



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН ПШЕНИЦЫ ГОРМОНПРОДУЦИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ ПОВЫШАЕТ УРОЖАЙНОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ

Архипова Т.Н., Мартыненко Е.В.,
Шарипова Г.В., Кузьмина Л.Ю.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН
E-mail: TNArkipova@mail.ru

Развитие растений пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорт Башкирская 27) на фоне разного уровня искусственного засоления (2,5 и 5 % раствора NaCl из расчета 10 л/м²) сопровождалось снижением всхожести растений, ингибированием накопления массы растений, уменьшением оводненности первого листа и увеличением осмоляльности побега. Кроме того, было обнаружено накопление АБК, которое происходило в большей степени в корнях, чем в побегах, приводя к изменению соотношения содержания АБК корень/побег с 4,5 до 1,5 по мере усиления стресса. Отрицательные последствия засоления удалось уменьшить за счет предпосевной обработки семян гормонпродуцирующими бактериями - *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 (продуцент ауксинов) и *Bacillus subtilis* IB-22 (продуцент цитокининов).

При обработке семян *B. subtilis* IB-22 относительное содержание воды было таким же, как и у неинокулированных растений на фоне засоления, а у растений, обработанных *P. mandelii* IB-Ki14, оно было ниже, чем в контроле. На фоне максимальной концентрации соли осмоляльность возрастала под влиянием бактерий и была выше у растений, обработанных *P. mandelii* IB-Ki14. При более мягком засолении при обработке штаммами обеих бактерий наблюдалось снижение содержания АБК в побегах до уровня контрольных (выросших на почве без искусственного засоления) растений. При более высоком уровне засоления такое снижение содержания АБК в побегах наблюдалось только на фоне обработки растений *B. subtilis* IB-22. Оптимизация водного баланса под влиянием бактерий на ранних стадиях развития способствовала увеличению урожайности растений на фоне засоления.

Ключевые слова: рострегулирующие ризосферные бактерии, солевой стресс, АБК, пшеница

PRE-SOWING TREATMENT OF WHEAT SEEDS WITH HORMONE-PRODUCING BACTERIA INCREASES THE YIELD OF WHEAT PLANTS UNDER SALINITY

Arkhipova T.N., Martynenko E.V.,
Sharipova G.V., Kuzmina L.Yu.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: TNArkipova@mail.ru

The development of wheat plants (*Triticum durum* Desf., cultivar Bashkirskaya 27) against a background of different levels of artificial salinity (2.5 and 5% NaCl solution at a rate of 10 l/m²) was accompanied by a decrease in plant germination, inhibition of plant mass accumulation, a decrease in the water content of the first leaf, an increase in the osmolality of the shoot and the accumulation of ABA, which occurred to a greater extent in the roots than in the shoots, leading to a change in the ABA content of the root / shoot from 4.5 to 1.5 with increased stress. The negative effects of salinity were reduced by pre-sowing seed treatment with the auxin-producing bacterium *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 or the cytokinin-producing bacterium *Bacillus subtilis* IB 22. When treating seeds with *B. subtilis* IB-22, the RWC was the same as that of uninoculated plants against the background of salinity, and the plants treated with *P. mandelii* IB-Ki14 had lower RWC than in the control. The influence of both bacteria on the accumulation of osmotics was manifested against the background of the maximum salt concentration, when osmolality increased compared to untreated plants and was higher in plants treated with *P. mandelii* IB-Ki14. With milder salinity, ABA content in shoots decreased to the level of control plants (grown on soil without artificial salinity) when treated with strains of both bacteria. At a higher salinity level, such a decrease in ABA content in shoots was observed only against the background of the treatment of plants with *B. subtilis* IB-22. Optimization of water relations under the influence of bacteria in the early stages of development contributed to an increase in plant productivity against the background of salinity.

Keywords: PGPR, salinity, abscisic acid, wheat

Поступила в редакцию: 15.03.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-1-79-85](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-79-85)

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что способность некоторых ризосферных бактерий (PGPR – plant growth promotion rhizobacteria) стимулировать рост растений проявляется не только в благоприятных, но и стрессовых условиях [Belimov et al., 2009; Gerhardt et al., 2009; Vejan et al., 2016; Backer et al., 2018], что позволяет использовать препараты, созданные на основе таких бактерий для повышения устойчивости растений. Засоление – один из наиболее серьезных неблагоприятных факторов среды, вызывающий значительные потери урожая во всем мире [Shahid et al., 2018]. В литературе имеется немало публикаций, в которых показана способность PGPR повышать урожайность растений в условиях засоления [Paul and Lade, 2014; Siyar et al., 2019].

