

На правах рукописи



АХТЯМОВА ЗАРИНА АСХАТОВНА

**ВЛИЯНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ,
РОСТ И ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ В
ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ И НА ФОНЕ ЗАСОЛЕНИЯ**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в Уфимском Институте биологии – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Веселов Дмитрий Станиславович

Официальные оппоненты: **Белимов Андрей Алексеевич**,
доктор биологических наук, Федеральное
государственное бюджетное научное
учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»,
заведующий лабораторией

Воденев Владимир Анатольевич,
доктор биологических наук, Федеральное
государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского», заведующий кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита состоится «2» февраля 2023 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.002.02. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Тел. (812) 342-54-42, факс (812) 372-54-43, Адрес электронной почты: dissovet.24100202@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук <https://www.binran.ru/dissertatsionnyye-sovety/dissovet-02/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Известно, что многие ризосферные микроорганизмы стимулируют рост растений и повышают их продуктивность как в благоприятных, так и стрессовых условиях (Belimov et al., 2009; Vejan et al., 2016). Поэтому во всем мире рост стимулирующие бактерии все шире применяют в растениеводстве для увеличения урожайности растений (Ruzia, Arca; 2015; Backer et al., 2018). Не прекращается поиск новых штаммов бактерий. Однако для более эффективного поиска и применения таких бактерий необходимо лучше понимать механизм их действия на растения. Одним из важных свойств бактерий является их способность синтезировать фитогормоны, которые ускоряют рост растений и повышают их устойчивости к стрессовым условиям (Tsukanova et al., 2017; Kudoyarova et al., 2019). Поэтому продукцию гормонов бактериями используют как один из основных показателей при первичном отборе потенциальных рост стимулирующих бактерий. Однако действие бактерий определяется не просто их способностью синтезировать фитогормоны, но и влиять на гормональный баланс в самих растениях (Kudoyarova et al., 2019). Вместе с тем, содержание гормонов у обработанных бактериями растений измеряют нечасто, а имеющиеся сведения нередко оказываются противоречивыми, особенно это касается гормона абсцизовой кислоты (АБК). В литературе можно встретить сообщения о рост стимулирующем действии бактерий, как продуцирующих АБК и повышающих концентрацию этого гормона в растениях (Cohen et al., 2009), так и бактерий, катаболизирующих АБК, интродукция которых в ризосферу снижает ее содержание в растениях (Belimov et al., 2014). Для выявления роли этого гормона в реакции растений на бактеризацию использовали дефицитные по АБК мутанты томатов (Porcel et al., 2014). Однако влияние бактерий на дефицитные по АБК мутанты ячменя не было исследовано до начала нашей работы. АБК играет важную роль в регуляции водного обмена растений, а изучению влияния бактерий на водный обмен растений уделялось недостаточно внимания. Между тем важно понять, как поддерживается водный баланс у инокулированных бактериями растений, у которых стимуляция их роста увеличивает площадь листьев и, соответственно, приводит к возрастанию потерь воды с транспирацией.

Цель исследования – выявление влияния гормонпродуцирующих ризосферных бактерий на гормональный баланс растений *Triticum durum* Desf. и *Hordeum vulgare* L. и значения этого эффекта в регуляции роста и развития растений, их водного обмена и солеустойчивости.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние введения в ризосферу растений пшеницы (*Triticum durum* Desf.) бактерий штаммов *Bacillus subtilis* IB-22 и *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 на содержание гормонов (ауксинов и цитокининов) в отсутствии стрессовых воздействий и на фоне засоления и сопоставить вызванные бактериями сдвиги в содержании гормонов с их влиянием на рост и концентрацию хлорофилла.

2. Оценить влияние бактеризации на формирование поясков Каспари и его связь с водным обменом растений, поглощением элементов минерального питания (калия и фосфора) и накоплением натрия у растений пшеницы (*T. durum*) на фоне засоления и в его отсутствии.

3. Изучить влияние ризосферных бактерий на содержание абсцизовой кислоты в побегах и корнях у растений ячменя (*H. vulgare* L.) на фоне засоления и в его отсутствии и реакцию на инокуляцию бактериями у дефицитного по АБК мутанта ячменя (Az34) и его родительской формы Steptoe.

4. Оценить способность бактерий штамма *B. subtilis* IB-22 продуцировать АБК и изучить влияние засоления и инокуляции бактериями на экспрессию генов, контролирующих метаболизм АБК, у дефицитного по АБК мутанта Az34 и его родительской формы Steptoe.

