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

ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS KOREENSIS ИБ-4* И *PSEUDOMONAS PLECOGLOSSICIDA 2.4-D* НА РОСТ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕФИЦИТЕ ВОДЫ РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Тимергалин М.Д., Феоктистова А.В., Рамеев Т.В., Иванов Р.С., Четвериков С.П.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН
E-mail: chelab007@yandex.ru

Изучено влияние бактерий *Pseudomonas koreensis ИБ-4* и *P. plecoglossicida 2.4-D,* способных продуцировать фитогормоны, на растения пшеницы в условиях сильного и умеренного дефицита воды. В наших опытах мы наблюдали снижение эвапотранспирации под влиянием дефицита воды, к чему могло привести замедление роста листьев, в то время как у растений, в ризосферу которых мы интродуцировали бактерии, транспирация на фоне прекращения полива была выше. Так же реализовался один из важных механизмов адаптации растений к дефициту воды, это активация роста корней, как на фоне дополнительной бактеризации ризосферы, так и без нее. Изученные штаммы по-разному проявляли стимулирующую активность при разных вариантах засухи. Действие *P. koreensis ИБ-4 б*ыло более эффективным при временном прекращении полива, а *P. plecoglossicida 2.4-D* на фоне умеренной засухи.

Ключевые слова: дефицит воды, *Triticum aestivum* L., транспирация, штаммы ризосферных бактерий, фотосинтез, устьичная проводимость

INFLUENCE OF STRAINS OF RHEOSPHERE BACTERIA *PSEUDOMONAS KOREENSIS IB-4* AND *PSEUDOMONAS PLECOGLOSSICIDA 2.4-D* ON THE GROWTH OF WHEAT PLANTS DURING WATER DEFICIENCY OF VARIOUS INTENSITY

Timergalin M.D., Feoktistova A.V., Rameev T.V., Ivanov R.S., Chetverikov S.P.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: chelab007@yandex.ru

The effect of bacteria *Pseudomonas koreensis IB-4* and *Pseudomonas plecoglossicida 2.4-D* capable of producing phytohormones on wheat plants with water deficiency was studied. In our experiments, we observed a decrease in evapotranspiration under the influence of water scarcity, which could be caused by a slower growth of leaves, while in plants in the rhizosphere of which we introduced bacteria transpiration was higher when watering was stopped. One of the important mechanisms of plant adaptation to water deficiency has also been realized, it is the activation of root growth, both during bacterization of the rhizosphere and without it. The studied strains showed different stimulating activity in different variants of drought. The action of *P. koreensis IB-4* was more effective at stopping irrigation, and *P. plecoglossicida 2.4-D* against a background of moderate drought.

Keywords: water deficiency, *Triticum aestivum* L., transpiration, strains of rhizospheric bacteria, photosynthesis, stomatal conductivity

Поступила в редакцию: 17.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-545-552

ВВЕДЕНИЕ

Засуха является одним из основных факторов окружающей среды, сдерживающих рост и развитие растений, а также значительно снижающих урожайность сельскохозяйственных культур. Многие исследования направлены на решение проблемы устойчивости растений к дефициту воды, особенно в регионах, подверженных засухе. Так один из способов повышения засухоустойчивости растений заключается во введении в ризосферу бактерий [Liu et al., 2013; Sarma et al., 2014], способных продуцировать фитогормоны [Barnawal et al., 2014]. В условиях умеренной засухи было показано положительное действие штамма бактерий *Bacillus subtilis* IB 22, которые способны продуцировать цитокинины и, тем самым, поддерживать рост растений салата

при двукратном снижении уровня полива [Arkhipova et al., 2007], а также позитивно влиять на урожайность пшеницы [Wilkinson et al., 2012]. Изучение бактерий *Pseudomonas koreensis ИБ-4* и *P. plecoglossicida 2.4-D* при нормальных условиях выявило их рост стимулирующее действие на растения, а также способность к синтезу фитогормонов ауксинов (*P. koreensis ИБ-4* и *P. plecoglossicida 2.4-D*) и цитокининов (*P. koreensis ИБ-4*) [Рафикова и др. 2016, Бакаева и др., 2019]. Поэтому наша задача состояла в изучении влияния этих бактерий на рост растений пшеницы в условиях дефицита воды разной интенсивности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были растения мягкой яровой пшеницы *(Triticum aestivum* L.*)* сорта Омская 35. В работе использовали штаммы бактерий *P. koreensis ИБ-4* (основа коммерческого препарата «Азолен») и *P. plecoglossicida 2.4-D*, которые хранятся в коллекции микроорганизмов Уфимского института биологии УФИЦ РАН.

