ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

КОЛОНИЗАЦИЯ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Гильванова Е.А., Архипова Т.Н.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: gelena@anrb.ru

Скрининг гормонпродуцирущих бактерий среди представителей умеренно галофильных бактерий выявил разный уровень продукции ИУК (0-5,6 мкг/мл). В присутствии 100мМ NaCl тестируемые бактерии, значительно различающиеся по уровню продукции ауксинов, колонизировали корни растений пшеницы (*Triticum aestivum* L. сорт Омская 35), увеличивая плотность популяции. Способность к продукции ИУК коррелирует с обнаруженным положительным действием галотолерантных бактерий на рост растений пшеницы в условиях засоления.

Ключевые слова: галотолерантные бактерии, солевой стресс, фитогормоны, пшеница

COLONIZATION OF WHEAT ROOT BY HALOTOLERANT BACTERIA AND THEIR INFLUENCE ON PLANT GROWTH UNDER SALT STRESS

Gilvanova E.A., Arkhipova T.N.

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

Screening of hormone-producing bacteria among moderately halophilic bacteria revealed a different level of IAA production (0-5.6 μg / ml). The tested bacteria with difference of auxin production colonized the roots of wheat plants (*Triticum aestivum* L., Omskaya 35), increasing the population density in the presence of 100 mM NaCl. The ability to produce IAA correlates with the detected positive effect of halotolerant bacteria on the growth of wheat plants under salt conditions.

Keywords: halotolerant bacteria, salt stress, phytohormones, wheat

Поступила в редакцию: 3.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-439-444

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных проблем современного интенсивного земледелия на фоне растущей аридизации является засоление пахотных земель. В подобных стрессовых условиях, обусловленных дефицитом влаги и усилением оксидативного стресса, растения нуждаются в поступлении дополнительных регуляторов роста, таких как фитогормоны, источником которых могут быть микроорганизмы ризосферы и филлосферы [Воеводина, Балакай, 2017; Numan et al., 2018]. В связи с этим актуально применение и создание новых биопрепаратов, содержащих ростстимулирующие бактерии, а также выяснение механизмов взаимодействия растений и бактерий.

Цель исследования - поиск микроорганизмов среди представителей умеренно галофильных бактерий и нормофильной ризосферной микробиоты растений из коллекции УФИЦ РАН, способных синтезировать фитогормоны и колонизировать проростки пшеницы. Изучение влияния инокуляции солеустойчивыми микроорганизмами с различным уровнем синтеза гормонов на морфометрические характеристики проростков пшеницы в условиях солевого стресса.

Объекты и методы исследования

Штаммы и условия культивирования. В работе использовали штаммы, принадлежавшие к различным таксонам:1) IB-I6, IB-559, IB-L2 – к грамотрицательным

галоалкалофильным обитателям соленых мест и озер - *Halomonas; 2)* IB-256 и IB-B8 – к солелюбивым грамположительным бациллам *Virgibacillus* и *Oceanobacillus*, соответственно; 3) культура IB-I6C относится к нормофильным бактериям и является представителем денитрифицирующих псевдомонад *Pseudomonas stutzeri*; 4) IB-BF является эндофитной бактерией *Pantoea agglomerans*, тесно взаимодействует с растением и выделена из семян пшеницы. Для оценки уровня продукции гормонов и получения биомассы штаммы выращивали на среде Luria Bertani (LB) (штаммы IB-I6C и IB-BF) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на шейкере-инкубаторе Innova 40R при 250 мин$^{-1}$ в течении 5 суток. Остальные микроорганизмы выращивали на среде LBS, предназначенной для культивирования солелюбивых галомонад и бацилл, которая идентична по составу с LB, но дополнена хлоридом натрия (3% по масс.). Температурный и pH режим культивирования соответствовал температурным и pH оптимумам для каждой таксономической группы: солелюбивые галомонады и грамположительные бациллы – 34ºC pH 9-9,5 (путем добавления 10% раствора Na_2CO_3), нормофильные штаммы – 28ºC, pH 7,4.