В 2018 году нами были проведены полевые опыты по изучению эффективности применения некоторых галотолерантных гормонпродуцирующих штаммов бактерий на продуктивность растений пшеницы в условиях сильного засоления [Архипова и др., 2019а]. Хотя все изученные штаммы проявили способность повышать урожайность растений, в этих условиях выживало менее трети растений, что затрудняло сравнительную оценку эффективности. При этом масса зерен на растение падала в 1,5 раза по сравнению с растениями, выращенными без засоления [Архипова и др., 2019а]. Поэтому в 2019 году мы провели полевой опыт по изучению влияния солеустойчивых и гормонпродуцирующих бактерий на растения в условиях более мягкого засоления. На стадии кущения были проанализированы относительное содержание воды, осмоляльность клеточного сока листьев и содержание АБК для оценки интенсивности стрессового воздействия; в конце вегетационного периода оценивали количество растений на делянке, высоту растений и урожайность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта для изучения влияния бактериализации семян на рост и продуктивность в условиях засоления использовали растения твердой яровой пшеницы *Triticum durum* Desf., сорт Башкирская 27. Полевой опыт проводили в 2019 году на территории Уфимского района. Почва на опытных делянках – агрочернозем глинисто-иллювиальный, характеризуется средней гумусированностью (6.3%), слабокислой реакцией среды, высоким содержанием поглощенных оснований с преобладанием кальция, средней обеспеченностью подвижным фосфором и щелочногидролизующим азотом. Площадь опытных делянок – 1 м², повторность четырехкратная. Засоление создавали искусственно, внося в почву 2,5% и 5%-ый раствор NaCl из расчета 10 л/м².

Для бактериализации семян были использованы грамположительная аэробная цитокининпродуцирующая бактерия *Bacillus subtilis* IB-22 [Архипова и др., 2006] и грамотрицательная ауксинпродуцирующая бактерия *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 (ВКМ В-3250) [Кузьмина и др., 2018] из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН. Обе бактерии являются умеренными галофилами (5-7% NaCl) [Кузьмина и др., 2018]. Бактериальные инокуляты для обработки семян получали культивированием штаммов на средах: *B. subtilis* IB-22 – на среде K1G [Кузьмина и др., 2015], *P. 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 72ч при температуре 37°C, грамотрицательные бактерии – 48ч при 28°C. Биомассу отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об/мин, разводили водопроводной водой

так, чтобы плотность инокулята при обработке составила 10^6 КОЕ/семя. Бактеризацию семян проводили с добавлением Na-карбоксиметилцеллюлозы (4%). Контролем служили растения пшеницы без бактериальной обработки семян (но обработанные Na-КМЦ).

На стадии кущения (28 дней после посадки) определяли массу побегов и корней, содержание в них АБК, относительное содержание воды (ОСВ) и осмотический потенциал; в конце вегетации оценивали количество растений на делянке, высоту растений и урожайность.

Для оценки содержания АБК брали навеску побегов 3-4 растений и корней 25 растений. Гормоны экстрагировали 80% этанолом в соотношении 1:10 в течение 16 часов. Затем отделенный фильтрацией спиртовой экстракт упаривали до водного остатка, из которого абсцизовую кислоту экстрагировали как описано [Veselov et al., 1992] и проводили ее количественное определение в иммунной тест-системе с помощью соответствующих антител.

Образцы для измерения осмотического потенциала были получены путем замораживания и оттаивания тканей побегов и последующего центрифугирования. Осмотический потенциал полученного клеточного сока измеряли с помощью цифрового микроосмометра (CAMLAB Limited, UK).

