for adaptive plant growing. *Agrarian Russia*. 2011;3:35-37. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2011-3-35-37>.
25. Hallmann J, Berg G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In: Schulz BJ, Boyle CJ, Sieber TN, eds. *Microb. Root Endophytes*. Part of the Soil Biology book series (SOILBIOL, vol. 9). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. P. 15-31. [https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_2).
26. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001; Ch. 2: Unit 2.4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>.
27. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 2000;7(1-2):203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>.
28. Берестецкий О.А. Фитотоксины почвенных микроорганизмов и их экологическая роль. Фитотоксические свойства почвенных микроорганизмов. — Л.: Изд-во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, 1978. — С. 7–31. [Berestetskiy O.A. Fitotoksiny pochvennykh mikroorganizmov i ikh ekologicheskaya rol'. Fitotoksicheskiye svoystva pochvennykh mikroorganizmov. Leningrad: Izd-vo VNII sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii; 1978. P. 7-31. (In Russ.)]
29. Mamontova T, Afonin AM, Ihling C, et al. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsiveness to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecules*. 2019;24(8). pii: E1603. <https://doi.org/10.3390/molecules24081603>.
30. López-López A, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, et al. Phaseolus vulgaris seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2010;33(6):322-327. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.07.005>.
31. Dong Y, Iniguez AL, Triplett EW. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 2003;257(1):49-59. <https://doi.org/10.1023/A:1026242814060>.
32. Соловьева Е.А., Алещенкова З.М., Сафронова Г.В., и др. Микробный препарат Бактопин в технологии возделывания однолетних цветочных растений // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси: в 2-х частях. — Минск, 2017. — С. 284–287. [Solovyova EA, Aleshenkova ZM, Safronova GV, et al. Application of microbial preparation Bactopin in technology of growing ornamental plants. (Conference proceedings) Rol' botanicheskikh sadov i dendrariyev v sohranении, izuchenii i ustojchivom ispol'zovanii raznoobraziya rastitel'nogo mira: Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 85-letiyu Tsentral'nogo

- botanicheskogo sada Natsional'noy akademii nauk Belarusi: v 2-kh chastyakh. Minsk; 2017. P. 25-28. (In Russ.)]
33. Malfanova N, Kamilova F, Validov S, et al. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microb Biotechnol.* 2011;4(4):523-532. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00253.x>.
34. Kandel SL, Firrincieli A, Joubert PM, et al. An *in vitro* study of bio-control and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. *Front Microbiol.* 2017;8:386. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00386>.
35. Тихонович И.А., Андронов Е.Е., Борисов А.Ю., и др. Принцип дополнительности геномов в расширении адаптационного потенциала растений // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 9. — С. 973. [Tikhonovich IA, Andronov EE, Borisov AYU, et al. The principle of genome complementarity in the enhancement of plant adaptive capacities. *Genetika.* 2015;51(9):973. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S001667581509012X>.

## Приложение 1

Праймеры, использованные в исследовании

Название праймера	Последовательность
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
642F	CCATGUGACCATCCAATGACC
1451R	TTAAGCGACGGAAAGCCTTC