Определение цитокининов в культуральной жидкости. 1 мл КЖ разбавляли до 8 мл водой и проводили экстракцию бутанолом 2:1 (водная фаза/органическая фаза). После упаривания бутанола досуха следовала очистка и разделение цитокининов с помощью тонкослойной хроматографии и количественное определение гормонов методом ИФА в тест-системе с антителами к зеатинрибозиду [Веселов, 1998].

Определение продукции ИУК. Способность штаммов синтезировать ауксины (ИУК) оценивали на жидкой среде, используя в качестве инокулята соответствующую 24-часовую культуру. Отбор проб для анализа осуществляли в начале стационарной фазы роста, на 4 сутки культивирования. Определение ауксинов в бесклеточной культуральной жидкости проводили с помощью иммуноферментного анализа после эфирной экстракции в тест-системе для определения ИУК [Veselov et al., 1992]. Параллельно продукцию ИУК исследовали по методике с использованием реактива Сальковского, где содержание ИУК в культуральной жидкости было определено по калибровочной кривой с использованием стандартных растворов ИУК (0.01–10 мкг/мл,) (Sigma, USA). В качестве контроля использовали среду LB (LBS) без клеток микроорганизмов.

Определение АБК в культуральной жидкости проводили с помощью иммуноферментного анализа после эфирной экстракции в иммуноферментной тест-системе для определения АБК [Veselov, 1998].

Инокуляция растений бактериями. В качестве тест-объекта исследования использовали пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта Омская 35. Стерилизацию семян пшеницы осуществляли замачиванием зерен в растворе 3% перекиси водорода и 96% этилового спирта (1:1) в течение 5 минут. Семена промывали стерильной дистиллированной водой не менее 3-4 раз и подсушивали в ламинарном боксе. Стерилизованные семена обрабатывали необходимым количеством биомассы известного титра с добавлением Na-карбоксиметилцеллюлозы (4%), создавая титр 10^6 КОЕ/семя для культур IB-I6, IB-256 и IB-B8 и 10^7 КОЕ/семя для IB-I6C. Далее обработанные семена раскладывали в стерильные чашки Петри по 20 штук в 3 повторах для каждого варианта и выращивали при постоянной температуре 20-22°C. Опыт был выполнен в двух вариантах: без внесения NaCl (S-), и на фоне 100 мМ NaCl (S+). В эксперименте оценивали всхожесть, длину и сырую массу побегов и корней, бактериальный титр (КОЕ) на обработанных семенах и титр на корнях (КОЕ/1 г сух. корн.) на 4 сутки.

Определение численности бактерий на корнях проростков пшеницы. Из навесок корней 4-дневных проростков готовили гомогенат, в котором определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) посредством высевов десятикратных разведений на плотную среду LB и LBS. Количество бактерий, высеваемых с корней, пересчитывали на 1 г сухой массы корней. Для контроля посторонней микрофлоры дополнительно проводили высевы разведений из гомогенатов корней необработанных растений по двум вариантам без внесения NaCl (S-), и на фоне 100 мМ NaCl (S+), (0,6%).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ “Microsoft Excel 2007”. В качестве критерия оценки достоверности наблюдаемых изменений использовали t-критерий Стьюдента при уровне значимости 0.95.

Результаты и обсуждение

Поиск микроорганизмов – продуцентов фитогормонов среди представителей умеренно галофильных бактерий показал, что ни один из семи рассмотренных штаммов не продуцировал ни цитокинины, ни АБК, но штаммы различались по продукции ауксинов. Определение ауксинов проводили методом иммуноферментного анализа и методом Сальковского. Ранее было проведено сравнение результатов определения фитогормонов с помощью ИФА и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, и была доказана надежность метода иммуноанализа [Arkhipova et al., 2007; Kudoyarova et al., 2014]. Однако для определения потенциальной способности микроорганизмов синтезировать ауксины многие исследователи используют метод Сальковского, где анализируется реакция на индольные соединения после культивирования микроорганизмов в среде со значительным количеством предшественника ауксинов триптофана. Хотя этот метод относительно прост, однако специфичность его невысока и он может давать завышенные результаты [Glickman and Dessaux, 1995], тем не менее он до сих пор широко используется не только для качественной оценки, но и для количественного определения ИУК [Asim et al., 2013, Singh et al., 2014; Spaepen at al., 2009 and articles in review, Numan et al., 2018 and articles in review]. Следует иметь в виду также то, что в естественных условиях содержание триптофана в корневых выделениях растений крайне низко и несравнимо с уровнем этой аминокислоты в питательной среде при культивировании в лабораторных условиях, поэтому мы не добавляли триптофан в питательную среду.

