



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



СРАВНЕНИЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ НА ОБРАБОТКУ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ПРОДУЦИРУЮЩИМИ АУКСИНЫ И ЦИТОКИНИНЫ

**Ахтямова З.А., Архипова Т.Н.,
Мартыненко Е.В.**

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН
E-mail: akhtyamovazarina@gmail.com

Изучалось влияние бактеризации проростков растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) штаммами грамположительных аэробных спорообразующих цитокининпродуцирующих бактерий *Bacillus subtilis* IB-22 и грамотрицательных ауксинпродуцирующих бактерий *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14. Проводилась оценка параметров роста корней и побегов растений, а также относительного содержания воды и хлорофилла в листьях. Бактерии *P. mandelii* IB-Ki14 проявляли свой рост стимулирующий эффект в первые дни после бактеризации, к концу эксперимента он уже не проявлялся. Наиболее стабильным эффектом от обработки штаммом *B. subtilis* IB-22 было укорочение корней растений, сохраняющееся на протяжении всего эксперимента. Благоприятное действие бактерий штамма *B. subtilis* IB-22 на растения ячменя проявлялось в их влиянии на относительное содержание воды и концентрацию хлорофилла. Повышение концентрации хлорофилла в листьях способствовало более быстрому накоплению биомассы растений, обработанных бактериями штамма *B. subtilis* IB-22. Таким образом, данная работа свидетельствует о большей эффективности штамма *B. subtilis* IB-22 в стимуляции роста растений ячменя и связанных с ним физиологических процессов.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., рост, рост-стимулирующие бактерии

COMPARISON OF THE REACTION OF BARLEY PLANTS TO TREATMENT BY MICRO-ORGANISMS PRODUCING AUXINS AND CYTOKININS

**Akhtyamova Z.A., Arkhipova T.N.,
Martynenko E.V.**

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: akhtyamovazarina@gmail.com

The effect of bacterization of seedlings of a barley plant (*Hordeum vulgare* L.) with strains of gram-positive aerobic spore-forming cytokinin-producing bacteria *Bacillus subtilis* IB-22 and gram-negative auxin-producing bacteria *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 was studied. The growth parameters of the roots and shoots of plants, as well as the relative content of water and chlorophyll in the leaves, were evaluated. Bacteria *P. mandelii* IB-Ki14 showed their growth stimulating effect in the first days after bacterization, it no longer appeared by the end of the experiment. The most stable effect from treatment with *B. subtilis* IB-22 strain was the shortening of plant roots, which persisted throughout the experiment. The beneficial effect of bacteria of *B. subtilis* IB-22 strain on barley plants was manifested in their effect on the relative water content and concentration of chlorophyll. An increase in the concentration of chlorophyll in the leaves contributed to a more rapid accumulation of plant biomass treated with bacteria of the *B. subtilis* IB-22 strain. Thus, this work demonstrates the greater effectiveness of the *B. subtilis* IB-22 strain in stimulating the growth of barley plants and the associated physiological processes.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., growth, plant growth-promoting bacteria (PGPR)

Поступила в редакцию: 13.03.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-1-66-73](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-66-73)

ВВЕДЕНИЕ

Способность многих штаммов ризосферных бактерий стимулировать рост растений и повышать их урожайность все шире используют в растениеводстве (Belimov et al., 2009; Backer et al., 2018; Arkhipova et al., 2019). Препараты на основе PGPR микроорганизмов называют биоудобрениями благодаря способности этих бактерий фиксировать азот и

повышать растворимость фосфатов, обеспечивая тем самым растения этими макроэлементами (Korshunova et al., 2017; Kudoyarova et al., 2017). Вместе с тем, благоприятное действие бактерий может быть обусловлено их прямым влиянием на рост растений через продукцию ими фитогормонов (Lara-Chavez et al., 2015; Ambreetha et al., 2018; Jatan et al., 2018). Эта точка зрения довольно популярна. Ее доказательством послужили эксперименты с мутантами арабидопсиса, у которых нарушения в области гормональной системы снижали эффективность действия рост регулирующих бактерий (Ortiz-Castro et al., 2008; Porcel et al., 2014). В то же время такого рода исследования не проводили на однодольных растениях, хотя именно растения этого класса, куда входит семейство злаковых (пшеница, ячмень, кукуруза) наиболее важны для растениеводства. Проведенные нами исследования на растениях пшеницы показали способность бактерий, продуцирующих цитокинины (Arkhipova et al., 2005) и ауксины (Kudoyarova et al., 2017), активировать рост и повышать урожайность растений пшеницы. Вместе с тем, сложная организация генома пшеницы затрудняет получение мутантов и работу с ними.