Бактерии культивировали в колбах Эрленмейера на термостатируемом шейкере (160 об/мин) при температуре 28 ºС в течение 72 часов в жидкой питательной среде Кинг Б (г/л воды): пептон – 20,0; глицерин – 10,0; K_2HPO_4 – 1,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,5 [King et al., 1954].

Семена пшеницы стерилизовали 20 мин в растворе перманганата калия и после холодовой индукции проращивали в течение 2-х суток. Проростки пересаживали в сосуды объемом 0,5 л, заполненные смесью песка с почвой в соотношении 1:9 (в качестве дренажа на дно сосудов вносили мелкую гальку). Растения выращивали на светоплощадке, составленной из красных (650 нм), синих (470 нм) и белых светодиодов (в соотношении 5:1:1) при плотности потока фотонов ФАР 190 мкмоль$\cdot$м$^{-2}\cdot$с$^{-1}$, 14-часовом фотопериоде и температуре 22-26 °С (ночь/день). Через 7 дней после посадки в почву вносили суспензию бактерий (10^8 КОЕ/мл) из расчета 10 мл на сосуд. Полив осуществляли в двух вариантах. В первом случае после доведения влажности почвы до 100 % от уровня полного насыщения в варианте с дефицитом воды полив полностью прекращали до достижения порогового значения влажности 30% от полной влагоемкости почвы (ПВП), после чего полив возобновляли. В контроле поддерживали уровень влажности 80 % от ПВП. При втором варианте полива дефицит воды создавали, поддерживая влажность почвы на уровне 50 % от ПВП. Полив контроля проводили как в первом варианте опыта.

До и после полива взвешивали сосуды с растениями для определения количества воды, необходимой для полива и оценки эвапотранспирации. Ростовые параметры измеряли через 4 дня после возобновления полива (длина листьев) и в конце эксперимента (масса корня и побега).

Измерения флуоресценции хлорофилла интактных листьев проводили с помощью флуориметра Junior PAM («Walz», Германия) с использованием программы WinControl 3. Перед измерениями растения выдерживали 30 мин в темноте и при включении низкоинтенсивного модулированного света регистрировали уровень флуоресценции (F_0). После подачи вспышки насыщающего света листья освещали актиничным светом (т.е. способным вызвать фотохимические реакции фотосинтеза) лампы флуориметра, и при достижении стационарного уровня флуоресценции вновь подавали вспышку насыщающего света. Вычисляли максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы 2 и коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции по формулам $Fv/Fm = (Fm - F_0)/Fm$ и $NPQ = (F'm / Fm) - 1$, соответственно, где Fm − максимальная величина выхода флуоресценции хлорофилла в адаптированных к темноте листьях в ответ

на вспышку насыщающего света, F_0 − минимальная величина выхода флуоресценции хлорофилла при включении низкоинтенсивного модулированного света в адаптированных к темноте листьях, F'm – максимальная величина выхода флуоресценции во время насыщающей вспышки, созданной на фоне постоянно действующего света, F' - выход флуоресценции хлорофилла при освещении листа постоянным действующим светом (относительные единицы).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У растений, которые получали достаточно воды, эвапотранспирация возрастала на протяжении почти всего эксперимента (рис. 1а), что очевидно отражало рост растений и увеличение поверхности листьев, с которой испарялась вода. Прекращение полива сопровождалось резким снижением испарения воды растениями, которое началось через 4 суток после прекращения полива.