Научная новизна исследования. Впервые выявлено влияние бактерий, стимулирующих рост растений, на образование апопластных барьеров у растений *T. durum* на фоне засоления. Показано, что ускоренное формирование поясков Каспари на фоне засоления в наибольшей степени проявлялось у растений, обработанных бактериями штамма *P. mandelii* IB-Ki14, продуцирующими ауксины, что сопровождалось снижением накопления ионов натрия. Бактерии штамма *B. subtilis* IB-22, продуцирующие цитокинины, в меньшей степени влияли на образование апопластных барьеров, хотя повышение солеустойчивости растений в их случае было выражено сильнее. Впервые проведена сравнительная оценка реакции на инокуляцию бактериями у однодольных растений дефицитного по АБК мутанта *H.*

vulgare и его родительского сорта. В отличие от изученных ранее мутантных растений *Solanum lycopersicum*, впервые показано, что на фоне засоления обработка бактериями стимулировала рост, как дефицитного по АБК мутанта *H. vulgare*, так и растений его исходного генотипа. Впервые обнаружено, что снижение уровня стресс-индуцированного накопления АБК в побегах растений под влиянием бактерий, сопровождается накоплением этого гормона в корнях. Показано, что повышение концентрации АБК в корнях *H. vulgare* под влиянием *B. subtilis* IB-22 обусловлено как продукцией этого гормона бактериями, так и их влиянием на экспрессию генов, контролирующих метаболизм АБК в самих растениях.

Научно-практическая значимость исследования. Результаты проведенных исследований вносят существенный вклад в углубление представлений о механизмах влияния бактерий на рост растений в условиях засоления. Выявленное положительное влияние бактерий на формирование апопластных барьеров и его связь со снижением накопления ионов натрия при засолении могут быть использованы при отборе штаммов бактерий для разработки биотехнологии их применения, направленной на повышение солеустойчивости растений. Обнаруженная способность бактерий снижать уровень стресс-индуцированного накопления АБК и увеличивать концентрацию этого гормона в корнях растений, повышая способность последних проводить воду, свидетельствует о важности изучения влияния бактерий на уровень и распределение этого гормона между побегом и корнем и необходимости оценки этого показателя для повышения эффективности применения бактерий в растениеводстве.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ризосферные бактерии оказывают влияние на содержание гормонов в растениях как благодаря способности продуцировать фитогормоны (*P. mandelii* IB-Ki14 - ауксины, *B. subtilis* IB-22 – цитокинины и АБК), так и за счет влияния на экспрессию генов, контролирующих метаболизм гормонов, что показано на примере АБК. Вызванные бактериями изменения в содержании гормонов способствуют активации роста растений пшеницы (*Triticum durum* Desf.) и ячменя (*Hordeum vulgare* L.) как в нормальных условиях, так и при засолении.

2. Бактерии штамма *B. subtilis* IB-22 снижают уровень стресс индуцированного накопления АБК в побегах растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.), но повышают уровень АБК в корнях, что связано с поддержанием оводненности растений при засолении.

3. У дефицитного по АБК мутанта ячменя (*Hordeum vulgare* L.) Az34, как и у растений исходного сорта, выявлена активация роста под влиянием *B. subtilis* IB-22 в нормальных условиях и при засолении, что является следствием изменения метаболизма АБК под влиянием бактерий.

4. Ускорение и усиление отложения лигнина и суберина и формирования апопластных барьеров под влиянием ризосферных бактерий способствуют поддержанию ионного гомеостаза при засолении.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в данном исследовании, были представлены на 2-ой Международной научной конференции PLAMIC 2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020 г.), V Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация: итоги и перспективы» (Казань, 2021), V Школе-конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах из списка ВАК РФ, две из которых относятся к индексируемым в базе данных Web of Science.

Связь работы с научными программами. Исследования поддержаны грантами РФФИ №18-04-00460, РФФИ-аспиранты №20-34-90007 и грантом РНФ №21-14-00070.