В этом плане растения ячменя более привлекательны благодаря доступности мутантов растений этого вида. Ранее дефицитные по АБК мутанты ячменя были использованы в работе лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Однако реакцию растений ячменя на бактеризацию изучали лишь в связи с деструкцией загрязнения нефтью (Бакаева и др., 2019), и детального изучения влияния бактерий на рост растений ячменя не проводилось.

Цель данной работы состояла в детальной оценке ростовой реакции побегов и корней растений ячменя на бактеризацию их проростков и в выявлении особенностей реагирования растений на обработку бактериями, способными преимущественно продуцировать цитокинины или ауксины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта использовались проростки растений ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Прерия. Для инокуляции растений использовали грамположительные аэробные спорообразующие цитокининпродуцирующие бактерии *Bacillus subtilis* IB-22 (Архипова и др., 2006) и грамотрицательные ауксинпродуцирующие и фосфатмобилизующие бактерии *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 (Кузьмина и др., 2018) из коллекции микроорганизмов Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Бактериальные препараты получали культивированием штаммов на средах: *B. subtilis* IB-22 – на среде K1G (Кузьмина и др., 2015), *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 – на среде Кинг Б (King et al., 1954). Штаммы микроорганизмов культивировали в колбах Эрленмейера с соответствующей питательной средой на шейкере (160 об/мин): бациллы – в течение 72 ч при температуре 37°C, грамотрицательные бактерии – 48 часов при 28°C. Биомассу отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об/мин, разводили в водопроводной воде, создавая плотность инокулята при обработке 10⁶ КОЕ.

Для работы использовали вегетационные сосуды объемом 0,5 л. На дне сосудов для дренажа размещали слой гальки (100 г), отделяя его от песка (690 г) 2-слойной сеткой для предотвращения перемешивания почвы и гравия и ухудшения воздушного режима почвы, Перед посадкой песок пропитывали 100%-ным питательным раствором Хогланда-Арнона до 90% от полной влагоемкости (ПВ).

Бактеризацию суточных проростков проводили путем замачивания в суспензии в течение 20 минут и последующим внесением суспензии бактерий в прикорневую среду растений (10^6 КОЕ /г почвы). Контролем служили растения ячменя без бактериальной обработки. В сосуды помещали по 10 проростков ячменя. Затем сосуды выставляли на светоплощадку при 14 ч фотопериоде, освещенности $400 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ фотосинтетически активной радиации (ФАР) и температуре 25/20 °С (день/ночь). Растения ежедневно поливали водопроводной водой/10%-ным питательным раствором Хогланда-Арнона до 80% ПВ.

Рост растений (длину и ширину листьев) ячменя оценивали каждые двое суток. На одиннадцатые сутки с начала эксперимента оценивали сырую массу побегов и корней, длину и ширину листьев, длину самого длинного корня, а также относительное содержание воды и хлорофилла в листьях.

Для определения относительного содержания воды (ОСВ) листа (брали второй лист пяти растений) взвешивали, погружали основанием в дистиллированную воду, налитую в стеклянный сосуд, который затем закрывали для насыщения воздуха влагой и помещали в темноту на ночь. Через 24 часа листья взвешивали для определения тургорной массы, высушивали и рассчитывали относительное содержание воды по формуле:

$$\text{ОСВ} = (\text{сырая масса} - \text{сухая масса}) / (\text{тургорная масса} - \text{сухая масса}) \%$$

Для измерения содержания хлорофилла в эпидерме листьев ячменя использовали прибор DUALEX SCIENTIFIC+ (FORCE-A, France). Измерения проводили в средней части второго листа.

