

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА СООБЩЕСТВА ПРОКАРИОТ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ ПОД ОЗИМОЙ РОЖЬЮ НЕ ЗАВИСИТ ОТ АГРОТЕХНИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ\*

В.А. ФИЛИППОВА, Ю.В. КРУГЛОВ, Е.Е. АНДРОНОВ

Микробные сообщества почв — это сложные многокомпонентные системы, формирующиеся под влиянием широкого круга факторов, в том числе типа почвы, вида растения, климата, агротехники. До сих пор ведется дискуссия о специфическом характере действия различных растений на микробиом почвы, что важно для понимания механизма взаимодействия микроорганизмов и растений, построения оптимальных севооборотов, а также организации мероприятий по защите сельскохозяйственных культур от фитопатогенных микроорганизмов и вредителей. Озимая рожь — одна из немногих сельскохозяйственных культур, которая может выращиваться беспрерывно на протяжении десятилетий. Она имеет мощную корневую систему, которая по биомассе сопоставима с наземной частью растения. В настоящей работе представлены результаты анализа филогенетической структуры и разнообразия прокариотических микроорганизмов в посевах ржи, выращиваемой в бессменной культуре и шестипольном севообороте на протяжении почти 100 лет. Нашей целью было выявление влияния различных агротехник (севооборот и известкование) на филогенетическую структуру прокариотических микроорганизмов в посевах ржи в условиях длительного полевого опыта. Отбор образцов проводили в 2010 году в южной части Клинско-Дмитровской возвышенности на участке многолетнего опыта РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева. Для филогенетического анализа комплекса прокариотических микроорганизмов в почве использовали делянки, засеянные озимой рожью (*Secale cereale* L.), которая выращивалась в бессменной культуре и шестипольном севообороте с 1912 года. Севооборот включал чистый пар, озимую рожь, картофель, ячмень с подсевом клевера, клевер первого года пользования, лен. Почвенные пробы отбирали в фазу колошения озимой ржи на глубину пахотного горизонта А1 (0-20 см) в пяти повторностях, из которых составляли средний образец. После тщательного перемешивания его использовали для выделения ДНК. Результаты высокопроизводительного секвенирования ДНК почвенного микробиома и последующего анализа филогенетической структуры и разнообразия прокариотических микроорганизмов в почве показали, что растение служит одним из ключевых факторов формирования прокариотического сообщества. Независимо от агротехнических приемов, под покровом озимой ржи в фазу колошения складывался одинаковый по структуре коровый комплекс прокариот, включающий небольшое количество видов протеобактерий и актинобактерий. Доминирующее положение среди них занимали бактерии семейства *Rhizobiaceae*, что в определенной степени было связано с историей опытного поля. По-видимому, бактерии этого семейства, прежде всего клубеньковые, находят в ризосфере ржи благоприятные условия для развития. Не исключено, что между ними формируется своеобразный ассоциативный симбиоз, который наблюдали некоторые авторы с другими зерновыми колосовыми культурами. В связи с этим несомненный интерес представляют исследования жизнеспособности *Rhizobiaceae* в посевах озимой ржи и эволюции ризобактерий в сторону ассоциативных эндосимбиотических взаимоотношений с рожью в процессе длительного сосуществования. Известкование практически не влияет на видовое богатство в посевах бессменной ржи, но резко снижает его в севообороте.

Ключевые слова: филогенетическая структура, биоразнообразие прокариот, *Rhizobium* sp., *Proteobacteria*, дерново-подзолистая почва, озимая рожь.

Почва — это сложная экологическая система, где ключевую роль играют микробные сообщества, обеспечивающие нормальное функционирование биосферы (1, 2). Для сельского хозяйства особый интерес представляет таксономическая и функциональная структура микробного сообщества, которое формируется в разнообразных физико-химических условиях среды, под покровом разных видов растений. Большинство исследователей считают, что основным фактором формирования микробиоты ризосферы, и особенно ризопланы, служат растения, но, учитывая сложность взаимодействия в системе почва—микроорганизмы—растения, многие признают значительное влияние на структуру и разнообразие ризосферных микроорганизмов типа почвы, агротехнических мероприятий и климата (3-5).

\* Работа выполнена в рамках государственных заданий № 0664-2018-0023 и № 0664-2017-0050.

До сих пор ведется дискуссия о специфическом характере действия различных растений на микробиом почвы, что очень важно для понимания механизма взаимодействия микроорганизмов и растений, построения оптимальных севооборотов, организации мероприятий по защите сельскохозяйственных культур от фитопатогенных микроорганизмов и вредителей. В связи с этим особая роль отводится исследованиям микрофлоры почвы в длительных полевых опытах, в которых одна и та же культура возделывается в поле на протяжении многих лет. Такие опыты проводятся в России, Германии, Великобритании, США, Канаде, Франции (6). Тотальные исследования филогенетической структуры микробиома почвы в многофакторном долготлетнем (более 100 лет) полевом опыте (МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва) показали (7), что ключевым фактором филогенетического разнообразия микробиома служит вид возделываемого растения, вторым по значимости — известкование. Систематическое применение минеральных удобрений не имело заметного влияния на филогенетическую структуру микробиома почвы. При этом микробиомы почв, засеянных различными растениями, неодинаково реагируют на известкование (7).