Личный вклад соискателя. Диссертант самостоятельно провела анализ литературы, участвовала в планировании и проведении экспериментов, осуществляла обработку и анализ полученных результатов, формулирование выводов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 161 страницах, содержит 7 таблиц и 36 рисунков. Список литературы включает 343 источника, из них 323 иностранных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, д.б.н., Д.С. Веселову за ценные советы и всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы, всем сотрудникам лаборатории физиологии растений УИБ УФИЦ РАН и сотрудникам лаборатории прикладной микробиологии УИБ УФИЦ РАН за помощь в проведении лабораторных исследований и обсуждении работы, а также к.б.н. В.И. Сафроновой – за проведение элементного анализа и обсуждение статьи, опубликованной по его результатам.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данном разделе приводятся данные литературы о ризобактериях, стимулирующих рост растений и функция продуцируемых бактериями гормонов (ауксинов, цитокининов, абсцизовой кислоты (АБК), этилена, гиббереллинов, жасмоновой и салициловой кислоты), механизмах влияния ризосферных бактерий на содержание гормонов в растениях и взаимодействии гормонов друг с другом, о засолении и механизмах солеустойчивости (осмотическом и токсическом компонентах в действии засоления и роли апопластных барьеров в солеустойчивости растений).

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. Опыты проводили на растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Steptoe, его дефицитном по абсцизовой кислоте мутанте Az34, ячмене сорта Прерия и растениях твёрдой яровой *Triticum durum* Desf (*Triticum durum* Desf.) сорта Башкирская 27. Растения *H. vulgare* отличаются относительно высокой солеустойчивостью, в то время как твердая пшеница известна своей относительно низкой устойчивостью к засолению (Munns et al., 2008; Veselov et al.,

2009). Для обработки растений использовали штаммы бактерий *Bacillus subtilis* IB-22 и *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14. Бактериальные питательные среды и условия культивирования бактерий приведены в диссертации.

Постановка экспериментов. В качестве субстрата для выращивания растений *Hordeum vulgare* использовали песок, почву и вермикулит. Растения *Triticum durum* выращивали в глинисто-иллювиальной почве с содержанием гумуса (6.3%), и добавлением 10 % песка. В опытах с использованием почвы за три дня до посадки растений субстрат в сосудах проливали либо водой, либо 100 мМ раствором NaCl до 100 % полной влагоёмкости. Песок или вермикулит предварительно смачивали раствором 50% Хогланда-Арнона (Hoagland, Arnon, 1950) до 90% полной влагоёмкости. В питательный раствор половины сосудов добавляли хлорид натрия до концентрации 100 мМ. После этого в сосуды помещали по 10 проростков на глубину 1,5-2 см. Обработку проростков суспензией *Bacillus subtilis* IB-22 и *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 проводили путем внесения суспензии (10^7 КОЕ / растение для *Triticum durum* и 10^8 КОЕ / растение для *Hordeum vulgare* – концентрация бактерий была подобрана в предварительных экспериментах) в прикорневую среду каждого растения в количестве 1 мл. Контролем служили растения, не подвергавшиеся бактериальной обработке. Растения выращивали при освещенности $400 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ФАР и 14 ч фотопериоде. На протяжении эксперимента влажность песка и вермикулита поддерживали на уровне 80% полной влагоёмкости, а влажность почвы – на уровне 70% путем ежедневного полива растений дистиллированной водой. Для поддержания питания растения, выращенные на песке и вермикулите, через день получали по 10 мл 10% раствора Хогланда-Арнона на сосуд.

Анализ фитогормонов. Экстракцию гормонов 80%-ным этиловым спиртом проводили на 8-е сутки после бактериальной обработки. Спиртовый экстракт упаривали до водного остатка. Для оценки способности *B. subtilis* IB-22 продуцировать абсцизовую кислоту, на 5-й день культивирования бактерий отбирали 1 мл культуральной жидкости. Абсцизовую кислоту (АБК) и индолилуксусную кислоту (ИУК) экстрагировали диэтиловым эфиром как описано (Veselov et al., 2008 – детали приведены в диссертации). Цитокинины концентрировали на картридже C18, (Bond-Elut, RP-C18) и разделяли с помощью

тонкослойной хроматографии (Merck 50x200x0.25 мм силикагеля 60 F-254) как описано в диссертации и в нашей статье (Martynenko et al., 2022). Содержание гормонов измеряли посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), используя антитела к соответствующим гормонам. Надежность использования иммуноанализа для определения гормонов была показана путем сравнения его результатов с данными физико-химических методов (Arkhipova et al., 2007; Kudoyarova et al., 2014; Veselov et al., 2018).

Анализ экспрессии генов *HvNCED1*, *HvNCED2*, *HvCYP707A1*, ответственных за метаболизм абсцизовой кислоты, проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием набора готовых реагентов EvaGreenI («Синтол», Россия) и прибора CFX Connect real-time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США) как описано в диссертации и нашей статье (Akhtyamova et al., 2021).