Площадь листьев определяли с помощью программы Image J.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

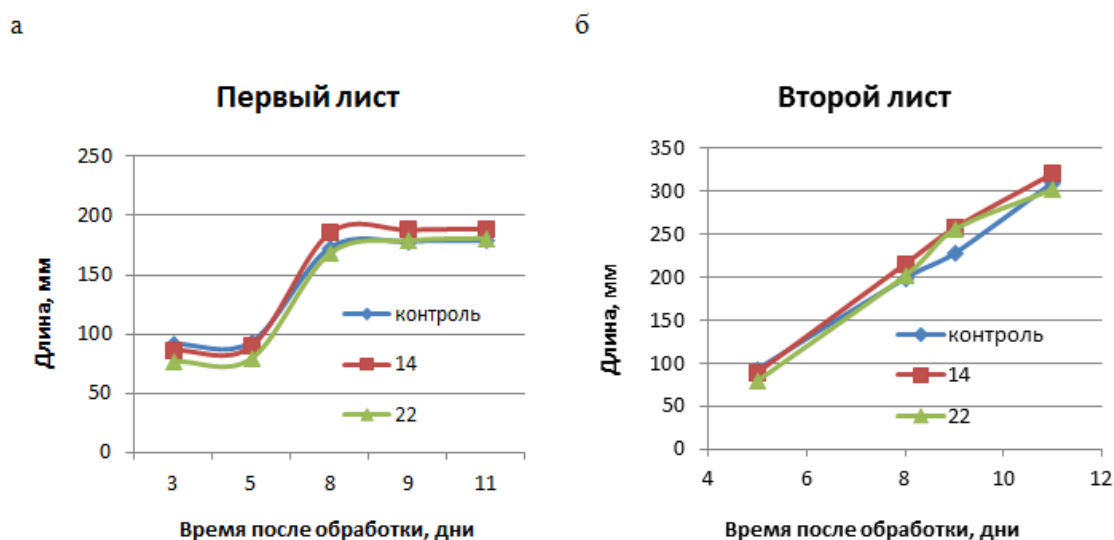


Рис. 1. Длина первого (а) и второго (б) растений ячменя при интродукции в ризосферу гормонпродуцирующих бактерий - *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22.

На третий день после бактериальной обработки проростки находились на стадии выхода первого листа, что позволило начать с этого дня измерение длины листьев. На третий и пятый день первый лист обработанных бактериями растений был короче, чем в контроле (различия были достоверны в случае штамма *B. subtilis* IB-22, $p \leq 0.5$, $n=50$) (рис. 1а). Очевидно, в первое время своего действия на растения бактерии проявляли слабо

патогенные свойства, ингибируя рост листьев. Позднее обработанные бактериями растения догоняли контроль по длине первого листа, а в случае штамма *P. mandelii* IB-Ki14 парный тест показал достоверно большую длину первого листа по сравнению с контролем (8-11 день, $p=0,03$, $n=15$). В целом влияние бактерий на рост первого листа было слабым, что можно объяснить тем, что первый лист закладывается при формировании зерновки и может быть менее чувствительным к внешним воздействиям.

Второй лист появился на пятые сутки, и измерение его длины так же, как и в случае первого листа, выявило ингибирование его удлинения под влиянием бактерий (у *B. subtilis* IB-22 лист был достоверно короче, чем в контроле, $p=0,003$, $n=50$) (рис. 1б). Позднее проявлялось стимулирующее действие бактериализации на удлинение листа, и на девятый день второй лист был достоверно длиннее у растений, обработанных обоими штаммами бактерий ($p \leq 0,5$, $n=10$). Однако затем различия между контрольными и обработанными растениями сглаживались. В конце эксперимента более длинными по сравнению с контролем были лишь третьи листья растений, обработанных бактериями *B. subtilis* IB-22 ($p=0,03$, двухпарный т-тест).

Представляет интерес то, что бактериализация более заметно сказывалась на ширине листьев.