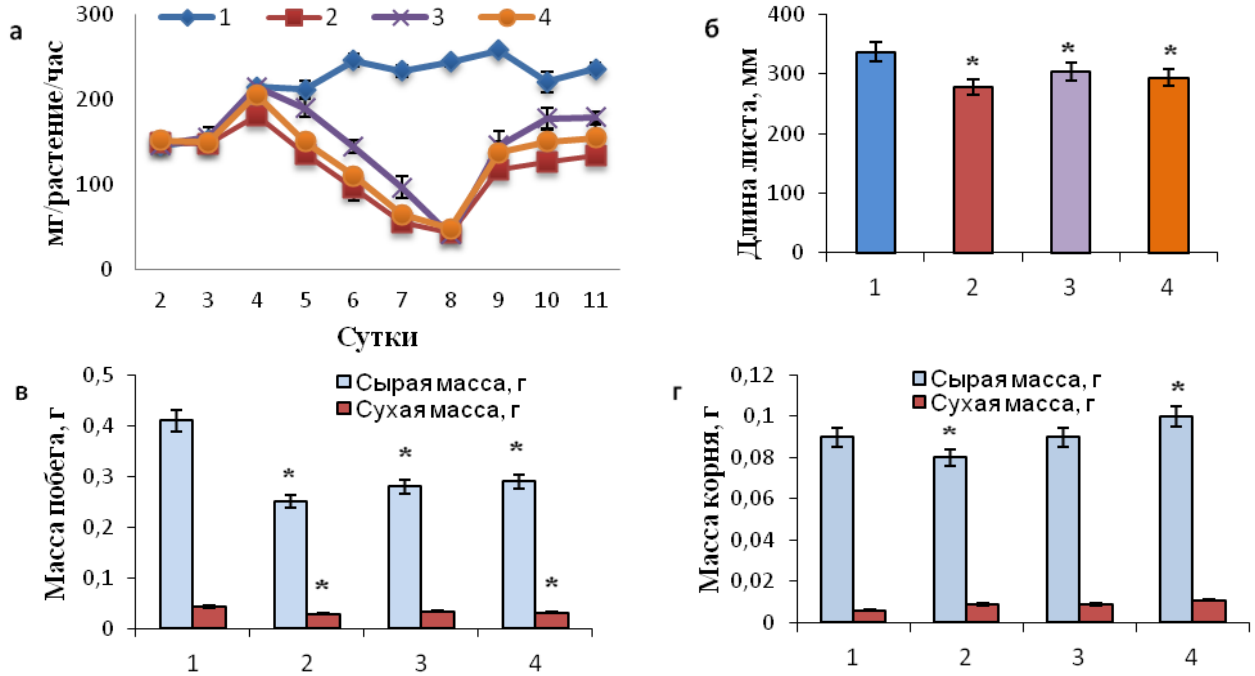

Рис. 1. Интенсивность эвапотранспирации (а) и ростовые характеристики (длина листа (б), масса побега (в), масса корня (г)) у растений пшеницы, которые получали достаточное количество воды без бактериальной обработки (1) и при прекращении полива с последующим его возобновлением, необработанных бактериями (2), обработанных препаратом «Азолен» (3) и *P. plecoglossicida 2.4-D* (4). Статистически отличающиеся значения отмечены звездочкой, t-тест, p≤0,05; n=20.

Возобновление полива привело к быстрому возрастанию эвапотранспирации, хотя до конца эксперимента ее величина не достигла уровня контроля (рис. 1а). Как в отсутствие полива, так и при его возобновлении, обработанные бактериями растения испаряли больше воды, чем необработанные (в среднем на 37 и 16 % при обработке препаратом «Азолен» и *P. plecoglossicida 2.4- D*, соответственно). У растений, в ризосферу которых ввели суспензию бактерий *P. koreensis ИБ-4*, эватранспирация была достоверно выше, чем у растений, обработанных *P. plecoglossicida 2.4-D*. Наиболее ярко эти различия проявлялись на 5 сутки после прекращения полива. На 8 сутки после прекращения полива различия между вариантами на фоне дефицита воды нивелировались (все растения испытывали сильный

стресс, при котором содержание воды в почве снижалось до 30 % от ПВП, и эвапотранспирация была минимальной).