Особый интерес представляет структура почвенного микробиома под озимой рожью. Это одна из немногих сельскохозяйственных культур, которую можно выращивать бесменно на протяжении десятилетий. Она имеет мощную корневую систему, сопоставимую с биомассой наземной части растений и достигающую 6 т/га (8). Общая площадь корней составляет около 6 тыс. м<sup>2</sup>, а их поверхность превышает поверхность наземной части в 130 раз (9). Корневые выделения достигают, по оценке некоторых авторов, 21 % от синтезируемой массы растений (10). Корневые выделения озимой ржи и ткани растений включают органические кислоты, сахара, глюкозиды циклических производных гидроксамовой кислоты, а также продукты их вторичной трансформации аглюканы и производные бензоксизолинона (11-13). Производные гидроксамовой кислоты и продукты их трансформации обладают гербицидными, фунгицидными и инсектицидными свойствами, обеспечивая защиту культуры от фитопатогенных грибов и ее высокую конкурентоспособность с сорняками (14-16). Это предполагает значительное влияние озимой ржи на почвенный микробиом.

Е. Kurek с соавт. (17) показали, что численность прокариот в ризосфере озимой ржи выше, чем в почве. По их данным, в почве и в ризосфере растений преобладают грамположительные бактерии. Другие исследователи отмечают, что практически у всех полевых культур в ризосфере расиений, особенно в раннем возрасте, доминируют грамотрицательные бактерии (2, 9). По данным А.О. Зверева с соавт. (18), филогенетическая структура прокариот и их разнообразие в ризосфере озимой ржи в возрасте 42 сут и в парующей почве практически не различаются. И.Г. Широких с соавт. (19) обнаружили в ризосфере ржи значительное количество актиномицетов, видовая структура и численность которых изменялась в течение онтогенеза растений. Доминирующее положение занимали стрептомицеты. Данные о длительном влиянии культуры ржи на почвенную микрофлору отсутствуют.

В настоящей работе впервые представлены данные о филотипической структуре и разнообразии прокариотических микроорганизмов в почве при выращивании ржи в бессменной культуре в шестипольном севообороте на протяжении почти 100 лет (долготлетний многофакторный полевой опыт, МСХА им. К.А. Тимирязева). Полученные результаты свидетельствуют, что растение служит основным фактором формирования почвенного прокариотического сообщества.

Нашей целью была оценка влияния разных агротехник (севообо-

рот, известкование) в условиях длительного полевого опыта на филогенетическую структуру микроорганизмов в посевах ржи.

*Методика.* Образцы почвы отбирали в 2010 году на участке многолетнего опыта РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева, который был расположен на территории площадью около 1,5 га с уклоном 1° на северо-запад на моренной равнине в южной части Клинско-Дмитровской возвышенности. Высота над уровнем моря — 162 м, среднее количество осадков — около 600 мм в год, из них примерно половина приходилась на май—август, среднегодовая температура — 4,1 °С. Почва дерново-подзолистая, песчаный крупно-пылеватый суглинок, старопахотная (более 200 лет под пашней) (20). Для филогенетического анализа комплекса прокариотических микроорганизмов в почве использовали делянки, засеянные озимой рожью (*Secale cereale* L.), которая выращивалась в бессменной культуре и шестипольном севообороте с 1912 года. Севооборот включал чистый пар, озимую рожь, картофель, ячмень с подсевом клевера, клевер первого года пользования, лен. На опытные делянки ежегодно вносили минеральные удобрения, общий объем которых за годы исследований (1912-2009) составлял по азоту — 5820 кг, фосфору — 7990 кг, калию — 6716 кг/га (20).

Почвенные пробы отбирали в фазу колошения озимой ржи на глубину пахотного горизонта А1 (0-20 см) в 5 повторностях, из которых составляли средний образец, который тщательно перемешивали.

При выделении ДНК из образца почвы навеску (0,2 г) помещали в эппендорф объемом 2 мл, добавляли равный объем стеклянных шариков диаметром 0,1 мм («Inpomed», Венгрия), 350 мкл раствора А (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 240 мМ изотиоцианат гуанидина, рН 7,0), 350 мкл раствора Б (500 мМ Трис-НСl, 1 % SDS, рН 7,0) и 400 мкл смеси фенола с хлороформом. Пробирку помещали в гомогенизатор FastPrep-24 («MP Biomedicals», США) и разрушали пробу в течение 10-15 мин. Затем центрифугировали при 10000-15000 г в течение 5 мин, отбирали водную фазу. После гомогенизации к образцу приливали 400 мкл хлороформа, интенсивно встряхивали на вортексе в течение 1 мин, центрифугировали при тех же условиях, что и на предыдущей стадии, отбирали водную фазу. К неочищенному экстракту ДНК добавляли равный объем изопропилового спирта, вортексировали, центрифугировали, дважды промывали 70 % этанолом, сушили на воздухе. Осадок растворяли в 100 мкл воды при 65 °С в течение 15 мин.