Содержание хлорофилла в листьях при помощи прибора DUALEX SCIENTIFIC+ (FORCE-A, France); коэффициент нефотохимического тушения – с помощью флуориметра Junior PAM («Walz», Германия). Транспирацию измеряли, взвешивая сосуды с растениями (почву в сосудах с растениями накрывали полиэтиленовой плёнкой). Относительное содержание воды определяли по соотношению ((сырая масса – сухая масса) / (тургорная масса – сухая масса))*100%. Водный потенциал листьев и субстрата измеряли спустя три часа после полива с помощью психрометра "Psypro" (Wescor, США); устьичную проводимость – с помощью порометра (MKDeltaT Devices, Великобритания). Определение содержания натрия, калия и фосфора в растениях *Triticum durum* проводили с помощью эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой ICPE-9000 (Shimadzu, Япония). Площадь листьев определяли с помощью программы Image J.

Для визуализации лигнина и суберина с гемисульфатом берберина (Musielak et al., 2015) на поперечных срезах корней использовали раствор полусульфата берберина. Флуоресценцию берберина возбуждали твердотельным лазером с длиной волны 488 нм и регистрировали при 520 нм на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Olympus FluoView FV3000 (Olympus, Япония).

Для статистического анализа использовали стандартные программы MS Excel и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA - Statistica 10) в сочетании

с тестом Дункана. В таблицах и рисунках указаны средние значения и их ошибки. Средние значения по каждому показателю, достоверно не отличающиеся друг от друга, обозначены одинаковыми буквами ($p \leq 0,05$, тест Дункана).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние ризобактерий на растения пшеницы (*T. durum* Desf.), выращенные в оптимальных условиях и на фоне засоления

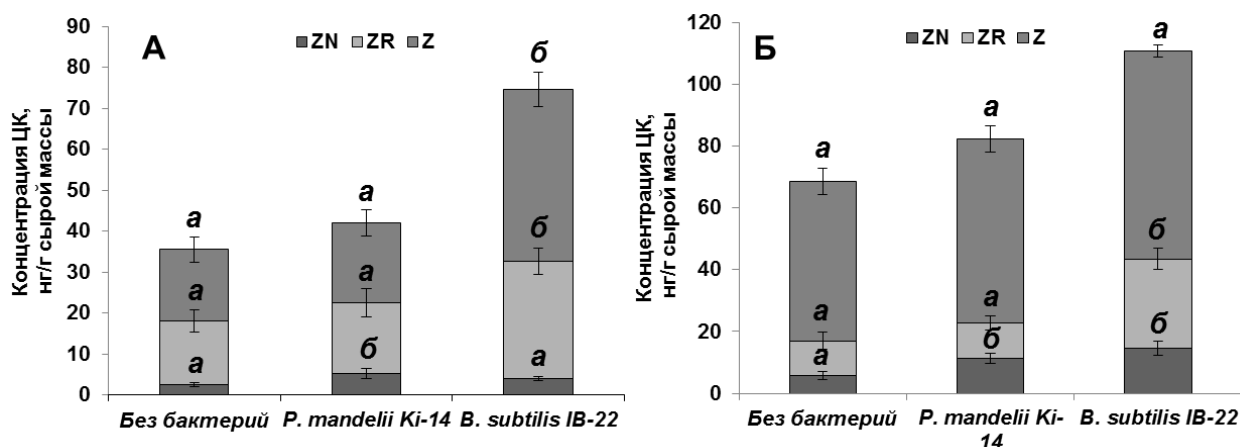


Рис. 1. Концентрация цитокининов (ЦК) в корнях (а) и побегах (б) растений *T. durum* на 6 сутки после бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22. Здесь и далее средние значения по каждому показателю, достоверно не отличающиеся друг от друга, обозначены одинаковыми буквами ($p \leq 0,05$).

3.1.1. Содержание гормонов и хлорофилла, рост и водный обмен у растений пшеницы (*T. durum* Desf.)

Как видно из рис.1, штамм бацилл, способный, как было показано ранее (Arkhipova et al., 2005), продуцировать цитокинины, увеличивал содержание суммы зеатина, его рибозида и нуклеотида как в побегах, так и корнях растений *T. durum*. Их действие проявлялось как в отсутствие засоления, так и на его фоне (рис. 2). При этом штамм псевдомонад, продуцирующих ауксины (Kudoyarova et al., 2017), не оказывал существенного влияния на уровень цитокининов (рис. 1, 2).