Листья растений, которые не поливали, перед возобновлением полива были короче, по сравнению с растениями, которые на протяжении всего опыта получали достаточно воды (рис.1б). На фоне дефицита воды различия между вариантами (без бактерий и обработка обоими штаммами) были статистически недостоверными. Под влиянием временного прекращения полива сырая масса побегов снижалась на 28-35 %. Наименьшим снижение было у растений, обработанных «Азоленом», однако различие между вариантами было статистически недостоверным. Сухая масса побегов растений, подвергнутых стрессу, в ризосферу которых вводили «Азолен», была достоверно больше, чем у необработанных растений и обработанных *P. plecoglossicida 2.4-D* при том же режиме полива (рис. 1в).

Сырая масса корней при засухе снижалась в меньшей степени, чем масса побега. При дефиците воды у обработанных бактериями растений сырая масса корней была на уровне растений, получавших достаточно влаги, и достоверно больше у растений в варианте с *P. plecoglossicida 2.4-D* по сравнению с необработанными бактериями растениями в отсутствие стресса (рис. 1г).

Снижение эвапотранспирации у растений при втором варианте полива (более мягкий дефицит воды (50 % влаги в почве от ПВП)) было не так ярко выражено. В наименьшей степени она снижалась у растений, обработанных *P. plecoglossicida 2.4-D,* чем в остальных вариантах (лишь на 7 % по сравнению с хорошо политыми растениями) (рис. 2а).

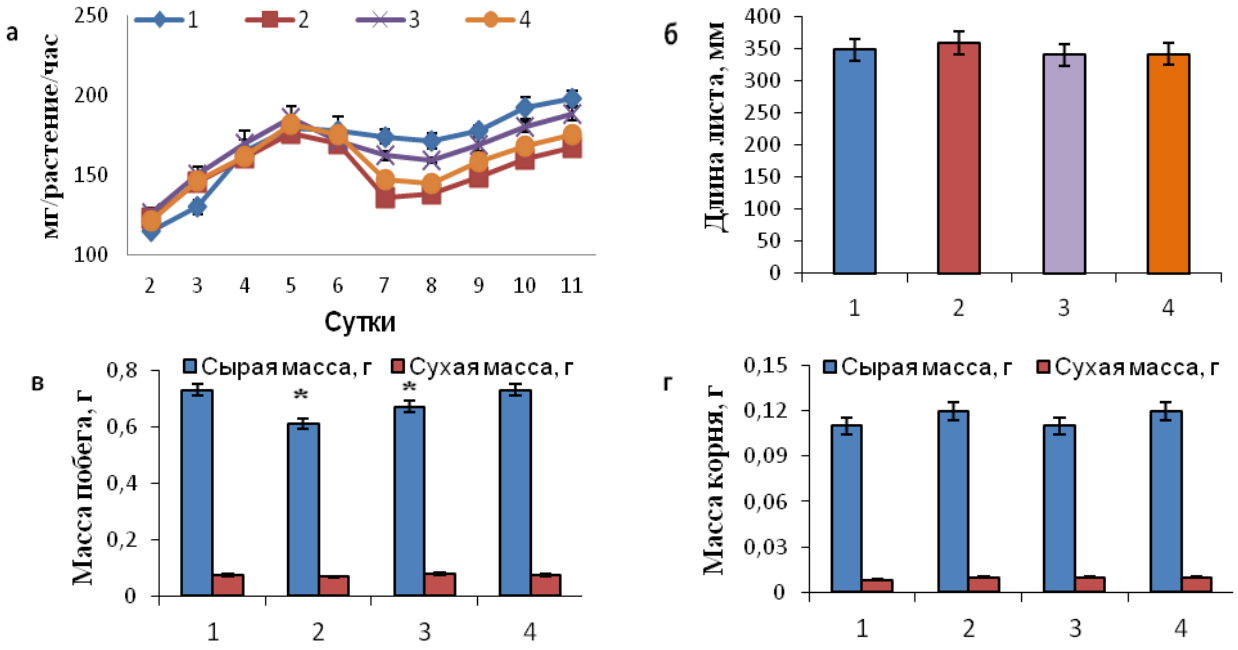

Рис. 2. Интенсивность эвапотранспирации (а) и ростовые характеристики (длина листа (б), масса побега (в), масса корня (г)) у растений пшеницы, которые получали достаточное количество воды без бактериальной обработки (1) и при влажности почвы 50%, необработанных бактериями (2), обработанных препаратом «Азолен» (3) и *P. plecoglossicida 2.4-D* (4). Статистически отличающиеся значения отмечены звездочкой, t-тест, p≤0,05; n=20.