Для определения ОСВ окончательно сформированный первый лист десяти растений (один биологический повтор) взвешивали и погружали основанием в дистиллированную воду, плотно закрывали сосуд для насыщения воздуха влагой и помещали в темноту при комнатной температуре. Через 24 часа листья взвешивали для определения тургорной массы, высушивали и рассчитывали относительное содержание воды по формуле: $ОСВ = (сырая\ масса - сухая\ масса) / (тургорная\ масса - сухая\ масса), \%$

Статистическую обработку данных проводили по стандартным программам MS Excel. На рисунке и в таблице представлены средние значения и ошибка средней. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (t-тест).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение массы побегов и корней неинокулированных бактериями растений пшеницы на стадии кущения показало, что в условиях засоления наблюдается накопление массы корней и снижение накопления массы побега и степень такой реакции растений усиливается с ростом концентрации соли в почве (рис. 1). Масса корней в присутствии соли была больше, чем масса корней контрольных растений на 25 и 45 % для более мягкого и более сильного засоления соответственно. Масса побегов, наоборот, снижалась и составила 70 и 50 % от массы побегов контрольных растений при разном уровне засоления. Бактеризация семян не приводила к изменению массы корней по сравнению с неинокулированными растениями в каждом из вариантов засоления, но масса побегов достоверно увеличилась при обработке *B. subtilis* IB-22 в обоих вариантах опыта и в случае обработки *P. mandelii* IB-Ki14 на фоне более сильного засоления.

Измерение ОСВ показало, что засоление вызывало снижение оводненности первого листа (с 83 до 79 %) и дефицит воды (равный 100-ОСВ,%) не изменялся с увеличением уровня засоления (рис. 2А). Бактеризация разными штаммами неодинаково влияла на оводненность листьев: в случае обработки семян *B. subtilis* IB-22 ОСВ не отличалось от этого показателя у неинокулированных растений на фоне обоих вариантов засоления. Однако у растений, обработанных ауксинпродуцирующим штаммом *P. mandelii* IB-Ki14, ОСВ было

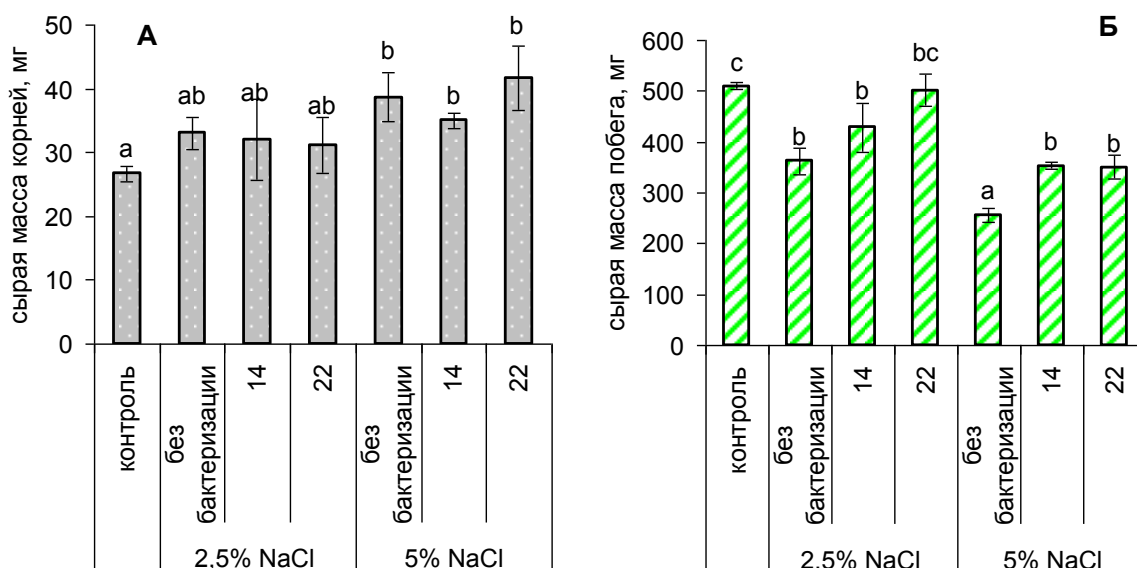


Рис. 1. Сырая масса корней (А) и побегов (Б) растений пшеницы на стадии кушения при искусственном засолении в полевых условиях при бактериализации семян гормонпродуцирующими бактериями: 14 – *P.mandelii* IB-Ki14; 22 – *B. subtilis* IB-22; контроль- вариант без бактериализации и засоления. Значимые различия между средними на каждом рисунке обозначены различными буквами ($p \leq 0.05$, *t*-тест).