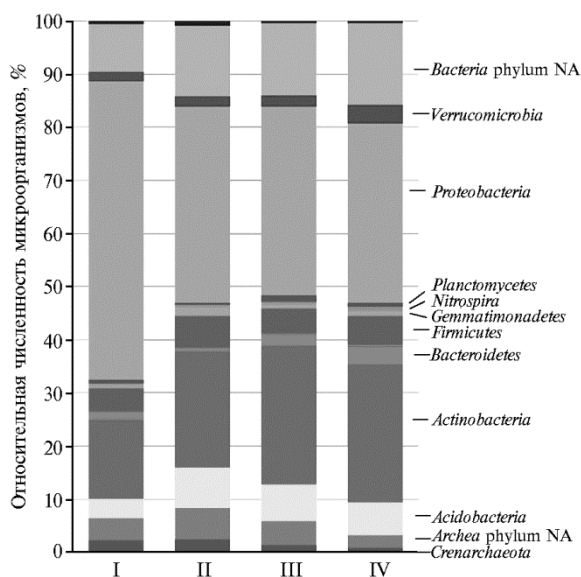
ДНК очищали от примесей электрофорезом в 1 % агарозном геле. Вырезанный блок агарозы, содержащий ДНК, помещали в эппендорф (1,5 мл), добавляли 2 объема раствора В (3 М изотиоцианат гуанидина, 20 мМ Трис-НСl, 20 мг/мл Тритона X-100, рН 7,0) и инкубировали при температуре 65 °С до полного растворения блока. К раствору добавляли 20 мкл раствора Г (раствор В с добавлением окиси кремния, 40 мг/мл), перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Затем центрифугировали при 10000-15000 г в течение 1 мин, полностью убрали супернатант, осадок суспендировали в 200 мкл раствора Д (25 % этанола, 25 % изопропанола, 100 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,0), центрифугировали при 10000-15000 г в течение 1 мин, удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в этаноле, снова центрифугировали в течение 1 мин и удаляли супернатант. Осадок подсушивали на воздухе в течение 15 мин, добавляли 50 мкл элюирующего буфера (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, рН 8,0) и встряхивали на вортексе в течение 30 мин. После этого образцы центрифугировали и отбирали супернатант, избегая попадания окиси кремния в очищенный препарат ДНК.

Выделенная тотальная почвенная ДНК служила матрицей для секвенирования нуклеотидных последовательностей. Использовали универсальные праймеры к варибельному участку V4 гена 16S рРНК (F515 — 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3', R806 — 5'-GGATACVSGGGTAT-СТААТ-3') с добавлением олигонуклеотидных идентификаторов для каждой пробы и служебных последовательностей, необходимых для высокопроизводительного секвенирования по протоколу «Roche» (Швейцария). Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе GS Junior («Roche», Швейцария) согласно рекомендации производителя. Таксономическую идентификацию последовательностей ДНК и сравнительный анализ микробных сообществ выполняли с использованием VAMPS (Visualization and Analysis of Microbial Population Structure) (<http://vamps.mbl.edu/>). Дополнительно для расширенной филогенетической характеристики последовательностей также пользовались базой данных RDP (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/>).

**Результаты.** Агрохимическая характеристика почвы на дату отбора почвенных образцов представлена в таблице.

**Агрохимическая характеристика дерново-подзолистой почвы на участках многолетнего опыта под посевами озимой ржи** (опытное поле РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва, 2010 год)

Вариант опыта	N <sub>общ.</sub> , %	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/100г	K <sub>2</sub> O, мг/100г	C <sub>общ.</sub> , %	pH <sub>сол.</sub>	Сумма обменных оснований, мг-экв/100г
Рожь севооборот	0,090	31,45	4,25	0,79	4,2	8,00
Рожь севооборот + известь	0,098	31,85	4,63	0,93	5,7	7,75
Рожь бессменно	0,112	53,80	24,70	1,28	4,6	8,63
Рожь бессменно + известь	0,095	53,70	21,51	0,98	6,1	8,25



**Рис. 1.** Таксономическое разнообразие прокариотических микроорганизмов дерново-подзолистой почвы (на уровне фил.) на участках многолетнего опыта под посевами озимой ржи в зависимости от технологии выращивания: I — в севообороте с известкованием почвы, II — в севообороте без известкования почвы, III — бессменная культура с известкованием почвы, IV — бессменная культура без известкования почвы (опытное поле РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва, 2010 год).