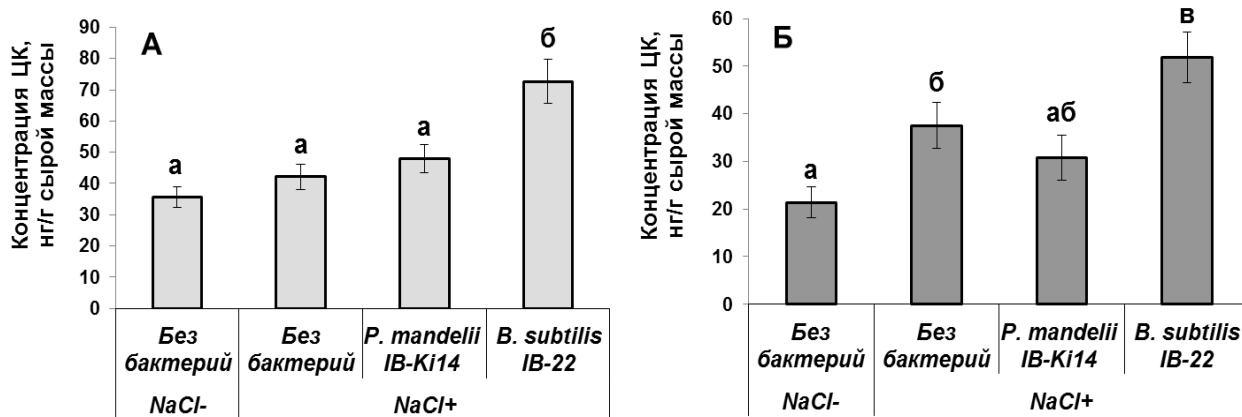


Рис. 2. Влияние 100 мМ NaCl и бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 (IB-14) и *B. subtilis* IB-22 (IB-22) на концентрацию ЦК (зеатина, его рибозида и нуклеотида) в корнях (а) и побегах (б) шестидневных растений *T. durum*.

Бактерии *P. mandelii* IB-Ki14, напротив, способствовали увеличению содержания ауксинов в побегах и корнях растений, как без засоления (рис. 3), так и на его фоне (рис. 4), что соответствует сведениям о том, что они способны продуцировать ауксины. Бактерии штамма *B. subtilis* IB-22 не оказывали существенного влияния на уровень ауксинов в растениях (рис. 3 и 4).

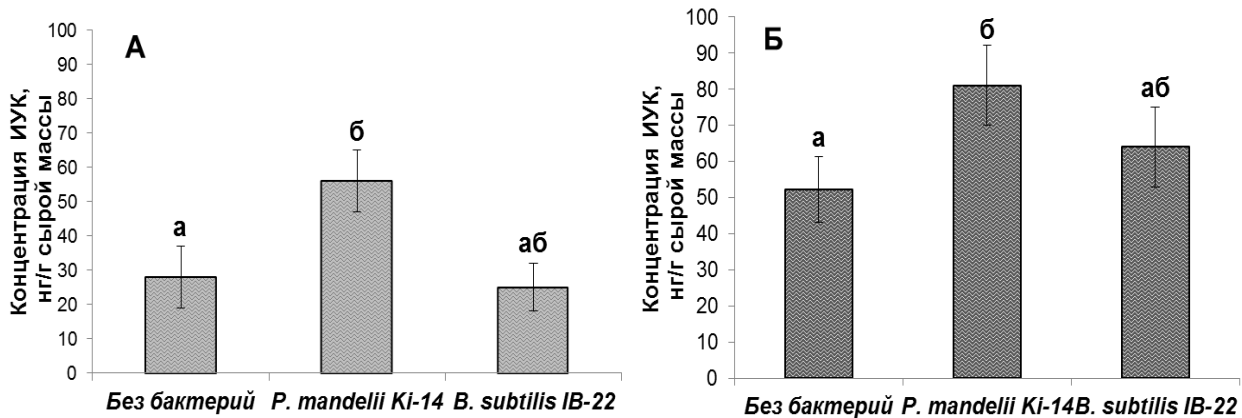


Рис. 3. Концентрация ИУК в корнях (а) и побегах (б) растений *T. durum* на 6 сутки после бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22.