При более мягком стрессе не было достоверных различий по длине листьев по сравнению с растениями, которые получали достаточно воды и инокулированных штаммами бактерий (рис. 2б). Сырая масса побега уменьшалась под влиянием умеренного дефицита воды у растений, необработанных бактериями и обработанных «Азоленом», но

не снижалась в варианте с *P. plecoglossicida 2.4-D,* как и не снижалась сырая масса корней при воздействии стресса (рис. 2в,г).

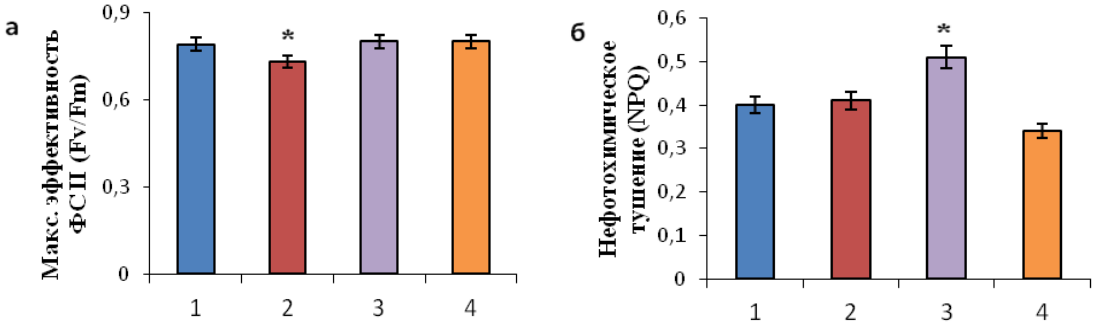

Рис. 3. Параметры флюоресценции хлорофилла: максимальная потенциальная квантовая эффективность фотосистемы II (а) и нефотохимическое тушение (б) у растений пшеницы, которые получали достаточное количество воды без бактериальной обработки (1) и при влажности почвы 50%, необработанных бактериями (2), обработанных препаратом «Азолен» (3) и *P. plecoglossicida 2.4-D* (4). Статистически отличающиеся значения отмечены звездочкой, t-тест, p≤0,05; n=8.

В отсутствие бактериальной обработки максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II уменьшался под влиянием умеренного дефицита воды, а на фоне бактериальных обработок и дефицита воды был на уровне растений, получавших достаточно воды. Уровень нефотохимического тушения не менялся под влиянием умеренного дефицита воды и обработки *P. plecoglossicida 2.4-D*, и был повышенным только в варианте с «Азоленом» (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение уровня транспирации играет важную роль в адаптации растений к дефициту воды, поддерживая водный баланс в условиях уменьшения ее доступности из-за прекращения дождей или полива [Davies et al., 2005]. Уменьшение потерь воды с испарением достигается как за счет закрытия устьиц, так и уменьшения площади листьев в результате замедления их роста под влиянием дефицита воды. В наших опытах мы наблюдали снижение эвапотранспирации под влиянием дефицита воды (резкое – при прекращение полива и постепенное - при снижении уровня полива), к чему могло привести замедление роста листьев, о котором мы могли судить по их укорочению. У растений, в ризосферу которых мы интродуцировали бактерии, транспирация на фоне прекращения полива была выше, чем у неинокулированных растений, которые росли при том же водном режиме. Хотя определенный вклад в эту реакцию могло внести увеличение площади листьев под влиянием бактерий, она не могла быть единственной причиной повышении транспирации, поскольку площадь листьев при прекращении полива увеличивалась под влиянием бактерий в меньшей степени, чем эвапотранспирация. Например, под воздействием биопрепарата «Азолен» транспирация возросла почти на 40 %, в то время как длина листа увеличилась меньше, чем на 10 %. При уменьшении уровня полива (умеренный дефицит воды) транспирация растений была достоверно выше в вариантах с интродукцией бактерий в почву, в то время как размер листьев растений был одинаковым. Эти результаты указывают на то, что увеличение транспирации в результате бактериальной обработки было следствием возрастания устьичной проводимости.