При высокопроизводительном пиросеквенировании амплифицированной ДНК из почвенных образцов в составе микробного сообщества дерново-подзолистой почвы под посевами озимой ржи выявили 16 фил. бактерий и 2 филы архей. Доминирующее положение занимали две бактериальные филы — *Proteobacteria* (от 34 до 56 %) и *Actinobacteria* (от 15 до 26 %). Филы *Acidobacteria* и *Firmicutes* составляли от 3,5 до 7,5 %, а археи — от 3,0 до 8,5 % от общего числа прокариотических микроорганизмов (рис. 1).

В составе почвенного прокариотического сообщества было выявлено около 300 родов микроорганизмов. Из них всего у 41 (что не превышало 13 % от общего числа таксонов) ча-

стота была более 1 % (рис. 2). Во всех вариантах опыта встречались 12 родов, независимо от технологии выращивания озимой ржи (севооборот, бес-сменная культура, известкование). По-видимому, они составляли коровый комплекс прокариот, характерный для исследованного типа почвы под посевами озимой ржи. В этом комплексе доминировали бактерии, относящиеся к филам *Protobacteria* и *Actinobacteria*, а также неидентифицируемая бактерия (см. рис. 2). Доминирующее развитие этих таксонов в ризосфере озимой ржи наблюдали другие авторы (2, 18), с чем согласуются результаты наших исследований.

Микроорганизм	I	II	III	IV
<i>Acidobacteria</i> Gp6	0,99	1,85	0,37	1,42
<i>Acidobacteria</i> Gp16	0,58	1,50	0,87	2,24
<i>Acidobacteria</i> Gp1	0,58	0,45	3,29	0,67
<i>Acidobacteria</i> Gp4	0,58	1,00	0,31	0,89
<i>Acidobacteria</i> Gp3	0,25	0,65	1,49	0,37
<i>Actinobacteria</i> genus NA18	4,47	7,44	5,21	6,18
<i>Actinobacteria</i> genus NA17	1,66	2,70	2,73	2,76
<i>Solirubrobacter</i> sp.	1,41	1,45	1,43	1,86
<i>Actinobacteria</i> genus NA16	1,08	2,15	2,42	1,86
<i>Arthrobacter</i> sp.	0,91	1,50	0,93	1,12
<i>Actinobacteria</i> genus NA11	0,58	0,70	0,74	0,97
<i>Streptomyces</i> sp.	0,50	1,05	0,37	1,04
<i>Conexibacter</i> sp.	0,50	0,35	1,05	0,60
<i>Nocardioides</i> sp.	0,25	0,95	0,50	1,19
<i>Actinobacteria</i> genus NA5	0,17	1,40	0,37	0,60
<i>Bacteroidetes</i> genus NA2	0,50	1,55	0,37	1,04
<i>Crenarchaeota</i> genus NA	2,24	0,85	2,42	1,42
<i>Firmicutes</i> genus NA1	1,08	1,15	1,12	1,19
<i>Firmicutes</i> genus NA5	0,83	1,10	1,24	1,56
<i>Paenibacillus</i> sp.	0,75	0,70	1,05	0,07
<i>Bacillus</i> sp.	0,58	0,85	0,93	0,67
<i>Gemmatimonas</i> sp.	0,66	1,10	1,74	0,89
<i>Bacteria</i> genus NA	9,02	15,43	13,08	13,56
<i>Archaea</i> genus NA	4,22	2,50	5,95	4,47
<i>Rhizobium</i> sp.	25,83	6,04	13,14	6,33
<i>Proteobacteria</i> genus NA7	14,90	3,55	3,60	3,80
<i>Proteobacteria</i> genus NA24	2,15	4,20	2,36	3,13
<i>Proteobacteria</i> genus NA30	1,57	1,55	3,35	2,76
<i>Proteobacteria</i> genus NA6	1,41	0,05	0,12	0,15
<i>Proteobacteria</i> genus NA28	0,75	1,35	0,43	1,04
<i>Pseudomonas</i> sp.	0,66	0,45	0,74	1,34
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,58	0,85	0,93	0,60
<i>Proteobacteria</i> genus NA15	0,50	1,00	1,43	1,27
<i>Sphingomonas</i> sp.	0,41	0,95	0,50	1,27
<i>Proteobacteria</i> genus NA36	0,41	1,45	0,68	1,27
<i>Proteobacteria</i> genus NA34	0,33	1,00	0,93	0,97
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	0,17	1,05	0,12	1,42
<i>Verrucomicrobia</i> genus NA2	1,08	2,20	1,12	1,19

Рис. 2. Теплокарта доминирующих прокариотических микроорганизмов дерново-подзолистой почвы (на уровне рода) на участках многолетнего опыта под посевами озимой ржи в зависимости от технологии выращивания: I — в севообороте с известкованием почвы, II — бессменная культура с известкованием почвы, III — в севообороте без известкования почвы, IV — бессменная культура без известкования почвы; градации цвета от белого до темно-серого — относительная численность микроорганизмов (в процентах) соответственно  $\leq 1$ ; 1,01-5; 5,01-10 и  $> 10$  (опытное поле РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва, 2010 год).