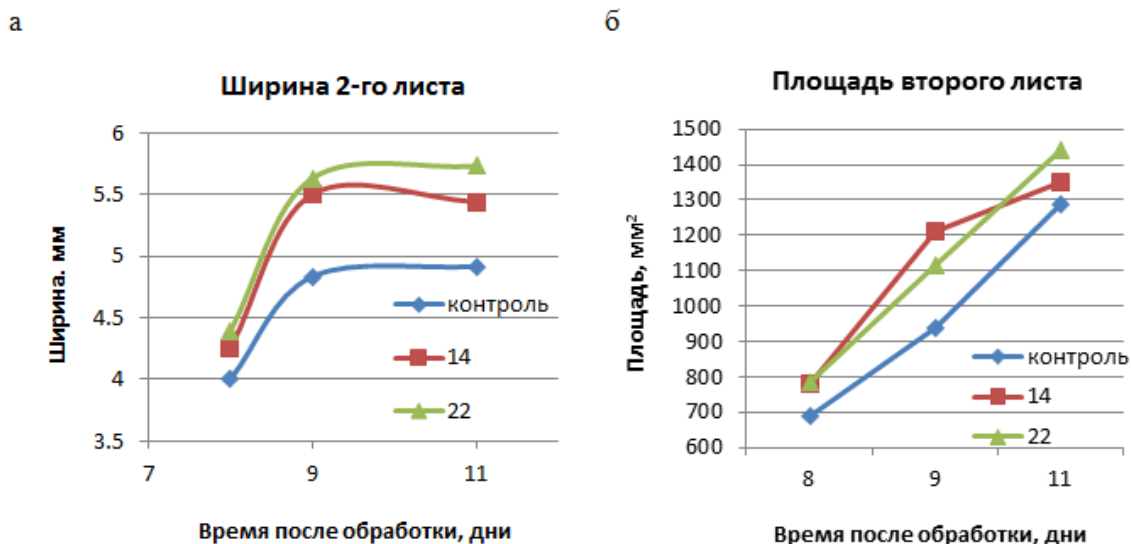


Рис. 2. Ширина (а) и площадь (б) второго листа растений ячменя при интродукции в ризосферу гормонпродуцирующих бактерий - *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22.

На девятый день ширина второго листа обработанных растений была на 15 % больше, чем в контроле при обработке ячменя обоими штаммами. В конце эксперимента (на 11 день) прибавка в ширине второго листа сохранялась только в случае штамма *B. subtilis* 22 ($p=0,04$, т-тест). Стимулирующее влияние бактерий на оба показателя, определяющих площадь листьев: (удлинение листьев и их рост в ширину), обеспечило на девятый день 30 %-ную прибавку площади второго листа (по сравнению с контролем) у растений, обработанных бактериями штамма *P.mandelii* IB-Ki14 и 15%-ную прибавку – в случае *B. subtilis* IB-22 ($p \leq 0,015$, т-тест).

Однако в конце эксперимента картина менялась и только у растений, обработанных *B. subtilis* IB-22, площадь второго листа была больше, чем в контроле ($p=0,025$, т-тест). Наиболее явно влияние бактерий на ширину и площадь проявлялось в случае третьего листа

растений, обработанных *B. subtilis* IB-22. В этом варианте ширина третьего листа и его площадь были в 1,8 раза больше, чем в контроле (рис. 3).

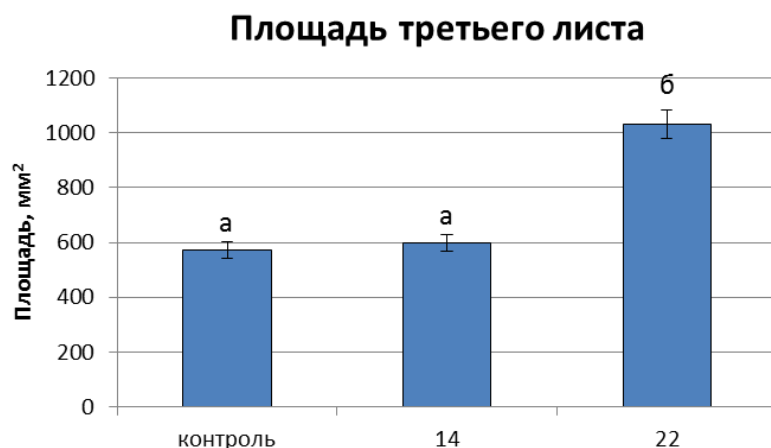


Рис. 3. Площадь третьего листа растений ячменя на 11-е сутки после интродукции в ризосферу гормонпродуцирующих бактерий – *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22. Разные буквы означают достоверное отличие при $p \leq 0.001$, $n=30$.

Влияние бактерий на накопление массы побега и корня проявлялось не сразу и было достоверным в случае обработки штаммом *B. subtilis* IB-22 на 11-ый день после начала эксперимента (рис. 4): сырая масса побега и корней увеличилась на 18 % и на 14 % соответственно ($p=0,006$, т-тест). При обработке – *P. mandelii* IB-Ki14 на 11 сутки наблюдалась тенденция увеличения массы побега.

