

АННОТАЦИЯ

Общая характеристика диссертационной работы. Работа посвящена исследованию особенностей распространения эндофитных микроорганизмов лекарственных растений, поиску новых штаммов, характеристике их ростстимулирующих и биоконтрольных свойств для разработки эффективных микробиологических препаратов, применяемых в растениеводстве.

Актуальность темы исследования.

Лекарственные растения являются ценным источником биологически активных соединений, которые способствуют их выживанию в естественной среде, включая защитные функции в отношении биотических и абиотических стрессов. Эти биологически активные вторичные метаболиты, синтезируемые лекарственными растениями, также могут оказывать сильное влияние на микробные сообщества, связанные с растениями, и их физиологические функции. Более того, растения зависят от своего микробиома в отношении специфических свойств и активности, включая стимулирование роста, получение питательных веществ, индуцированную системную устойчивость и устойчивость к стрессовым факторам. В связи с этим, ассоциации растений с полезными микроорганизмами привлекают внимание ученых не только как объект для изучения фундаментальных основ взаимодействия различных организмов, но и с точки зрения возможного их использования в практике экологически ориентированного растениеводства.

Основными факторами окружающей среды, ограничивающими производительность сельскохозяйственных растений, являются засуха, засоление почв, температурные колебания, тяжелые металлы, фитопатогены. Неблагоприятные последствия стрессов усугубляются изменением климата и непредсказуемостью погодных условий. Устойчивость к основным биотическим и абиотическим стрессам - одно из основных требований, которые предъявляются к современным сортам сельскохозяйственных культур и технологиям их выращивания. Для многих агрокультур проблема комплексной длительной устойчивости к стрессовым факторам до сих пор остается нерешенной, поэтому для получения удовлетворительной урожайности приходится использовать химические средства защиты растений. Все это побуждает, опираясь на приоритеты адаптивно-ландшафтного земледелия, вести поиск максимально экологизированных методов и средств, снижающих потери урожая и стабилизирующих продуктивность растений. К таким методам относят как прямое воздействие биопрепаратов, состоящих из микроорганизмов и их метаболитов, так и повышение общей неспецифической устойчивости растений (иммунного статуса) к неблагоприятным факторам биотической и абиотической природы путем индукции природных защитных механизмов.

Эндофиты лекарственных растений способствуют выживанию растения-хозяина и усилению продукции его биоактивных метаболитов. Использование эндофитов в качестве стимуляторов роста растений может помочь обеспечить стабильные урожаи как растений-хозяев, так и других

растений, в том числе агрокультур, уменьшить проблемы, связанные с воздействием биотических и абиотических факторов.

Эндофитные микроорганизмы способствуют росту и развитию растения-хозяина благодаря выработке фитогормонов, улучшению транспорта воды и питательных веществ, действию механизмов биологической защиты и индуцированию системной устойчивости к фитопатогенам. Эндофиты представляют интерес в первую очередь, как потенциальные агенты, так называемого, системного биоконтроля, так как проникают внутрь растений. Кроме того, эти микроорганизмы способны влиять на физиологические процессы растений, определяющие устойчивость к действию абиогенных стресс-факторов среды.

В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на изучение способности эндофитных микроорганизмов повышать устойчивость растений к действию биотических и абиотических факторов окружающей среды.

Цель исследования: экспериментальное обоснование возможности биотехнологического использования эндофитных микроорганизмов и разработка эффективных способов их применения.

Задачи исследования:

1. Характеристика количественного состава и таксономической структуры эндофитных микроорганизмов лекарственных растений.
2. Скрининг эндофитных штаммов с биотехнологически ценными свойствами.
3. Определение способности галотолерантных бактерий стимулировать рост растений ячменя в условиях засоленной почвы.
4. Разработка метода защиты яблок от послеуборочных инфекций с использованием полигидроксиалконоата (ПГА) эндофитных штаммов.
5. Получение биопрепарата для предпосевной обработки семян на основе эндофитных микроорганизмов и их БАВ в условиях фитопатогенной нагрузки.