Согласно кривым доминирования (разнообразия) прокариотного комплекса в почве, наибольшее видовое богатство прокариотических микроорганизмов обнаружили под бессменной культурой ржи (рис. 3). В посевах ржи, выращиваемой в условиях шестипольного севооборота, оно было существенно ниже. Низкое видовое богатство в последнем случае, по-видимому, объясняется тем, что предшественниками ржи были лен и парующее поле, где поступление в почву свежего органического вещества как источника питания и энергетического материала микроорганизмов крайне ограничено. Эти наблюдения позволяют сделать вывод об определенном влиянии предшественника на видовое богатство и разнообразие прокариотического комплекса микроорганизмов почвы в посевах озимой ржи.

Во всех вариантах опыта доминирующее положение среди протеобактерий занимал род *Rhizobium*. Филогенетически *Rhizobium* очень близок к родам *Agrobacterium* и *Allorhizobium*, входящим в семейство *Rhizobiaceae*, которые в настоящее время объединены в филогенетическую группу *Rhizobium—Agrobacterium*. Более того, J.M. Young с соавт. (21) на основании филогенетического сходства предложили объединить эти бактерии в один род — *Rhizobium*. Полученные нами результаты о доминирующем положении

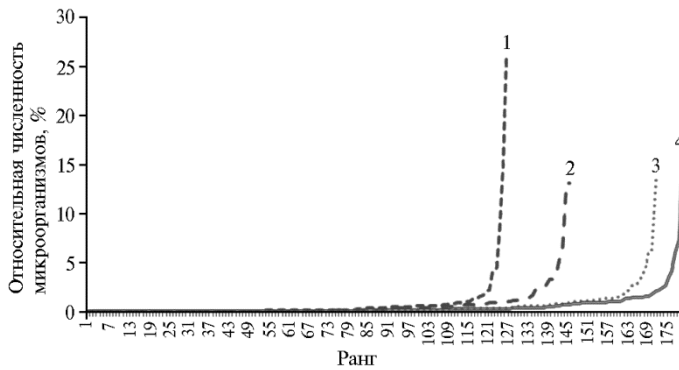


Рис. 3. Кривые доминирования (разнообразия) прокарриотного комплекса в дерново-подзолистой почве на участках многолетнего опыта под посевами озимой ржи в зависимости от технологии выращивания: 1 — в севообороте с известкованием почвы, 2 — в севообороте без известкования почвы, 3 — бессменная культура с известкованием почвы, 4 — бессменная культура без известкования почвы

(опытное поле РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва, 2010 год).

бактерий рода *Rhizobium* в почве под покровом озимой ржи следует рассматривать, по меньшей мере, как доминирующее положение бактерий группы *Rhizobium—Agrobacterium*, учитывая степень их родства и разрешающую способность используемого нами метода.

Значительное количество микроорганизмов из этой группы в почве и ризосфере растений отмечали многие авторы. По мнению М. Садовски с соавт. (22), клубеньковые бактерии (*Rhizobium* sp. и *Bradirhizobium* sp.) достаточно широко распространены и составляют до 8,0 % от общего количества бактерий в почве. О наличии представителей *Rhizobiaceae*, в том числе клубеньковых бактерий, в ризосфере и корнях злаковых культур сообщалось в ряде работ (18, 23, 24). Некоторые исследователи называют клубеньковые бактерии эндофитами злаковых культур (25-27). А.О. Зверев с соавт. (18) на основе филогенетического анализа обнаружили в ризосфере 42-суточной культуры озимой ржи клубеньковые бактерии рода *Mezorhizobium*, относящиеся к этому семейству. Ни в одном случае не был выявлен патогенез озимой ржи, вызванный *Agrobacterium tumefaciens* (28).

Наличие семейства *Rhizobiaceae* в почве под посевами озимой ржи в длительных опытах, по нашему мнению, объясняется тем, что в условиях шестипольного севооборота два поля были заняты клевером. Клубеньковые бактерии, присутствующие в посевах клевера, пережили период, когда почва была занята предшественниками озимой ржи (лен, чистый пар), и нашли благоприятные условия для своего развития под покровом этой культуры. Последнее с биологической точки зрения представляет интерес для оценки адаптации и выживаемости клубеньковых бактерий в агроценозах.

Что касается бессменной культуры ржи, то следует отметить, что перед закладкой опыта 100 лет назад это поле было несколько лет занято клевером (20). Кроме того, бактерии рода *Rhizobium* могут существовать в почве, не фиксируя атмосферный азот. Возможно, клубеньковые бактерии адаптировались и прижились в ризосфере растений как ассоциативные эндосимбионты. Наличие такой ассоциации с зерновыми колосовыми культурами клубеньковых бактерий *Bradirhizobium* sp., *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp. отмечено в других работах (25, 27). Нельзя исключить и то, что в бессменной культуре ржи за 100 лет сформировалась своя микрофлора, важным компонентом которой стали бактерии семейства *Rhizobiaceae*. Отсюда вытекает интерес для глубокого анализа эволюции взаимоотношений *Rhizobiaceae* с зерновыми культурами, в частности с озимой рожью, и прикладное значение этих исследований. Так, на основе непатогенной *Agrobacterium radiobacter* уже созданы биопрепараты, которые успешно используются на посевах злаковых культур (29).

