

The Role of Endophytic Microorganisms of Medicinal Plants in the Adaptation of Host Plants

Zhivetev M.A., Turskaya A.L., Putilina T.E., Markova Ju. A.,
Graskova I.A., Voinikov V.K.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

*E-Mail: nik.19@mail.ru

Received August 11, 2015

Cultures of microorganisms were isolated from endosphere of Lake Baikal littoral zone plants: *Veronica chamaedrys* L., *Alchemilla subscrenata* Buser, *Achillea asiatica* Serg., *Taraxacum officinale* Wigg., *Plantago major* L. Morphology and biochemical properties of isolated bacteria were studied. For the majority of the endophytic bacterial cultures cellulolytic and proteolytic activity has been shown, which necessary for the effective colonization of plant tissue. For many cultures revealed ability in varying degrees to form a biofilm to improve survival in a vegetative organism. Their potential role in adaptation of plant-hosts under conditions of climat Baikal region was shown. In particular, 9 of cultures demonstrated ability to act as nitrogen retainer. The vast majority of bacterial cultures did not have phytotoxicity or demonstrated its low level, reflecting and minimum negative effects of them on plant. Moreover, culture with encryption P3, isolated from *Plantago major* in August, showed a stimulatory effect in experiments on phytotoxicity. This same culture possessed the highest ability to secrete sugars as at +26°C and at +4°C.

Key words: endophytic microorganisms, endosphere, medicinal plants, *Veronica chamaedrys*, *Alchemilla subscrenata*, *Achillea asiatica*, *Taraxacum officinale*, *Plantago major*, sugar

Проблема адаптации и устойчивости лекарственных и сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам внешней среды до сих пор остается одной из важных задач, поставленных перед биологическими науками. Известно, что в процессы адаптации растений к условиям произрастания вносят существенный вклад ряд ферментов и сигнальных молекул, продукты белкового, липидного и углеводного метаболизма, а также симбиотические и ассоциативные эндофитные микроорганизмы. В частности, разные виды *Pseudomonas* (Rahme *et al.*, 1997), *Enterobacter* (Zinnel *et al.*, 2002) и других родов (Gyaneshwar *et al.*, 2001; Iniguez *et al.*, 2004) обнаружены внутри растительных тканей. Роль эндофитных микроорганизмов в жизни растений практически не изучена. Известно, что эндофиты способствуют адаптации растений к различным условиям окружающей среды, усиливая фотосинтез и продуктивность, устойчивость к действию фитопатогенов и др. (Buharin *et al.*, 2007). Если, например, накопление сахаров является важной составляющей защиты тканей и клеток растений от замерзания в условиях низких температур (Trupova, 2007), то жизнедеятельность симбиотических организмов может способствовать сохранению редких лекарственных растений на более широком ареале за счет увеличения их выживаемости. Поэтому целью данной работы было исследовать эндофитные микроорганизмы, выделенные из лекарственных растений, и выявить их вклад в адаптацию растений-хозяев.

MATERIALS AND METHODS

Для исследования были выбраны виды растений, наиболее часто встречающиеся на территории стационара института «Речка Выдриная», расположенном на юго-восточном побережье озера Байкал. Это манжетка городковатая *Alchemilla subcrenata* Buser, вероника дубравная *Veronica chamaedrys* L., тысячелистник азиатский *Achillea asiatica* Serg., одуванчик лекарственный *Taraxacum officinale* Wigg., подорожник большой *Plantago major* L. Растения в той или иной мере используются в народной и классической медицине, но недостаточно изучены. Известно, что все они содержат аскорбиновую кислоту, флавоноиды, дубильные вещества и в разной степени обладают противомикробным и противовирусным действием (Zorina, 2009; Telyatjev, 1985).

Так как эндофитные микроорганизмы могут участвовать в адаптации растений к изменяющимся условиям внешней среды, из тканей исследуемых растений был выделен ряд культур таких микроорганизмов и проведено их тестирование.