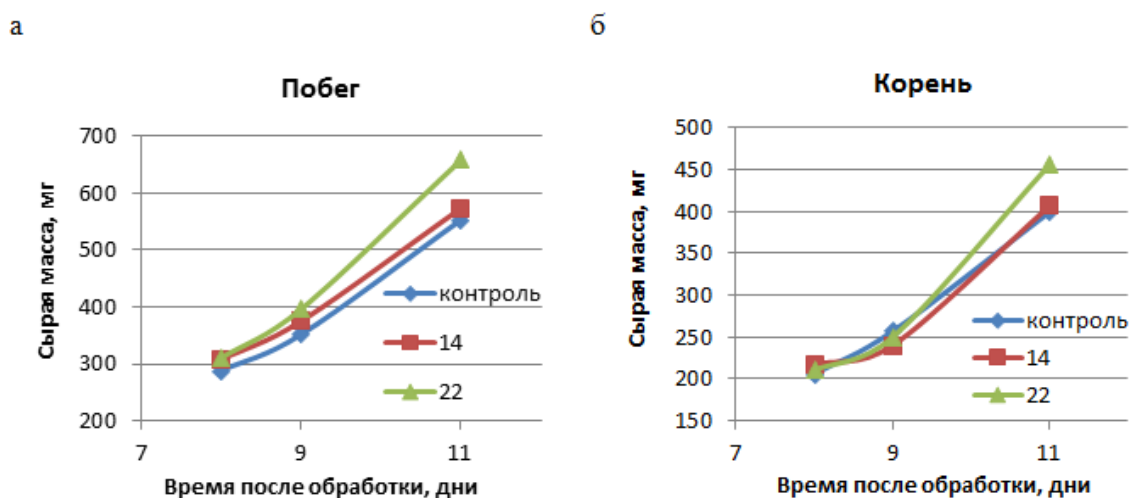


Рис. 4. Сырая масса побега (а) и сырая масса корня (б) растений ячменя при интродукции в ризосферу гормонпродуцирующих бактерий – *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22.

Наиболее стабильным эффектом от бактериализации было укорочение корней растений, обработанных бактериями штамма *B. subtilis* IB-22 (рис. 5). Этот эффект проявлялся при всех трех измерениях, начиная с восьмого дня, и соответствовал ранее полученным данным о способности бактерий этого штамма укорачивать корни растений салата (Arkhipova et al., 2005). Эти свойства бактерий данного штамма можно объяснить их способностью продуцировать цитокинины и повышать уровень этого гормона в корнях растений (Kudoyarova et al., 2014). Как известно, цитокинины способствуют замедлению удлинения корней (Werner et al., 2010).

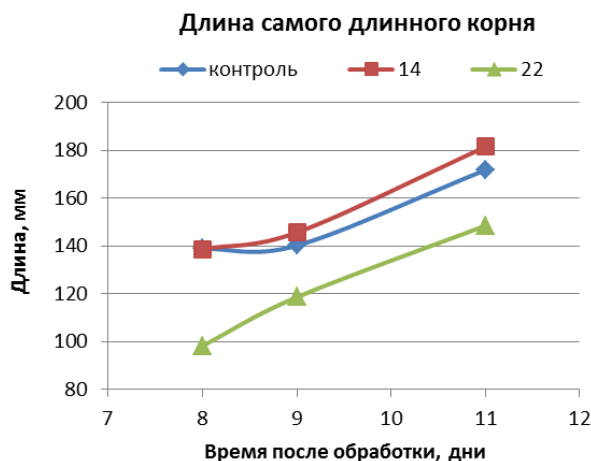


Рис. 5. Длина самого длинного корня растений ячменя при интродукции в ризосферу гормонпродуцирующих бактерий – *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22.