Известкование практически не оказывало влияния на видовое богатство в посевах бессменной ржи, но резко снижало его в севообороте (см. рис. 3). Мы не обнаружили прямой зависимости биоразнообразия прокариот от величины рН. Крупные таксоны на уровне фил присутствовали во всех вариантах опыта. Изменение филогенетической структуры прокариот наблюдались на уровне рода, вида и штамма микроорганизмов. Так, при известковании снижалась относительная численность одних видов ацидобактерий, но увеличивалось количество других, что свидетельствует о перегруппировке таксономического состава прокариот. Это несколько противоречит традиционной точке зрения о безусловном положительном влиянии известкования кислых почв на микрофлору (30, 31). Однако следует отметить, что в последние годы накоплен материал, который дает противоречивую оценку действия известкования на сообщество почвенных микроорганизмов. Если по данным одних авторов (32, 33) известкование повышало биомассу микроорганизмов и интенсивность дыхания почвы, то другие исследователи (34) показали, что изменения рН красноземов как в кислую, так и в щелочную сторону приводило к снижению биомассы микроорганизмов. В работе N. Kennedy с соавт. (35) наряду с увеличением микробиологической активности при известковании наблюдалось изменение филогенетической структуры и снижение разнообразия бактериального сообщества почвы. Неодинаковое действие известкования на филогенетическое разнообразие прокариот под покровом разных растений отмечали И.О. Корвиго с соавт. (7). В частности, в звене севооборота картофеля и льна (предшественников озимой ржи) известкование приводило к снижению разнообразия прокариот, что соответствует результатам наших исследований.

Таким образом, анализ филогенетической структуры и разнообразия прокариотических микроорганизмов дерново-подзолистой почвы в условиях многолетней культуры ржи показал, что растение служит основным фактором формирования прокариотического сообщества. Независимо от агротехнических приемов, под покровом озимой ржи в фазу колошения складывается одинаковый по структуре коровый комплекс прокариот, включающий небольшое число видов протеобактерий и актинобактерий. Доминирующее положение среди них занимают бактерии семейства *Rhizobiaceae*, в частности род *Rhizobium*, входящий в филогенетическую группу *Rhizobium—Agrobacterium*, что в определенной степени связано с историей опытного поля. По-видимому, бактерии этого семейства, прежде всего клубеньковые, находят в ризосфере ржи благоприятные условия для развития. Влияние известкования на структуру сообщества прокариот кислых почв может быть разным. Существенное значение, по-видимому, имеет конкретный вид растений, а также история поля (севооборот, бессменная культура, система удобрений и т.д.). Дальнейшие исследования жизнеспособности *Rhizobiaceae* в посевах озимой ржи и их эволюции в сторону ассоциативных эндосимбиотических взаимоотношений с растениями ржи в процессе длительного совместного существования представляют несомненный научный интерес.

*Авторы выражают глубокую благодарность заведующему кафедрой земледелия и опытного дела РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева профессору М.А. Мазирову и профессору Н.Ф. Хохлову за помощь и предоставленную возможность отбора почвенных образцов на поле длительного многофакторного опыта, заложенного А.Г. Дояренко в 1912 году.*

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
микробиологии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: doumova@mail.ru ✉, yuvkruglov@yandex.ru, eeandr@gmail.com

Поступила в редакцию  
12 июня 2018 года

## PHYLOGENETIC STRUCTURE OF COMMUNITY OF PROCARIOTS OF SODDY-PODZOLIC SOIL UNDER THE COVER OF WINTER RYE IS NOT INFLUENCED BY AGROTECHNICS

V.A. Filippova, Yu.V. Kruglov, E.E. Andronov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail: doumova@mail.ru (✉ corresponding author), yuvkruglov@yandex.ru, ceandr@gmail.com

ORCID:

Filippova V.A. orcid.org/0000-0001-8789-9837

Andronov E.E. orcid.org/0000-0002-5204-262X

Kruglov Yu.V. orcid.org/0000-0001-9259-3701

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors express deep gratitude to Prof. M.A. Mazirov, the Head of the Department of agriculture and experimental work of the Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agricultural Academy, and Prof. N.F. Khokhlov for their help and the opportunity to collect soil samples on plots of the long-term experiment established by Prof. A.G. Doyarenko in 1912

Supported financially within the state project № 0664-2018-0023 and № 0664-2017-0050