Бактерии выделяли из листовых пластинок растений после стерилизации их поверхности 10 % раствором гипохлорита натрия. Для идентификации полученных культур проводили стандартное описание их роста на плотной питательной среде и на бульоне, окрашивали микроорганизмы по Граму с помощью теста гидроокисью калия, определяли каталазную

активность, тестировали на окисление-ферментацию (ОФ) среды, рост на среде Симмонса и восстановление нитратов до нитритов (Voznyakovskaya, 1969). Также определяли целлюлазную, протеолитическую и амилитическую активность бактерий, рост на среде Эшби, способность образовывать биопленки, фитотоксичность культур (Neto et al., 2003). Образование биопленок бактериальными культурами определяли с помощью красителя кристаллического фиолетового (Shaginyan et al., 2007).

Для определения общего содержания водорастворимых сахаров в культуральной жидкости бактерий использовали антроновый метод (Kochetkov et al., 1967). Оптическую плотность раствора промеряли на спектрофотометре Soekol – 10 («Karl Zeiss», Германия) при длине волны 620 нм.

RESULTS AND DISCUSSION

Ранее нами было показано, что с наступлением осенних холодов происходило накопление низкомолекулярных углеводов в тканях всех исследуемых растений, но особенно сильно это происходило в тканях листьев растений, собранных вблизи побережья Байкала (Zhivetev et al., 2011). Линейные коэффициенты корреляции показали высокую и достоверную зависимость содержания сахаров в листьях всех изученных лекарственных растений от температуры и составили на р. Выдриная: для *A. asiatica* $r=-0,97$, $p<0,05$, для *P. major* $r=-0,98$, $p<0,05$, для *T. officinale* $r=-0,99$, $p<0,05$, для *A. subcrenata* $r=-0,98$,

$p<0,05$ и для *V. chamaedrys* $r=-1,00$, $p<0,05$ – а в Иркутске: у *T. officinale* $r=-0,94$, $p<0,05$, у *A. asiatica* $r=-0,91$, $p<0,05$, у *P. major* $r=-0,95$, $p<0,05$. Очевидно, накопление растворимых сахаров в листьях лекарственных растений кроме трофической осуществляло еще и криопротекторную функцию.

В этой работе мы изучили эндофитные микроорганизмы, выделенные из тканей этих же растений, и вероятность их участия в адаптации растений-хозяев. Учитывая, что на территориях Сибири наиболее лимитирующим условием произрастания растений является температура, особенно низкая, сбор биологического материала осуществляли в августе и октябре (табл. 1). Всего было выделено более 40 изолятов бактерий. Из них основной интерес был сосредоточен на 16 культурах, которые были протестированы наиболее полно (табл. 1 – 4).

Большинство из исследуемых микроорганизмов являлись грамотрицательными каталазоположительными палочками (табл. 1, 3). По результатам тестов такие культуры предположительно можно отнести к роду *Pseudomonas*.

Почти все исследованные культуры обладали целлюлолитической и протеолитической активностью, что может говорить об их способности эффективно разрушать оболочки клеток растений и колонизировать их (табл. 2).

В тканях листьев вероники были найдены эндофитные бактерии, которые способны восстанавливать нитраты и утилизировать цитрат

(табл. 3, 4).

Table 1. Основные свойства выделенных культур микроорганизмов

Вид растения	Условный № культуры/ месяц выделения	Окраска по Граму	Форма клеток	Рост на среде Эшби
<i>Alchemilla subcrenata</i>	15/08	+	Палочки	++
	18/08	-	Палочки	-
	41/10	-	Палочки	+
<i>Veronica chamaedrys</i>	20/ 08	-	Палочки	-
	22/ 08	-	Изогнутые палочки	-
	24 / 08	-	Палочки	-
	37/ 10	-	Палочки	-
	38/ 10	-	Палочки	+
<i>Taraxacum officinale</i>	27 / 08	+	Кокки	++
	35/10	+	Палочки	+
	36/ 10	+	Коккобациллы	+
<i>Achillea asiatica</i>	26 / 08	-	Палочки	-
	T1 / 08	-	Палочки	+
	T2-1/ 08	-	Палочки	-
	T2-2/ 08	+	Палочки	++
<i>Plantago major</i>	ПЗ / 08	-	Палочки	+