Объект исследования: штаммы эндофитных микроорганизмов выделенные из 11 лекарственных растений (мята перечная (*Méntha piperíta*), шалфёй лекарственный (*Sālvia officinālis*), цикорий обыкновенный (*Cichórium íntybus*), эхинацея пурпурная (*Echinácea purpúrea*), крапива двудомная (*Urtíca dióica*), душица обыкновенная (*Oríganum vulgáre*), полынь лечебная (*Artemisia abrotanum*), ирис болотный (*Iris pseudacorus*), солодка голая (*Glycyrrhiza glabra*), мелисса лекарственная (*Melissa officinalis*), чеснок посевной (*Állium satívum*)).

Предмет исследования: характеристика ростстимулирующих и биоконтрольных свойств эндофитных микроорганизмов и их БАВ с последующей разработкой эффективных способов их применения.

Методы исследования: в работе использованы современные микробиологические, биохимические, молекулярно-биологические, физико-химические и вегетационные методы. Статистическая обработка данных

проведена с использованием лицензированного пакета программы Statistica версия 10.0.

Научная новизна результатов исследования:

Впервые охарактеризован количественный состав и таксономическая структура эндофитных микроорганизмов 11-ти лекарственных растений Казахстана. Показано, что в структуре эндофитных микробных сообществ наибольшую долю среди бактерий занимали представители родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, среди грибов *Penicillium* и *Aspergillus*.

Получены оригинальные результаты, доказавшие положительное действие эндофитов лекарственных растений на агрокультуры обусловленное синтезом ауксинов, влиянием на активность антиоксидантных ферментов и содержание пролина, увеличением доступности питательных веществ, выраженной антифунгальной активностью и галотолерантностью.

Впервые предложен инновационный экологически чистый метод защиты яблок от послеуборочных инфекций с использованием ПГА в качестве агента биоконтроля по отношению к *P. expansum*.

Впервые созданы композиции на основе отечественных штаммов эндофитов, а также их метаболитов, и разработаны эффективные способы их применения для улучшения роста сельскохозяйственных культур.

Практическая значимость исследования связана с созданием обширной коллекции эффективных штаммов эндофитов сельскохозяйственного назначения, которая является ценным биологическим ресурсом для проведения исследований. Данные штаммы обладают высоким потенциалом использования в составе препаратов для решения отдельных и комплексных задач в области развития сельского хозяйства и защиты окружающей среды. На 2 штамма (*Pseudomonas flavescens* D5 и *Bacillus aerophilus* A2) получен патент на изобретение РК № 37123 и патент на полезную модель РК № 9024. Ряд наблюдений и выявленных в ходе исследования закономерностей могут быть использованы в качестве практических рекомендаций для разработки биопрепаратов на основе микроорганизмов. Разработанные композиции на основе эндофитов и их метаболитов могут быть использованы для улучшения роста агрокультур, в том числе в условиях засоления и фитопатогенной нагрузки.

Теоретическая значимость исследования. Полученные результаты углубляют и расширяют знания о составе и свойствах эндофитных сообществ лекарственных растений, что является важным вопросом экологии эндофитов и функционирования наземных экосистем. Исследование механизмов положительного действия эндофитных микроорганизмов на растения имеет первостепенное значение для понимания процессов, лежащих в основе стимулирования роста агрокультур, а также обеспечивает фундаментальную платформу для разработки стратегий их применения. Поскольку исследование находится на стыке биотехнологии, микробиологии, биохимии и агробиологии, полученные результаты могут иметь влияние на развитие данных областей науки как в фундаментальном, так и прикладном аспекте.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

– Эндофитный микробиом лекарственных растений представляет собой перспективный источник эффективных штаммов с биотехнологически ценными свойствами.

– Эндофитные галотолерантные штаммы *Ps. flavescens* D5 и *Lysinibacillus sp.* S1 оказывают протекторное действие на растения в условиях солевого стресса.

– Новые микробные ПГА с высокой антимикробной активностью являются потенциальными агентами биоконтроля послеуборочных заболеваний.

– Применение разработанных композиций из эндофитных штаммов и их метаболитов является эффективным приемом предпосевной обработки семян, оказывающим достоверный стимулирующий эффект на рост и развитие агрокультур.

Основные выводы и заключения:

Результаты проведенного исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Основными компонентами сообществ эндофитных бактерий лекарственных растений являлись различные виды родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, среди грибов преобладали представители родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Уровень колонизации и коэффициент выделения эндофитных бактериальных штаммов составил 6,67 до 60% и 0,07 до 0,83, а для грибов данные показатели составляли 3,33 до 43,33% и 0,03 до 0,57, соответственно. Количественное распределение микроорганизмов в органах растений выражалось последовательностью: корни > стебли > листья > цветы. Наибольшая колонизация эндофитами была характерна для мяты перечной и цикория обыкновенного.