Received June 12, 2018

doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.994eng

### Abstract

Soil microbial communities are complex multicomponent systems that form under the influence of a wide range of factors, among them — soil type, plant species, climate, agricultural technology — in general, determining the physical and chemical characteristics of the environment. The plant, according to many researchers, is the main factor determining the structure of the soil microbial community, due to the extensive number of compounds released into the soil. There is still a discussion about the specific nature of the action of various plants on soil microbiome, which is very important both for understanding the mechanism of interaction of microorganisms and plants, and for building optimal crop rotations, as well as organizing measures to protect agricultural crops from phytopathogenic microorganisms and pests. Winter rye is one of the few crops that can grow continuously for decades. It has a powerful root system, comparable to the biomass of the above-ground part of plants. The root excretions of winter rye reach 21 % of the synthesized plant mass. This paper presents the results of research aimed at studying the phylotypical structure and diversity of prokaryotic microorganisms in rye crops grown in permanent culture and six-field crop rotation for almost 100 years, in the long-term multifactorial field experiment of the Moscow Timiryazev Agricultural Academy. The aim of our work was to study the influence of various agricultural technicians such as crop rotation and liming, under the conditions of a long field experiment on the phylogenetic structure of prokaryotic microorganisms in rye crops. The results of the high-throughput DNA sequencing of the soil microbiome and the subsequent analysis of the phylogenetic structure and diversity of the prokaryotic microorganisms of the sod-podzolic soil under the conditions of perennial rye culture showed that the plant is one of the key factors in the formation of the prokaryotic community. Regardless of the agrotechnical methods under the cover of winter rye, the same core structure of prokaryotes, including a small number of types of proteobacteria and actinobacteria, develops in the earing phase. The dominant position among them is occupied by the bacteria of the *Rhizobiaceae* family, which in this case is to some extent related to the history of the experimental field. Apparently, the bacteria of this family and, above all, the nodule bacteria, find favorable conditions for their development in the rye rhizosphere. It is possible that a kind of associative symbiosis is formed between them, which was observed by some authors with other cereal crops. In this connection, studies of the viability of *Rhizobiaceae* in winter rye crops, and their evolution to associative endosymbiotic relationships with rye in the course of a long coexistence are of undoubted interest. The effect of liming on the genetic structure of the prokaryote community of acidic soils may be different. At the same time, apparently, the specific type of plants, as well as the history of the field (crop rotation, permanent culture, fertilizer system, etc.) are of significant importance.

Keywords: phylogenetic structure, biodiversity of prokaryotes, *Rhizobium* sp., *Proteobacteria*, sod-podzolic soil, winter rye.

### REFERENCES

1. Dobrovolskii G.V., Nikitin E.D. *Ekologiya pochv. Uchenie ob ekologicheskikh funktsiyakh pochv.* Moscow, 2012 (in Russ.).
2. Prashar P., Kapoor N., Sachdeva S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2014, 13(1): 63-77 (doi: 10.1007/s11157-013-9317-z).