Table 2. Целлюлолитическая, протеолитическая и амилолитическая активности выделенных культур микроорганизмов

Вид растения	№ культуры/ месяц выделения	Целлюлолитическая активность	Протеолитическая активность	Амилолитическая активность
<i>Alchemilla subcrenata</i>	15/08	+	+	-
	18/08	+	+	-
	41/10	+	+	-
<i>Veronica chamaedrys</i>	20/ 8	+	+	-
	22/ 8	+	+	-
	24.08.15	+	+	-
	37/ 10	+	+	-
	38/ 10	+	+	-
<i>Taraxacum officinale</i>	27 / 8	Не исследовали	+	-
	35/10	+	+	-
	36/ 10	+	+	-
<i>Achillea asiatica</i>	26 / 8	+	+	-
	T1 / 8	-	+	-
	T2-1/ 8	-	+	-
	T2-2/ 8	+	+	-
<i>Plantago major</i>	ПЗ/ 8	+	Не исследовали	Не исследовали

Table 3. Каталазная активность и способность восстанавливать нитраты у выделенных бактериальных культур

Вид растения	№ культуры/ месяц выделения	Каталазная активность	Способность восстанавливать нитраты
<i>Alchemilla subcrenata</i>	15/08	+	Не исследовали
	18/08	+	-
	41/10	+	-
<i>Veronica chamaedrys</i>	20/ 8	+	+
	37/ 10	+	-
<i>Taraxacum officinale</i>	27 / 8	+	+
	35/10	Не исследовали	-
	36/ 10	Не исследовали	-
<i>Achillea asiatica</i>	26 / 8	+	-

Table 4. Окисление-ферментация и способность к утилизации цитрата у выделенных культур микроорганизмов

Вид растения	№ культуры/ месяц выделения	Тест окисления-ферментации (ОФ-тест)		Способность утилизировать цитраты
		без масла	с маслом	
<i>Alchemilla subcrenata</i>	15/08	+	-	+
	18/08	+	+	+
	41/10	+	+	+
<i>Veronica chamaedrys</i>	20/ 8	+	+	+
	22/ 8	+	+	+
	24 / 8	+	+	+
	37/ 10	+	+	+
	38/ 10	+	+	+
<i>Taraxacum officinale</i>	27 / 8	+	+	-
	35/10	+	+	-
	36/ 10	-	-	-
<i>Achillea asiatica</i>	26 / 8	+	+	+
	T1 / 8	+	-	Не исследовали
	T2-1/ 8	+	-	Не исследовали
<i>Plantago major</i>	П3 / 8	+	-	+

Table 5. Способность образовывать биопленки и фитотоксичность бактериальных культур

Вид растения	№ культуры	Образование биопленки	Фитотоксичность, в баллах, на луке
<i>Alchemilla subcrenata</i>	15	0,243±0,041	0
	18	0,264±0,099	3
	41	0,096±0,019	0
<i>Veronica chamaedrys</i>	20	0,102±0,013	0
	22	0,165±0,041	0
	24	0,171±0,103	0
	37	0,213±0,190	0
<i>Taraxacum officinale</i>	38	0,122±0,011	0
	27	0,122±0,021	1
	35	0,120±0,012	0
<i>Achillea asiatica</i>	36	0,257±0,108	1
	26	0,144±0,047	0-1
	T1	0,115±0,003	0
	T2-1	0,096±0,010	2
<i>Plantago major</i>	T2-2	0,093±0,014	2
	ПЗ	0,104±0,037	0
Контроль		0,085	0

Примечание: 0 – ткань остается неповрежденной и необесцвеченной; 1 – незначительно обесцвеченные ткани на расстоянии 1 см вокруг точки инокуляции, ткани не повреждены; 2 – внутренние чешуйки обесцвечены или вялые; 3 – внутренние чешуйки вялые или обесцвеченные от верхушки к основанию