Сведения о влиянии ризосферных бактерий на устьичную проводимость противоречивы. В одних работах сообщается об увеличении этого показателя у растений

под влиянием бактерий [Zhang et al., 2008], а в других – о снижении [Salomon et al., 2014]. В обоих случаях бактерии благоприятно влияли на рост растений. Стимулирующее влияние повышения устьичной проводимости связывают с нормализацией газообмена и фотосинтеза, а положительное действие снижения устьичной проводимости – с предотвращением дегидратации при дефиците воды. В условиях дефицита воды повышение устьичной проводимости может отрицательно сказаться на водном балансе растений, что мы наблюдали ранее при действии ингибитора рецепции этилена, который снижал уровень АБК в растениях при дефиците воды, что сопровождалось повышением устьичной проводимости и потерей тургора растений [Шарипова и др., 2012]. Скажется ли открытие устьиц отрицательно на водном балансе, зависит от способности растений поглощать воду. Ранее было показано, что открытие устьиц и повышение скорости транспирации при нагреве воздуха не приводило к снижению водного потенциала листа, если при этом увеличивался приток воды из корней [Кудоярова и др., 2014]. Судя по тому, что оводненность тканей растений не снижалась под влиянием интродукции бактерий в ризосферу, это воздействие, очевидно, не только способствовало увеличению устьичной проводимости, но и – способности растений снабжать себя водой. В случае *P. plecoglossicida* 2.4-D повышение способности поглощать воду могло быть связано с влиянием бактерий этого штамма на массу корней, которая увеличивалась на фоне временного прекращения полива.

Активация роста корней (как абсолютная, так и относительная, т.е. меньшее снижение массы корней по сравнению с массой побега) является одним из важных механизмов адаптации растений к дефициту воды [Кудоярова и др., 2013]. Этот механизм реализовался и в наших экспериментах, как на фоне дополнительной бактеризации ризосферы, так и без нее. Вместе с тем, на фоне воздействия «Азолена» у растений не было абсолютной активации роста корней, как при воздействии *P. plecoglossicida* 2.4-D. Тем не менее, именно в этом варианте было зарегистрировано наиболее значительное повышение транспирации, что не приводило к снижению оводненности растений. Остается предположить, что «Азолен» повышал способность тканей растений проводить воду, что могло быть связано и активацией водных каналов. Повышение экспрессии генов, кодирующих водные каналы, было зарегистрировано при интродукции бактерий *B. megaterium* в ризосферу кукурузы [Marulanda et al., 2010]. Не исключено, что и данном случае мог действовать подобный механизм.

При дефиците воды и питательных веществ сахара накапливаются в листьях и корнях [De Jong et al., 2014; Lin et al., 2014], и фотосинтез, как правило, при этом подавляется в меньшей степени, чем рост побега [Pinheiro, Chaves, 2011]. Под влиянием бактерий максимальный квантовый выход фотосистемы II возрастал, что коррелировало с повышением способности растений накапливать сухую массу в соответствии с данными литературы о наличии такой корреляции [Sharma et al., 2015]. Засуха не влияла на уровень нефотохимического тушения, и только под влиянием микроорганизмов препарата «Азолен» этот показатель возрастал. Уровень нефотохимического тушения возрастал при резком снижении устьичной проводимости, когда уменьшение притока углекислого газа понижало уровень акцепторов электронов и водорода, необходимых для протекания процесса фотосинтеза, и возникала необходимость рассеивания поглощенной энергии света в виде тепла. Очевидно, в случае умеренной засухи, при которой мы измеряли показатели флуоресценции хлорофилла, снижение устьичной проводимости было недостаточно большим, чтобы потребовалось возрастание уровня нефотохимического тушения. Его уровень возрастал лишь в случае применения «Азолена». А меньшая эффективность

этой обработки по сравнению с другим штаммом в условиях умеренной засухи указывает на то, что фотосистема растений на фоне «Азолена» функционировала недостаточно эффективно при данном водном режиме.