3. Minz D., Ofek M., Hadar Y. Plant rhizosphere microbial communities. In: *The prokaryotes: prokaryotic communities and ecophysiology*. E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, 2013: 57-84.
4. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. Structure and function of bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2013, 64: 807-838 (doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106).
5. Garbeva P., van Veen J.A., van Elsas J.B. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2004, 42: 243-270 (doi: 10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455).
6. Mazirov M.A., Arefeva V.A. V sbornike: *Dlitel'nyi polevoi opyt 1912-2012 g. Teoreticheskie i tekhnologicheskie osnovy vosproizvodstva plodorodnaya pochvy i urozhainost' sel'skokhozyaistvennykh struktur* [A long-term field experiment of 1912-2012. Fundamentals and technologies of soil fertility management and crop production]. Moscow, 2012: 23-31 (in Russ.).
7. Korvigo I.O., Pershina E.V., Ivanova E.A., Matyuk N.S., Savos'kina O.A., Chirak E.L., Provorov N.A., Andronov E.E. *Mikrobiologiya*, 2016, 85(2): 199-210 (in Russ.).
8. Stikhin M.F., Denisov P.V. *Ozimaya rozh' i pshenitsa v Nechernozemnoi polose* [Winter rye and wheat in the Nonchernozem region]. Leningrad, 1977 (in Russ.).
9. Krasil'nikov N.A. *Mikroorganizmy pochvy i vysshie rasteniya* [Soil microorganisms and higher plants]. Moscow, 1958 (in Russ.).
10. Marschner H. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London, 1995.
11. Niemeyer H.M., Perez F. J. Potential of hydroxamic acids in the control of cereal pests, diseases and weeds. In: *Allelopathy: organisms, processes and applications* (American Chemical Society Symposium Series No. 582). K.M.M.D. Inderjit, F.A. Einhelling (eds.). American Chemical Society, Washington DC, 1995: 261-270.
12. Li X.F., Ma J.F., Matsumoto H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol.*, 2000, 123(4): 1537-1544 (doi: 10.1104/pp.123.4.1537).
13. Niemeyer H.M. Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2h-1,4-benzoxazin-3(4h)-one: key defense chemicals of cereals. *J. Agr. Food Chem.*, 2009, 57(5): 1677-1696 (doi: 10.1021/jf8034034).
14. Pérez FJ, Ormenoñuñez J. Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): possible role in allelopathy. *J. Chem. Ecol.*, 1991, 17(6): 1037-1043 (doi: 10.1007/BF01402932).
15. Rice C.P., Park Y.B., Adam F., Abdul-Baki A.A., Teasdale J.R. Hydroxamic acid content and toxicity of rye at selected growth stages. *J. Chem. Ecol.*, 2005, 31(8): 1887-1905 (doi: 10.1007/s10886-005-5933-6).
16. Mel'nikov N.N. *Pestitsidy. Khimiya, tekhnologiya primeneniya* [Pesticides — chemistry and application]. Moscow, 1987 (in Russ.).
17. Kurek E., Machowicz Z., Kulpa D., Slomka A. The microorganisms of rye (*Secale cereale* L.) rhizosphere. *Acta Microbiologica Polonica*, 1994, 43(2): 251-255.
18. Zverev A.O., Pershina E.V., Provorov N.A., Andronov E.E., Serikova E.N. Metagenomic characteristic of rhizosphere effect on cereals in black and sod-podzolic soils. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(5): 654-663 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.5.654eng).
19. Shirokikh I.G., Merzaeva O.V. *Mikrobiologiya*, 2005, 74(2): 271-275 (in Russ.).
20. Mazirov M.A., Safonov A.F. *Izvestiya MSKHA*, 2010, 2: 68-75 (in Russ.).
21. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 2001, 51: 89-103 (doi: 10.1099/00207713-51-1-89).
22. Sadovsky M., Graham P. V knige: *Rhizobiaceae: molekulyarnaya biologiya bakterii, vzaimodeistviyushchikh s rasteniyem* /Perevod pod red. I.A. Tikhonovicha, N.A. Provorova [In: *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria*. I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov (eds.)]. St. Petersburg, 2002: 101-117 (in Russ.).
23. Höflich G., Tauschke M., Kühn G., Werner K., Frielinghaus M., Höhn W. Influence of long-term conservation tillage on soil and rhizosphere microorganisms. *Biol. Fert. Soils*, 1999, 29(1): 81-86 (doi: 10.1007/s003740050528).
24. Mia M., Shamsuddin Z. *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. *Afr. J. Biotechnol.*, 2010, 9(37): 6001-6009.
25. Cocking E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil*, 2003, 252(1): 169-175 (doi: 10.1023/A:1024106605806).
26. Yanni Y.G., Rizk R.Y., Corich V., Squartini A., Ninke K., Philip-Hollingsworth S., Orgambide G., de Bruijn F., Stoltzfus J., Buckley D., Schmidt T.M., Mateos P.F., Ladha J.K., Dazzo F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of potential to promote rice growth. *Plant Soil*, 1997, 194(1-2): 99-114 (doi: 10.1023/A:1004269902246).
27. Robinson R., Fraaije B., Clark I., Jackson R., Hirsch P. Mauchline T. Endophytic bacterial

- community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant and Soil*, 2015, 405(1-2): 381-396 (doi: 10.1007/s11104-015-2495-4).
28. Schroth M.N., Thomson S.V., Weinhold A.R Behavior of plant pathogenic in rhizosphere and non rhizosphere soils. In: *Ecology of root pathogens*. S.V. Krupa, Y.R. Domergues (eds.). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, NY, 1979: 105-138.
  29. *Biopreparaty v sel'skom khozyaistve: metodologiya i praktika primeneniya mikroorganizmov v rastenievodstve i kormoproizvodstve* /Pod redaktsiei I.A. Tikhonovicha, Yu.V. Kruglova [Biological products in agriculture: the methodology and practice of the use of microorganisms in crop production and feed production. I.A. Tikhonovich, Yu.V. Kruglov (eds.)]. Moscow, 2005.
  30. Mishustin E.N. *Mikroorganizmy i plodorodie pochvy* [Microorganisms and soil fertility]. Moscow, 1956 (in Russ.).
  31. Poshon ZH., De Barzhak G. *Pochvennaya mikrobiologiya* [Soil microbiology]. Moscow, 1960 (in Russ.).
  32. Nebol'sin A.N., Nebol'sina Z.P. *Izvestkovanie pochv* [Soil liming]. St. Petersburg, 2010 (in Russ.).
  33. Mühlbachová G., Tlustoš P. Effects of liming on the microbial biomass and its activities in soils long-term contaminated by toxic elements. *Plant Soil Environ.*, 2006, 52(8): 345-352.
  34. Chen G.C., He Z. Effects of pH on microbial biomass -C and -P in red soils. In: *The red soils of China*. M.J. Wilson, Z. He, X. Yang (eds.). Springer, Dordrecht, 2004: 307-314.
  35. Kennedy N., Brodie E., Connolly J., Clipson N. Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. *Environ. Microbiol.*, 2005, 7(6): 780-788 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00748.x).