Table 6. Всхожесть семян в присутствии бактериальных культур

Вид растения	№ культуры	Влияние на всхожесть семян	
		Пшеницы	Редиса
<i>Alchemilla subcrenata</i>	15	Ингибировало	Ингибировало
	18	Ингибировало	Ингибировало
	41	Слабо подавляло	Ингибировало
<i>Veronica chamaedrys</i>	22	Сильно подавляло	Ингибировало
	37	Ингибировало	Ингибировало
	38	Ингибировало	Ингибировало
<i>Taraxacum officinale</i>	36	Ингибировало	Ингибировало
<i>Achillea asiatica</i>	26	Ингибировало	Ингибировало

Table 7. Содержание сахаров в культуральной жидкости при разных температурных условиях культивирования, 10⁻³ мг/мл

Условное обозначение культуры микроорганизмов	Вид растения, из которого выделена культура	Температура культивирования	
		+26 °C	+4 °C
T1	<i>Achillea asiatica</i>	3,04±0,13	3,44±0,45
T2-2	<i>Achillea asiatica</i>	2,99±0,19	1,52±0,17
ПЗ	<i>Plantago major</i>	5,13±0,40	16,22±1,53

Важным фактором для взаимодействия эндофитных бактерий с растением служит способность фиксировать атмосферный азот. Оказалось, что 9 культур из 16 обладали способностью расти на среде Эшби, что позволяет предположить азотфиксирующую активность этих микроорганизмов (табл. 1).

Существенным фактором, способствующим адаптации бактерий к любым неблагоприятным условиям, является образование биопленок, в составе которых микроорганизмы лучше сохраняют жизнеспособность и эффективнее колонизируют растение. В результате проведенных исследований было установлено, что способность к формированию биопленок у исследованных изолятов оказалась различной (табл. 5.).

Культуры, выделенные из *A. subcrenata* в августе (№15 и №18), характеризовались достаточной степенью образования биопленки, в то время как культура, выделенная из *A. subcrenata* в октябре (№41), показала практически контрольный уровень образования биопленки (табл. 5). Культуры, выделенные из *V. chamaedrys*, характеризовались слабым уровнем образования биопленок. Культуры, выделенные из *A. asiatica*, также не обладали выраженной способностью формировать биопленки. Бактериальная культура №36, выделенная из *T. officinale*, показала наиболее высокую способность формировать биопленки, что свидетельствует о ее способности выживать в неблагоприятных условиях, в том числе сосудах, проводящих пучках растений, в межклетниках.

Была изучена фитотоксичность изолятов (табл. 5). Наиболее высокую фитотоксичность на растениях лука проявила культура №18, выделенная из *A. subcrenata*. Средней фитотоксичностью обладала культура №Т2-2, выделенная из *A. asiatica*. Низкой фитотоксичностью обладали культуры: №27 и №36, выделенные из *T. officinale* и №26, выделенная из *A. asiatica*. Остальные культуры не оказали фитотоксичного влияния на растения лука. Более того, культура ПЗ, выделенная из *P. major*, наоборот, стимулировала рост побега растения. При этом на всхожесть семян исследуемые культуры в той или иной степени оказывали ингибирующее действие (табл. 6).

В растительном организме бактериальные клетки, выделяющие низкомолекулярные углеводы, могут вносить свой вклад в пул этих молекул растительной цитоплазмы и не только «подкармливать» растения ди- и моносахаридами, но и способствовать адаптации к гипотермии, снабжая их дополнительными осмо- и криопротекторными молекулами. Вначале нами была показана способность секретировать сахара у ряда бактериальных культур, в том числе выделенных из *P. major* (культура ПЗ), *A. asiatica* (Т2-1), *V. chamaedrys* (культура 37), *A. subcrenata* (культура 41). Культуры выращивались на бедной безуглеводной среде, но после инкубирования низкомолекулярные углеводы в культуральной жидкости обнаруживались.