Интересно то, что изученные штаммы по-разному проявляли свою рост стимулирующую активность на фоне засухи разной интенсивности. Бактерии препарата «Азолен» были более эффективны, на фоне временного прекращения полива. Это проявлялось в более значительном увеличении уровня эвапотранспирации, значительной прибавке сухой массы растений и скорости удлинения листьев. А действие *P. plecoglossicida* 2.4-D было более выраженным на фоне умеренной засухи, когда бактерии этого штамма предотвращали снижение массы побега.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четверикова Д.В., Столярова Е.А., Мухаматдьярова С.Р., Кудоярова Г.Р. Влияние бактерий-деструкторов углеводородов нефти на прорастание и рост растений // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 2. С. 175-183.
2. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 165-175.
3. Кудоярова Г.Р., Веселов Д.С., Шарипова Г.В., Ахиярова Г.Р., Dodd I.C., Веселов С.Ю. Водный обмен и рост исходных и дефицитных по АБК мутантных растений ячменя при повышении температуры воздуха // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 2. С. 207-213.
4. Рафикова Г.Ф., Коршунова Т.Ю., Миннебаев Л.Ф., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Новый штамм бактерий *Pseudomonas koreensis ИБ-4* как перспективный агент биологического контроля фитопатогенов // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 317-326.
5. Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Тимергалин М.Д., Wilkinson S. Влияние ингибитора рецепции этилена на рост, водный обмен и содержание абсцизовой кислоты у растений пшеницы при дефиците воды // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 4. С. 619-626.
6. Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.U., Martinenko E.V., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // Plant Soil. 2007. V. 292. № 1. P. 305-315.
7. Barnawal D, Bharti N, Pandey SS, Pandey A, Chanotiya CS, Kalra A. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression // Physiol Plant. 2017. V. 161. № 4. P. 502-514.
8. 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 Regulation. 2005. V. 24. № 4. P. 285-295.
9. De Jong F., Thodey K., Lejay L.V., Bevan M.W. Glucose elevates nitrate transporter 2.1 protein levels and nitrate transport activity independently of its hexokinase1-mediated stimulation of nitrate transporter 2.1 expression // Plant Physiology. 2014. V. 164. P. 308-320.

10. Lin W.Y., Huang T.K., Leong S.J., Chiou T.J. Long-distance call from phosphate: systemic regulation of phosphate starvation responses // Journal of Experimental Botany. 2014. V. 65. P. 1817-1827.
11. Liu F., Xing S., Ma H., Du Z., Ma B. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in Platycladus orientalis container seedlings // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. № 20. P. 9155-9164.
12. Marulanda A., Azcón R., Chaumont F., Ruiz-Lozano J.M., Aroca R. Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a Bacillus megaterium strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt–stressed conditions // Planta. 2010. V. 232. № 2. P. 533-543.
13. Omasa K., Takayama K. Simultaneous measurement of stomatal conductance, non-photochemical quenching, and photochemical yield of photosystem II in intact leaves by thermal and chlorophyll fluorescence imaging // Plant Cell Physiol. 2003. V. 44. №. 12. P. 1290-300.
14. Pinheiro C., Chaves M.M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? // Journal of Experimental Botany. 2011. V. 62. P. 869-882.
15. Salomon M.V., Bottini R., de Souza Filho G.A., Cohen A.C., Moreno D., Gil M., Piccoli P. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of Vitis vinifera retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine // Physiol. Plant. 2014. V. 151. № 4. P. 359-374.
16. Sarma R.K., Ratul Saikia R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain Pseudomonas aeruginosa GGRJ21 // Plant Soil. 2014. V. 377. № 1-2. P. 111-26.
17. Sharma D.K., Andersen S.B., Ottosen C.O., Rosenqvist E. Wheat cultivars selected for high Fv /Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter // Physiol Plant. 2015. V. 153. № 2. P. 284-98.
18. Wilkinson S., Kudoyarova G.R., Veselov D.S., Arkhipova T.N., Davies W.J. Plant Hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. Review // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 9. P. 3499-3509.
19. Zhang H., Xie X., Kim M.S., Kornyeyev D.A., Holaday S., Paré P.W. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta // Plant J. 2008. V. 56. № 2. P. 264-273.