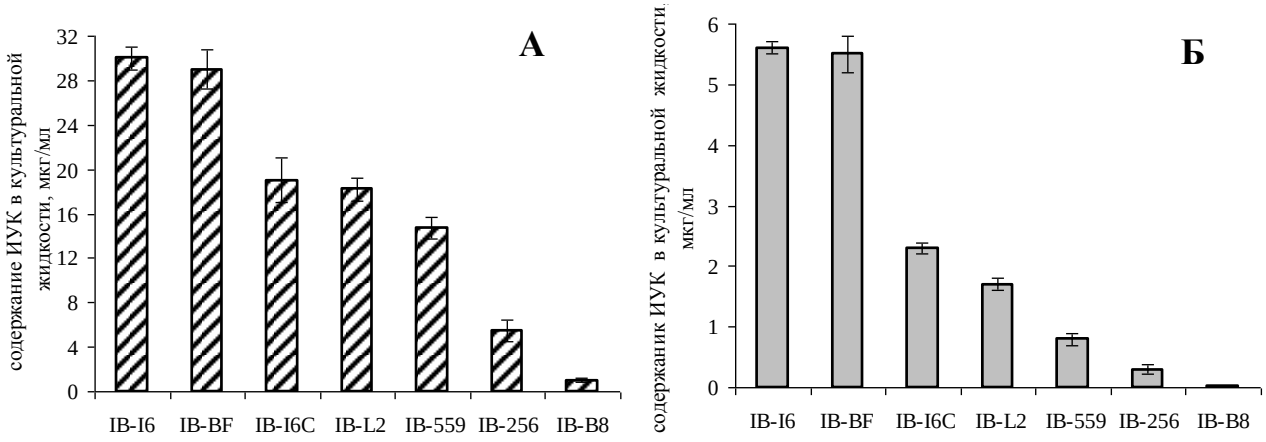

Рис. 1. Содержание ИУК в культуральной жидкости ряда галофильных бактерий, определенное А) методом Сальковского и Б) методом ИФА

Из рисунка 1 видно, что метод Сальковского дает завышенные результаты из-за его неспецифичности, в отличие от ИФА, где для анализа используются специфические антитела

к ИУК. Однако при сравнении содержания ауксинов в КЖ исследуемых штаммов, измеренных двумя методами, наблюдается высокий уровень соответствия. Из анализа полученных данных лидерами по синтезу ИУК оказались грамотрицательные бактерии IB-I6, IB-BF, в меньшей степени продуцировали ИУК также граммотрицательные IB-I6C, IB-L2 и IB-559. В группе, включающей солетолерантные бациллы, IB-256 можно отнести к слабому продуценту ИУК, а уровень гормонов, определяемых в культуральной жидкости штамма IB-B8, не превышает количество, определяемое в питательной среде.

Для тестирования на способность повышать солеустойчивость растений пшеницы при бактеризации семян, было выбрано четыре штамма. При отборе культур руководствовались принципом максимального разнообразия, то есть включили бактерии, принадлежавшие к разным таксонам, со значительной толерантностью к хлориду натрия и обладавшие разным уровнем продукции ИУК. *Halomonas sp.*IB-I6 – единственная из представленных галомонад растет при pH7 и без NaCl, *Pseudomonas stutzeri* IB-I6C – типичная ризосферная бактерия, растущая в нейтральных условиях, толерантная к содержанию хлорида натрия до 3%; *Virgibacillus sp.* IB-256 – солелюбивая грамположительная бактерия, выделенная из почвы с обрабатываемого поля, где возделывали капусту, растет в присутствии 0-10% NaCl; *Oceanobacillus* IB-B8 – для оптимального роста этой галофильной грамположительной бактерии требуется 4-6% NaCl, поэтому она выбрана в эксперименте в качестве своеобразного “отрицательного” контроля.