Далее мы изучили, меняется ли секреция сахаров бактериальными клетками в окружающую

среду в зависимости от внешних температурных условий (табл. 7).

Из трех представленных культур в двух наблюдали изменения в накоплении сахаров в культуральной жидкости в зависимости от температурного режима культивирования. В культуре Т2-2, при температуре культивирования близкой к нулю (4°C), наблюдали сильное понижение секреции низкомолекулярных углеводов микроорганизмами (в два раза). Культура ПЗ, выделенная из *P. major*, наоборот, продемонстрировала трехкратное увеличение накопления сахаров в среде культивирования. Интересно, что именно эта культура (ПЗ) стимулировала рост побегов растения в опытах на фитотоксичность. Возможно, эти два свойства культуры ПЗ тесно взаимосвязаны. Не исключено, что относительно высокая ($5,13 - 16,33 \cdot 10^{-3}$ мг/мл) способность этой культуры секретировать сахара полезна для растения и этот эндофит выступает в роли симбионта.

CONCLUSION

Из тканей лекарственных растений выделены эндофитные микроорганизмы.

Показана их способность эффективно колонизировать растение и выживать в нем за счет наличия целлюлолитических и протеолитических ферментов и способности к биопленкообразованию. При этом большинство культур микроорганизмов сохраняли низкую фитотоксичность или ее полное отсутствие.

Показана возможность участия изученных

изолятов эндофитных бактерий в адаптации растений-хозяев. В частности, ряд культур могут быть азотфиксаторами и секретировать сахара, что должно благоприятно сказываться на росте, развитии и жизнеспособности растений.

REFERENCES

- Buharin E.S., Lobakova N.V. and Nemtseva O.V. (2007) Assosiativnyj simbioz. Ekaterinburg: UrO RAN, 264 s. (in Russian).
- Gyaneshwar P., James E.K. and Mathan N. (2001) Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, **8**, 2634–2645.
- Iniguez A.L., Dong Y.M., Triplett E.W. (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **17**, 1078–1085.
- Kochetkov N.K., Bochkov A.F., Dmitriev B.A., Usov A.I., Chizhov O.S. and Shibaev V.N. (1967) Himiya uglevodov. M.: Himiya, 672 s. (in Russian).
- Neto J. R., Yano T., Beriam L.O.S., Destefano S.A.L., Oliveira V.M. and Rosato Y.B. (2003) Comparative Rflp-Its Analysis Between Enterobacter Cloacae Strains Isolated From Plants And Clinical Origin. *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo*, **70**. P. 367–372.
- Rahme L.G., Tan M.W. and Le L. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **24**, 13245–13250.
- Shaginyan I.A., Danilina G.A., Chernuha M.Yu.,

- Alekseeva G.V. and Batov A.B. (2007) Formirovanie bioplenok klinicheskimi shtammami bakterij kompleksa *Burkholderia cepacia* v zavisimosti ot ih fenotipicheskikh i genotipicheskikh harakteristik. *ZhMEI*, **1**, 3-9. (in Russian).
- Telyatjev V.V. (1985) Poleznye rasteniya Tsentralnoj Sibiri. Irkutsk: Vostochno-Sibirskoe knishnoe izdatelstvo, 384 s. (in Russian)
- Trunova T.I. (2007) Rastenie i nizkotemperaturnyj stress. M.: Nauka, 54 s. (in Russian).
- Voznyakovskaya Yu. M. (1969) Mikroflora rastenij i urozhaj. L.: Kolos, 238 s. (in Russian).
- Zinnel D.K., Lambrecht P., Harris N.B. and Feng Z. (2002) Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2168-2208.
- Zhivetev M.A., Graskova I.A., Pomortsev A.V. and Voinikov V.K. (2011) Water and carbohydrate content at leaf of plants used in medicine during vegetation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **4**, 69-79.
- Zorina E.V. (2009) Farmagnosticheskoe izuchenie vidov roda *Alchemilla* L. Permskogo kraja. Avtoref. diss. na soisk. uch. st. kand. farmats. Nauk, Perm, 21 s. (in Russian).