Анализ результатов оценки длины листьев и массы побега и корней свидетельствует о том, что стимулирующее влияние бактерий штамма *B. subtilis* IB-22 на рост растений проявлялось не сразу и было более заметным в конце эксперимента. Эти результаты можно объяснить тем, что требовалось время для колонизации ризосферы бактериями, после чего продуцируемые ими гормоны могли оказать влияние на рост растений. Хотя бактерии *P. mandelii* IB-Ki14 проявляли свой рост стимулирующий эффект в первые дни после бактериализации, к концу эксперимента он уже не проявлялся. Эти результаты можно также объяснить тем, что бактерии этого штамма оказались менее способны колонизировать ризосферу растений. Ранее нами было показано, что растений штамма *B. subtilis* IB-22 проявляют способность к эффективной колонизации ризосферы пшеницы (Arkhipova et al., 2019). Дальнейшие исследования должны быть направлены на то, чтобы оценить степень колонизации ризосферы растений ячменя бактериями.

Благоприятное действие бактерий штамма *B. subtilis* IB-22 на растения ячменя проявлялось в наших экспериментах в их влиянии на относительное содержание воды и концентрацию хлорофилла (рис. 6).

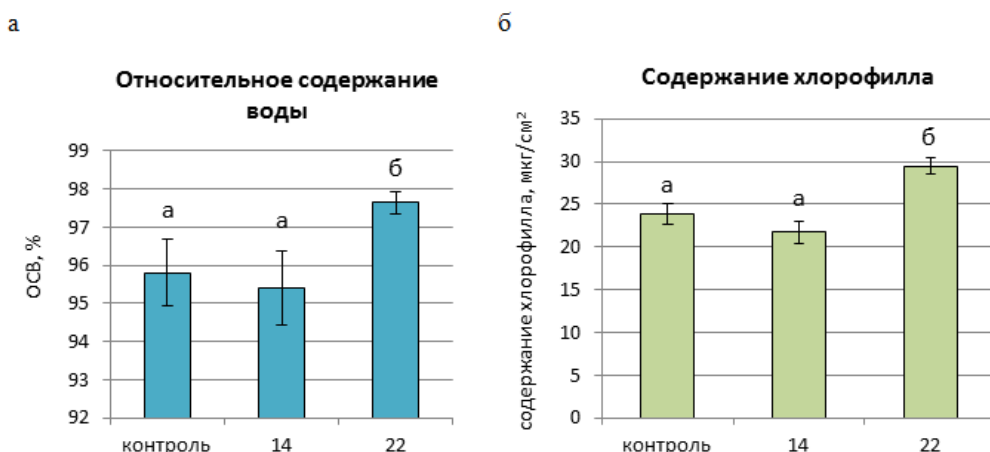


Рис. 6. Относительное содержание воды (а) и содержание хлорофилла (б) во втором листе растений ячменя на 11-е сутки после интродукции в ризосферу гормонпродуцирующих бактерий – *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22. Разные буквы означают достоверное отличие при $p \leq 0.04$, $n=10$.

Как видно из рис. 6а, относительное содержание воды было выше у растений, обработанных бактериями штамма *B. subtilis* IB-22. Растения этого варианта имели более короткие корни (рис.5), но их вес был больше, чем в контроле (рис. 4б). Ранее нами было выявлено повышенное содержание воды у растений салата, обработанных бактериями штамма *B. subtilis* IB-22 (Мартыненко, 2009). Важно понять, каков механизм этого эффекта. Дальнейшие исследования должны быть направлены на оценку площади поглощения корней растений. Альтернативное объяснение повышения способности растений обеспечивать себя водой может заключаться в повышении гидравлической проводимости, оценка которой также должна стать предметом дальнейших исследований.

Повышение концентрации хлорофилла в листьях способствует активации фотосинтеза, обеспечивающего накопление биомассы растениями, и повышенный уровень хлорофилла мог способствовать более быстрому накоплению биомассы растений, обработанных бактериями штамма *B. subtilis* IB-22.