ниже по сравнению как с необработанными растениями на фоне засоления, так и с растениями, обработанными цитокининпродуцирующим штаммом *B. subtilis* IB-22 (различия были достоверны на фоне более высокой концентрации соли, $P=0.03$, *t*-тест). Увеличение дефицита воды у растений под влиянием штамма *P. mandelii* IB-Ki14 соответствовало результатам, полученным нами ранее в лабораторных условиях, когда только при инокуляции растений этим штаммом (но не при обработке цитокининпродуцирующей *B. subtilis* IB-22) наблюдали понижение ОСВ [Архипова и др., 2019б].

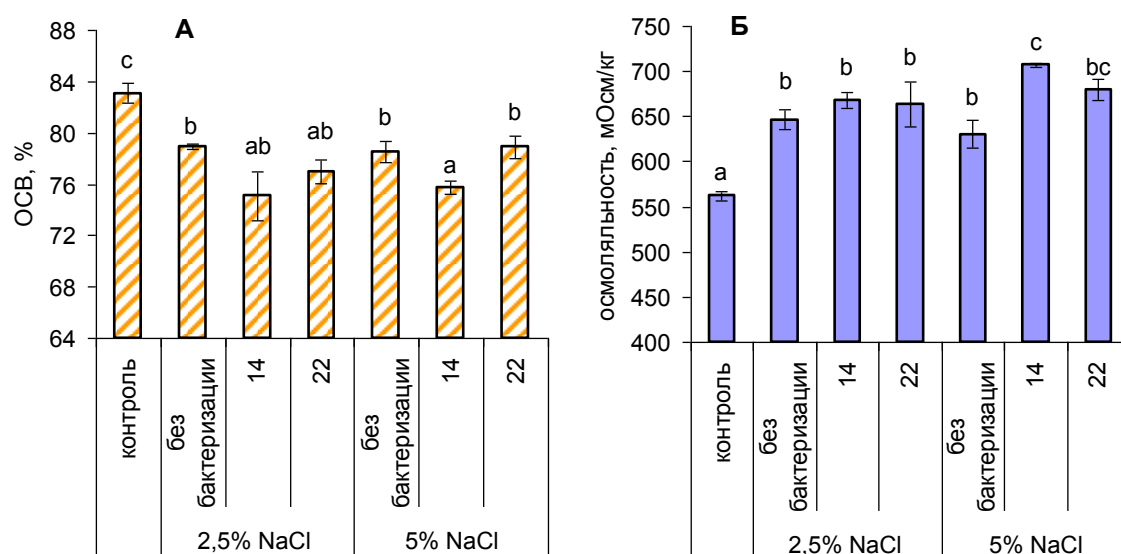


Рис. 2. Относительное содержание воды (А) и осмоляльность (Б) побегов растений пшеницы на стадии кушения при искусственном засолении в полевых условиях при бактериализации семян гормонпродуцирующими бактериями: 14 – *P. mandelii* IB-Ki14; 22 – *B. subtilis* IB-22; контроль - без бактериализации и засоления. Значимые различия между средними на каждом рисунке обозначены различными буквами ($p \leq 0.05$, *t*-тест).

Возрастание дефицита воды в полевых условиях могло быть следствием снижения гидравлической проводимости под влиянием штамма бактерий *P. mandelii* IB-Ki14, которое мы наблюдали ранее в лабораторных условиях. Напротив, у растений, обработанных цитокининпродуцирующим штаммом *B. subtilis* IB-22, наблюдаемый в поле более высокий (по сравнению с обработкой *P. mandelii* IB-Ki14) уровень ОСВ также коррелировал с повышенной гидравлической проводимостью, выявленной в лабораторных условиях [Архипова и др., 2019б].

Под влиянием засоления на фоне обеих концентраций соли возрастала осмоляльность побега, что очевидно отражало адаптацию растений к дефициту воды, когда увеличение концентрации осмотиков способствует увеличению водоудерживающей способности клеток (рис. 2Б). Влияние обеих бактерий на этот показатель проявлялось на фоне максимальной концентрации соли, при которой осмоляльность листьев возрастала на 10 и более процентов по сравнению необработанными бактериями растениями на фоне засоления. Осмоляльность была выше у растений, обработанных *P. mandelii* IB-Ki14, что могло быть еще одной из причин возрастания дефицита воды.

В отсутствие засоления уровень АБК был примерно одинаковым в побегах и корнях растений пшеницы (табл. 1). Засоление приводило к накоплению этого гормона, как в корнях, так и побегах, и на фоне меньшей концентрации соли уровень накопления АБК был выше в корнях (в 4 раза по сравнению с контролем), чем в побегах, (содержание АБК возрастало в 2 раза). При этом уровне засоления бактериализация обоими штаммами снижала содержание АБК в побегах до уровня контрольных, неинокулированных растений без искусственного засоления.