Мониторинг численности инокулянтов на семени в начале эксперимента и с корней проростков пшеницы на 4 сутки роста показал разный уровень способности колонизировать растения на ранних этапах развития (Табл. 1). Анализ плотности популяции IB-I6 из гомогената корней выявил, что данная бактериальная культура увеличила свой титр на порядок в варианте S- и на два порядка в варианте S+, что указывает на явное предпочтение условий с повышенным фоном засоленности для развития этой культуры. В случае инокуляции штаммом IB-I6C наблюдали увеличение плотности популяции на корнях

Таблица 1. Характеристика штаммов, продукция ИУК и влияние бактеризации семян на длину и массу проростков пшеницы в норме и при стрессе (100 мМ NaCl).

Параметры		**Контроль**	**IB-I6**	**IB-I6C**	**IB-256**	**IB-B8**
ИУК, нг/мл КЖ		**-**	**5600**	**2300**	**300**	**20**
характеристика штаммов: pH, рост при NaCl, %		-	грам (-) pH 6,8-10 0-15%	грам (-) pH 6-9 0-3%	грам (+), pH 7-10 0-10%	грам (+) pH 7-10 4-6%
Титр, КОЕ/ семя		-	10^6	10^7	10^6	10^6
Титр, КОЕ/1 гр корней	-NaCl	-	$4{,}3x10^7$	10^8	$2x10^6$	10^6
	+NaCl	-	10^8	10^8	$4x10^6$	$3x10^6$
Всхожесть, %	-NaCl	72	76	79*	79*	72
	+NaCl	65	70	74*	74*	54*
Суммарная длина корней, мм	-NaCl	240±9	202±7	242±7	240±6	204±8
	+NaCl	139±7	165±8*	180±5*	174±8*	127±8
Сырая масса корней, мг	-NaCl	41,5±1,0	40,6±1,2	45,2±1,3*	42,5±1,7	40,6±1,5
	+NaCl	28,5±1,0	31,5±0,5*	33,9±1,0*	32,9±1,1*	27,9±1,3
Длина колеоптиля, мм	-NaCl	46±1,1	45,2±1,3	44,1±0,9	44,1±0,9	42,4±1,6
	+NaCl	33±1,4	35,3±1,2	35±1,2	36±1,8	33,7±1,3
Сырая масса побега, мг	-NaCl	40,8±	42±1,2	41,7±1	40±0,9	40,2±1,2
	+NaCl	31±1	32,2±1	33±0,7	33,3±1,1	30,8±0,9

В таблице указаны средние значения и ошибки средней. *Различия средних по сравнению с контролем без бактеризации достоверны при $p \leq 0.05$, *t*-тест.

проростках более чем на порядок в обоих вариантах опыта S- и S+, что свидетельствует о более широком диапазоне роста культуры, не зависящем от присутствия NaCl, в отличие от IB-I6. Четырехкратное увеличение плотности популяции было зафиксировано у штамма IB-256 в варианте S+ и двукратное увеличение в варианте S-. Возможную задержку роста у грамположительного IB-B8 можно объяснить низким содержанием соли в варианте опыта S+(0,6%), что не соответствует ее оптимальной концентрации для развития этой культуры.

Во всех вариантах обработки семян наблюдали увеличение всхожести на 4-6% и 8-10% для S- и S+ соответственно, кроме варианта с обработкой штаммом IB-B8 (Табл. 1).

При оценке морфометрических параметров проростков пшеницы наибольший положительный эффект наблюдали в отношении корней. В вариантах без солевой нагрузки, только бактеризация штаммом IB-I6C способствовала увеличению сырой массы корней (9%), не влияя на их длину (Табл. 1). При засолении существенную прибавку длины корней (18-28-24%) и увеличение их сырой массы (10-17-15%) фиксировали при обработке штаммами IB-I6, IB-I6C и IB-256 соответственно. Бактеризация семян не влияла на рост побегов ни в одном из вариантов опыта на ранней стадии развития растений пшеницы.