Таким образом, проделанная нами работа свидетельствует о большей эффективности штамма *B. subtilis* IB-22 по сравнению с *P. mandelii* IB-Ki14 в стимуляции роста растений ячменя и связанных с ним физиологических процессов. Большую эффективность бактерий *B. subtilis* IB-22 можно объяснить тем, что они преимущественно синтезировали цитокинины, а *P. mandelii* IB-Ki14 – ауксины. Вместе с тем, различия в эффективности бактерий этих штаммов могли быть связаны с их способностью колонизировать ризосферу растений. Какое из этих объяснений более вероятно, должны показать дальнейшие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И. и др. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. 2006. Т. 53. №4. С. 567–573.
2. Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф. Потенциал растений ячменя и продуцирующих ауксины штаммов бактерий-деструкторов углеводов в биоремедиации нефтезагрязненных почв // Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием, г. Уфа, 1-4 октября 2019 г. С. 362
3. Высоцкая Л.Б., Архипова Т.Н., Кузина Е.В. и др. Сравнение реакции растений различных видов на нефтяное загрязнение // Биомика. 2019. Т.11(1). С. 86–100. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-06
4. Кузьмина Л.Ю., Высоцкая Л.Б., Галимзянова Н.Ф. и др. Новые штаммы фосфатмобилизующих бактерий, продуцирующих ауксин, перспективные для сельскохозяйственной биотехнологии // Известия УНЦ РАН. 2015. №1. С. 40–46.
5. Кузьмина Л.Ю., Архипова Т.Н., Актуганов Г.Э. и др. Бактерии родов *Advenella*, *Bacillus* и *Pseudomonas* - перспективная основа биопрепаратов для растениеводства // Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 16–19. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-47
6. Мартыненко Е.В. Влияние цитокининпродуцирующих бактерий рода *Bacillus* Cohn на рост растений салата и пшеницы: автореф. дис. к-та. биол. наук. Уфа, 2009. 22 с.
7. Ambreetha S., Chinnadurai C., Marimuthu P. et al. Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture // Rhizosphere 2018. 5. 57–66. DOI: 10.1016/j.rhisph.2017.12.001

8. Arkhipova T.N., Galimsyanova N.F., Yu K. et al. Effect of seed bacterization with plant growth promoting bacteria on wheat productivity and phosphorus mobility in the rhizosphere // *Plant Soil Environ.* 2019. 65. I.6. 313–319. DOI: [10.17221/752/2018-PSE](https://doi.org/10.17221/752/2018-PSE)
9. Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants // *Plant Soil* 2005. 272. 201–209. DOI: [10.1007/s11104-004-5047-x](https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x)
10. Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // *Front. Plant Sci.* 2018. 9. 1473. DOI: [10.3389/fpls.2018.01473](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473)
11. Belimov A., Dodd I., Safronova V. et al. ACC deaminase-containing rhizobacteria improve vegetative development and yield of potato plants grown under water-limited conditions // *Annals. Appl. Biol.* 2009. 98. 163–169. DOI: [10.1111/aab.12203](https://doi.org/10.1111/aab.12203)
12. Jatan R., Chauhan P.S., and Lata C. *Pseudomonas putida* modulates the expression of miRNAs and their target genes in response to drought and salt stresses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *Genomics.* 2019. 111, 509–519. DOI: [10.1016/j.ygeno.2018.01.007](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.01.007)
13. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // *J. Lab. Clin. Med.* 1954. V.44. P.301–307.
14. Korshunova T.Yu., Mukhamatdyarova S.R., and Loginov O.N. Molecular-genetic and chemotaxonomic identification of the bacterium of the genus *Ohrobactrum* possessing oil-oxidizing and nitrogen-fixing activity // *Biol. Bull.* 2017. 44. 493–500. DOI: [10.1134/S1062359017050090](https://doi.org/10.1134/S1062359017050090)
15. Kudoyarova G.R., Melentiev A.I., Martynenko E.V. et al. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. 83. 285–291. DOI: [10.1016/j.plaphy.2014.08.015](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.015)
16. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N. et al. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants // *Acta Physiol. Plant.* 2017. 39. 253. DOI: [10.1007/s11738-017-2556-9](https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9)
17. Lara-Chavez A., Lowman S., Kim S. et al. Global gene expression profiling of two switchgrass cultivars following inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN // *J. Exp. Bot.* 2015. 66. 4337–4350. DOI: [10.1093/jxb/erv096](https://doi.org/10.1093/jxb/erv096)
18. Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., and López-Bucio J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling // *Plant Signal Behav.* 2008. 3. 263–265. DOI: [10.4161/psb.3.4.5204](https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5204)
19. Porcel R., Zamarrero A.M., Garcia-Mina J.M. et al. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants // *BMC Plant Biol.* 2014. 14. 36. DOI: [10.1186/1471-2229-14-36](https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-36)
20. Werner T., Nehnevajova E., Kollmer I. et al. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco // *Plant Cell.* 2010. 22. 3905–3920. DOI: [10.1105/tpc.109.072694](https://doi.org/10.1105/tpc.109.072694)