Таблица 1. Содержание АБК (нг/г сухой массы) в растениях пшеницы при искусственном засолении в полевых условиях после бактериализации семян гормонпродуцирующими штаммами бактерий.

Уровень засоления	Обработка	корень	побег
0% NaCl	контроль	63 ^a	98 ^a
	без бактериализации	856 ^d	190 ^b
2,5% NaCl	<i>P. mandelii</i> IB-Ki14	544 ^{cd}	128 ^a
	<i>B. subtilis</i> IB-22	330 ^c	107 ^a
	без бактериализации	1031 ^d	720 ^d
5% NaCl	<i>P. mandelii</i> IB-Ki14	1807 ^e	540 ^{cd}
	<i>B. subtilis</i> IB-22	1646 ^e	464 ^c
	без бактериализации	1031 ^d	720 ^d

Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся значения ($p < 0.05$, $n=9$, t-test)

На фоне более высокой концентрации соли содержание АБК было также выше в корнях, чем в побегах, но различия между побегом и корнем были выражены в меньшей степени, чем в случае более мягкого стресса (соотношение содержания АБК корень/побег уменьшилось с 4,5 до 1,5 с усилением стресса). Бактериализация обоими штаммами увеличивала уровень накопления АБК в корнях. В тоже время снижение содержания АБК в побегах было достоверно только для *B. subtilis* IB-22.

Как известно, дефицит воды является стимулом для накопления АБК [Hartung et al., 2002; Davies et al., 2005]. Поэтому неудивительно, что увеличение дефицита воды при засолении сопровождалось повышением концентрации АБК. Предпосевная обработка семян гормонпродуцирующими бактериями снижала уровень накопления АБК в побегах, что можно интерпретировать как результат оптимизации водных отношений под влиянием

бактерий на фоне засоления. АБК, как известно, закрывает устьица, что позволяет растению экономить воду, но в тоже время этот процесс отрицательно сказывается на газообмене и фотосинтезе. Поэтому понижение уровня АБК под влиянием бактерий могло способствовать активации роста на фоне засоления. Представляет интерес также и тот факт, что в корнях на фоне более высокой концентрации соли бактериальная обработка приводила к увеличению уровня накопления АБК. Поскольку известна способность этого гормона стимулировать процессы, связанные с адаптацией к засолению (например, ускоренное образование поясков Каспари) [Magulanda et al., 2010], повышенный уровень АБК на фоне бактериализации может отражать более высокую эффективность адаптационных процессов.

Засоление снижало урожайность растений, что явилось в основном результатом уменьшения количества растений на делянке. Обработка семян бактериями повышала урожайность растений за счет увеличения массы зерен с одного растения, не изменяя всхожести. Большая урожайность при бактериализации семян коррелирует со снижением в побегах гормона стресса АБК.