Таким образом, в условиях засоления максимальную прибавку по длине и массе корней мы наблюдали у галотолерантной бактерии *Pseudomonas stutzeri* IB-I6C, наиболее успешно колонизирующей корни и имеющей средний уровень продукции ауксинов. Бактерия *Halomonas sp.* IB-I6 с таким же уровнем колонизации, но продуцирующая *in vitro* в два раза больше ИУК, оказывает более слабое действие на рост растений, в полтора раза снижая показатели по длине и массе корней на ранних стадиях развития растений пшеницы. Наши данные хорошо согласуются с данными исследователей о способности бактериального ауксина менять уровень гормонов растений до оптимального или сверхоптимального [Glick, 2012]. Таким образом, бактериальная ИУК, продуцируемая PGPR, может либо стимулировать развитие корней в тех случаях, когда концентрация ауксинов у растений субоптимальна, либо ингибировать развитие корня, когда уровень ауксина уже является оптимальным [Spaepen et al., 2007], как это можно наблюдать в варианте с культурой *Halomonas sp.* IB-I6. Сравнительно низкая продукция ИУК *in vitro* галофильными бактериями (как например, *Virgibacillus sp.*IB-256) еще не означает слабого действия бактерии на рост растений. Вероятно, *in vivo* продукция гормонов может измениться под влиянием сигналов из растений. Бактеризация семян пшеницы солелюбивой, но не способной продуцировать фитогормоны и эффективно колонизировать корни, бактерией *Oceanobacillus* IB-B8 не увеличивала всхожесть, рост корней и побегов пшеницы.

При поиске ростстимулирующих микроорганизмов среди галотолерантных и умеренно галофильных бактерий следует отдавать предпочтение тем, которые успешно развиваются в присутствии соли 0-3% и способны продуцировать фитогормоны.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект №18-04-00577 А) и в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Изд-е Башкирск. ун-та. Уфа.1998. 138с.
2. Воеводина Л.А., Балакай Г.Т. Обзор новых направлений исследований по использованию микроорганизмов для повышения биопродуктивности засоленных

земель // Научный журнал Российского НИИ проблем мелиорации. 2017. № 4 (28). С. 154–169.

3. Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.U., Martynenko E.V., Melentiev A.I., ·Kudoyarova G.R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // Plant Soil. 2007. V. 292. P. 305–315.
4. Asim M., Aslam M., Bano A et al. Role of Phytohormones in Root nodulation and Yield of Soebean under Solt Stress // American J. Res Communication. 2013. V. 1 (5). P. 191–208.
5. Glick B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications // Scientifica 2012. V. 2012. Article ID 963401
6. Glickman E., Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria // Applied and Enviromantal Microbiology. 1995. V. 61. P. 793–796.
7. Kudoyarova G.R., Melentiev A.I., Martynenko E.V., Arkhipova T.N., Shendel G.V., Kuzmina L.U., Dodd I.C., Veselov S.U. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots // Plant Physiology Biochemistry. 2014. V. 83. P. 285–291.
8. Numan M., Bashir S., Khan Y., Mumtaza R., Shinwar Z.K., Khan A.L., Khan A., AL-Harrasi A. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review // Microbiological Research. 2018. V. 209. P. 21–32.
9. Singh P., Kumar V. Evolution of Phytase Producing Bacteria for Their Plant Growth Promoting Activities // International J. Microbiology. 2014. V. 2014. ID 426483.
10. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 425–448.
11. Spaepen S., Vanderleyden J., Okon Y. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria // Advances in Botanical Research. 2009. V. 51. P. 284–320.
12. Veselov S., Kudoyarova G., Egutkin N., Gyuli-Zade V., Mustafma A., Kof E. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // Physiol. Plantarum. 1992. V. 86. P. 93–96.