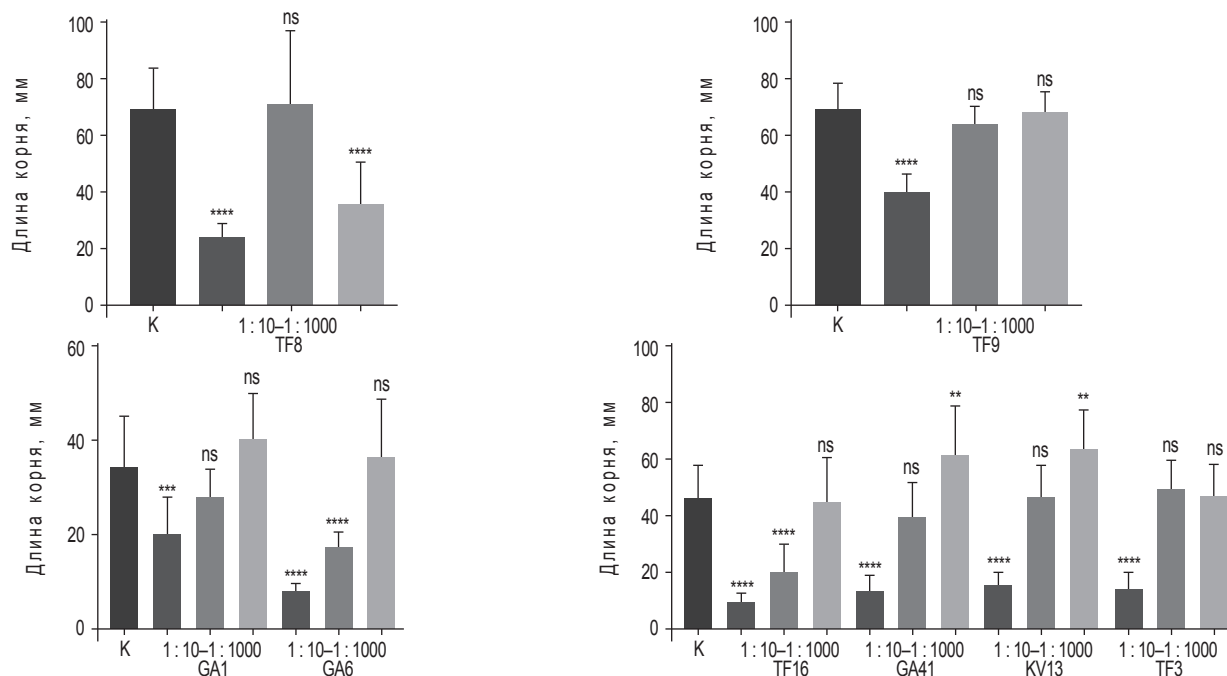
## Приложение 2

Урожай растений. Вегетативная масса семян растений гороха посевного *Pisum sativum* L.

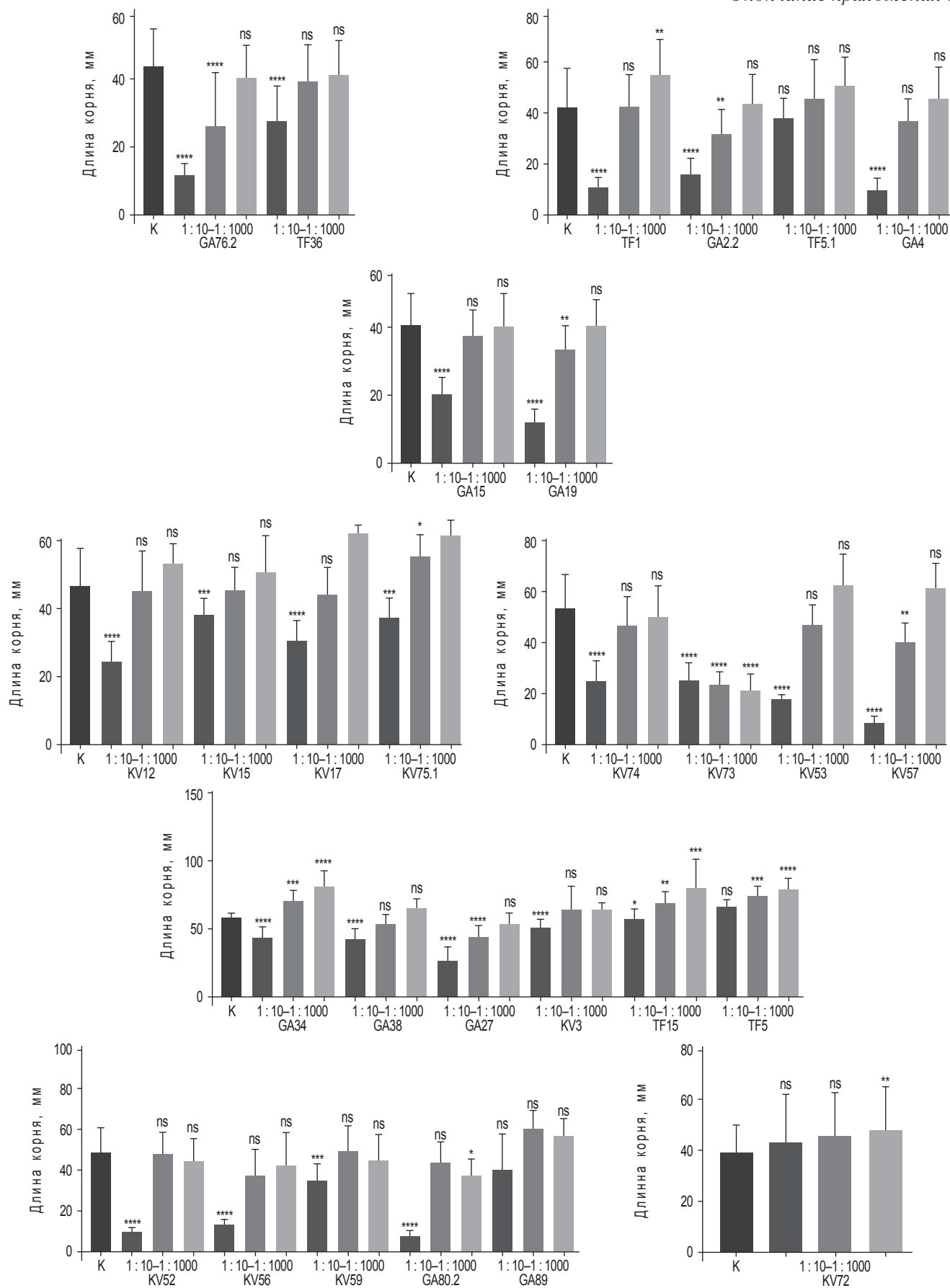
Генотип гороха	Среднее значение вегетативной массы растений, г	Среднее значение массы семян растений, г
К-3358	3,68 ± 0,38	2,10 ± 0,22
К-8274	2,67 ± 0,04	1,51 ± 0,02
Сорт Триумф	2,91 ± 0,13	1,71 ± 0,07