2. В результате широкомасштабного скрининга 386 бактериальных и 160 грибных изолятов было отобрано 6 штаммов: *Pseudomonas flavescens* D5, *Bacillus aerophilus* A2, *Serratia proteamaculans* B5, *Peribacillus simplex* B9, *Pseudomonas putida* D7, *Lysinibacillus sp.* S1, обладающих комплексом ценных биотехнологических свойств: способностью продуцировать ИУК и ПГА, антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам *Fusarium solani* и *Fusarium oxysporum*, способностью к мобилизации неорганического фосфора, галотолерантностью.

3. Установлено, что эндофитные галотолерантные штаммы *Ps. flavescens* D5 и *Lysinibacillus sp.* S1 оказывали комплекс полезных эффектов на растения в условиях солевого стресса, улучшая их рост и усиливая защитные механизмы растений. Было показано увеличение морфометрических показателей растений: биомассы побегов на 8–30%, биомассы корней на 7–20%. У обработанных растений отмечено повышение содержания хлорофилла на 41% и снижение уровня пролина в 1,5–2,2 раза по сравнению с контролем. Отмечено увеличение активности ферментов антиоксидантной системы в инокулированных растениях: каталазы в 1,4–7,4 раза, аскорбатпероксидазы в 1,3–3,1 раза, гваяколпероксидазы в 1,2–2,4 раза. Обработка бактериальными

штаммами способствовала поддержанию высокого уровня ионов Na и снижению уровня ионов Ca в условиях солевого стресса.

4. Разработан инновационный экологически чистый метод защиты яблок от послеуборочных инфекций, вызываемых *P. expansum* с использованием микробных ПГА. Предложена питательная среда для повышения выхода ПГА (до 5,9 г/л) на основе отхода масложировой промышленности – соапстока. Проведен ИК-спектроскопический и термогравиметрический анализ образцов ПГА, а также изучена их антифунгальная активность. Использование ПГА в качестве биоконтрольного агента было наиболее эффективным при применении за 24 ч до заражения плодов *P. Expansum* (профилактическая обработка). Показало, что ПГА вызвал снижение заболеваемости в 2 раза на 10-й день по сравнению с контрольными плодами. Потеря веса обработанных с помощью ПГА плодов была в 2 раза ниже, чем у контрольных яблок.

5. Предложен метод предпосевной обработки семян с использованием биопрепарата на основе ассоциации, состоящей из 5 биосовместимых штаммов: *Pseudomonas flavescens* D5, *Bacillus aerophilus* A2, *Serratia proteamaculans* B5, *Pseudomonas fluorescens* D7 и *Lysinibacillus* sp. S1 и полимерного компонента (пуллулан, пектин и ПГА в соотношении 2:1:0,1). Оценено влияние разработанного биопрепарата на рост ячменя в условиях фитопатогенной нагрузки. Было показано увеличение энергии прорастания и всхожести семян, улучшение морфометрических показателей растений: длины и биомассы побегов на 8–30%, длины и биомассы корней на 7–20%. Положительное действие биопрепарата выразалось в увеличении содержания Хла в листьях в 1.4–2.1 раза, Хлв – в 2–2.4 раза, а также суммарного содержания Хл ($a+b$) в 1.6–2.2 раза, в снижении уровня пролина в 3,7 раз. Предпосевная обработка семян приводила к увеличению активности каталазы в стрессовых условиях в 1.3–1.5 раза, аскорбат-пероксидазы в 2,4 раза, гваяколпероксидазы в 2,7 раза.

Основное содержание диссертации отражено на 12 печатных работах, включая 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 2 статьи в республиканских научных журналах, включенных в перечень КОКСНВО МНВО РК, 2 патента РК, 1 статья в материалах международной конференции и 4 тезиса в материалах международных конференций.

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, анализе, интерпретации и оформлении полученных результатов, подготовке рукописей публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, списка использованных источников из 234 наименований. Работа содержит 19 таблиц, 25 рисунков и 2 приложения.