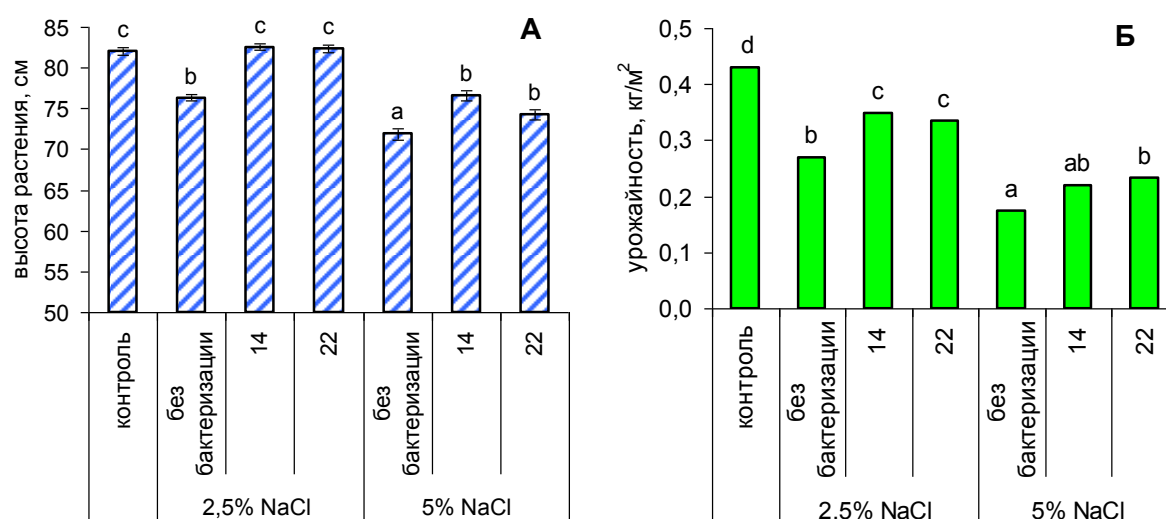


Рис. 3. Высота растений в конце срока вегетации (А) и урожайность (Б) пшеницы при искусственном засолении в полевых условиях при бактериализации семян гормонпродуцирующими бактериями: 14 – *P.mandelii* ИВ-Ки14; 22 – *B. subtilis* ИВ-22; контроль - без бактериализации и засоления. Значимые различия между средними на каждом рисунке обозначены различными буквами ($p \leq 0.05$, *t*-тест).

Таким образом, оптимизация водного баланса под влиянием бактерий, которая проявлялась на ранних стадиях развития в накоплении осмотически активных веществ и снижении уровня стресс-индуцированного накопления АБК в побегах способствовала поддержанию урожайности растений на фоне засоления.

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП «Агидель» и при частичной поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований №18-04-00577.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко Е.В., Кудоярова Г.Р. 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. Архипова Т.Н., Кузьмина Л.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние обработки семян гормонпродуцирующими и фосфатмобилизующими бактериями на рост пшеницы при засолении в полевых условиях // Экобиотех. 2019а Т 2. №4. С. 564-573. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-4-564-573](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-4-564-573)
3. Архипова Т.Н., Мартыненко Е.В., Шарипова Г.В., Кузьмина Л.Ю., Кудоярова Г.Р. Сравнение влияния ауксинпродуцирующих и цитокининпродуцирующих бактерий на рост, водный обмен и степень повреждения растений пшеницы от оксидативного стресса при засолении // Биомика. 2019б. Т.11(4). С. 409-417. DOI: [10.31301/2221-6197.bmcs.2019-33](https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2019-33)
4. Кузьмина Л.Ю., Архипова Т.Н., Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Четвериков С.П., Мелентьев А.И. 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](https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-47)
5. Backer R., Rokem J. S., Pangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., et al. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // Front. Plant. Sci. 2018. V. 9. P. 1473. DOI: [10.3389/fpls.2018.01473](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473)
6. Belimov A., Dodd I., Safronova V., Davies W. ACC deaminase-containing rhizobacteria improve vegetative development and yield of potato plants grown under water-limited conditions // Asp. Appl. Biol. 2009. V. 98. P. 163–169.
7. Davies W. J., Kudoyarova G., Hartung W. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought // J. Plant Growth Regul. 2005. V. 24. P. 285–295. DOI: [10.1007/s00344-005-0103-1](https://doi.org/10.1007/s00344-005-0103-1)
8. Gerhardt K. E., Huang X.-D., Glick B. R., Greenberg B. M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. // Plant Sci. 2009. V. 176. P. 20–30. DOI: [10.1016/j.plantsci.2008.09.014](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.014)
9. Hartung W., Sauter A., Hose E. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 27–32. DOI: [10.1093/jexbot/53.366.27](https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.27)
10. 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.
11. Paul D., Lade H. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review // Agron. Sustain. Dev. 2014. V. 34. P. 737–752. DOI: [10.1007/s13593-014-0233-6](https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6)
12. Shahid S.A., Zaman M., Heng L. Soil Salinity: Historical Perspectives and a World Overview of the Problem // In: Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques. 2018. Springer. DOI: [10.1007/978-3-319-96190-3_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_2)
13. Siyar S., Inayat N., Hussain F. Plant growth promoting rhizobacteria and plants' improvement: a mini-review // PSM Biol. Res. 2019. V. 41. P. 1-5. URL: <https://www.journals.psmpublishers.org/index.php/biolres/article/view/214>
14. Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Nasrulhaq Boyce A. (). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review // Molecules. 2016. V. 21, pii: E573. DOI: [10.3390/molecules21050573](https://doi.org/10.3390/molecules21050573)
15. Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Gyuli-Zade V.G., Mustafina A.R., Kof E.K. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // Physiol. Plant. 1992. V. 86. P. 93–96.