## Приложение 3

Результаты тестов эндофитных бактерий на ростостимулирующую активность. Достоверность отличия длины корней растений от контроля: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns — отсутствие достоверных различий



Окончание приложения 3



## ✿ Информация об авторах

**Екатерина Николаевна Васильева** — техник 1-й категории, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [evasilieva@arriam.ru](mailto:evasilieva@arriam.ru).

**Гульнар Асановна Ахтемова** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [ahgulya@yandex.ru](mailto:ahgulya@yandex.ru).

**Алексей Михайлович Афонин** — аспирант, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [afoninalexeym@gmail.com](mailto:afoninalexeym@gmail.com).

**Алексей Юрьевич Борисов** — д-р биол. наук, главный научный сотрудник. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [ayborisov@yandex.ru](mailto:ayborisov@yandex.ru).

**Игорь Анатольевич Тихонович** — д-р биол. наук, научный руководитель, ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург; профессор, декан биологического факультета. СПбГУ, Санкт-Петербург. E-mail: [arriam2008@yandex.ru](mailto:arriam2008@yandex.ru).

**Владимир Александрович Жуков** — канд. биол. наук, заведующий лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [vzhukov@arriam.ru](mailto:vzhukov@arriam.ru).

## ✿ Authors and affiliations

**Ekaterina N. Vasileva** — Technician, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [evasilieva@arriam.ru](mailto:evasilieva@arriam.ru).

**Gulnar A. Akhtemova** — PhD, Senior Scientist, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [ahgulya@yandex.ru](mailto:ahgulya@yandex.ru).

**Alexey M. Afonin** — PhD student, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [afoninalexeym@gmail.com](mailto:afoninalexeym@gmail.com).

**Alexey Yu. Borisov** — DSc, Chief Researcher. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [ayborisov@yandex.ru](mailto:ayborisov@yandex.ru).

**Igor A. Tikhonovich** — DSc, Scientific Director, Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; Professor, Dean, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [arriam2008@yandex.ru](mailto:arriam2008@yandex.ru).

**Vladimir A. Zhukov** — PhD, Head, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [vzhukov@arriam.ru](mailto:vzhukov@arriam.ru).