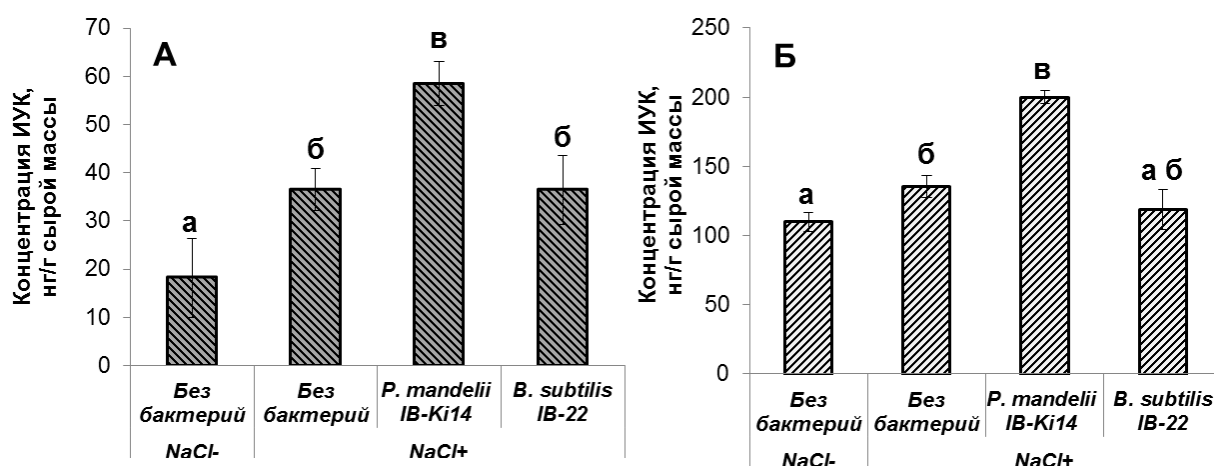


Рис. 4. Влияние засоления (100 мМ NaCl) и бактериальной обработки (*P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22) на концентрацию ИУК в корнях (а) и в побегах (б) шестидневных растений *T. durum*.

Повышение концентрации гормонов под влиянием бактерий сопровождалось и, очевидно, было причиной увеличения массы побегов растений *T. durum*, и содержания хлорофилла (табл. 1). Степень проявления стимулирующего действия была выше у бактерий штамма *B. subtilis* IB-22, повышающих уровень цитокининов в растениях.

Таблица 1. Сырая масса корней (n=10), побегов (n=40) и концентрация хлорофилла (n=25) 14-суточных растений *T. durum* в контроле и на фоне интродукции в ризосферу бактерий

Вариант обработки	Сырая масса корней, мг	Сырая масса побегов, мг	Концентрация хлорофилла, мкг/см ²
Без бактерий	96±11 ^б	305±8 ^а	21±1 ^а
<i>P. mandelii</i> IB-Ki14	85±8 ^{аб}	357±13 ^б	26±0.8 ^б
<i>B. subtilis</i> IB-22	77±6 ^а	395±10 ^в	28±1 ^б

Способность бактерий стимулировать рост растений проявлялась также на фоне засоления (табл. 2), что соответствует данным литературы о повышении солеустойчивости растений под влиянием ризосферных бактерий (Bharti et al., 2016).

Таблица 2. Сырая масса корней (n=10) и побегов (n=40) растений *T. durum* на 12-й день эксперимента

Концентрация NaCl, mM	Вариант обработки	Сырая масса, мг	
		Корень	Побег
0	Без бактерий	94 ± 6 ^б	305 ± 8 ^е
100	Без бактерий	70 ± 3 ^а	198 ± 8 ^в
100	<i>P. mandelii</i> IB-Ki14	77 ± 4 ^{аб}	243 ± 7 ^г
100	<i>B. subtilis</i> IB-22	81 ± 5 ^б	266 ± 7 ^д

3.1.2. Влияние ризосферных бактерий на формирование апопластных барьеров у растений пшеницы (*T. durum* Desf.)

Одним из важных механизмов повышения солеустойчивости считается усиленное формирование апопластных барьеров, препятствующих проникновению токсичных ионов в растения (Cui et al., 2021). Известно, что бактерии способны усиливать отложение лигнина, способствуя тем самым формированию апопластных барьеров. Однако это их свойство рассматривалось только как способ защиты от проникновения патогенов (Li et al., 2020). Мы впервые обратили внимание на возможное значение апопластных барьеров в повышении солеустойчивости растений под влиянием бактерий.

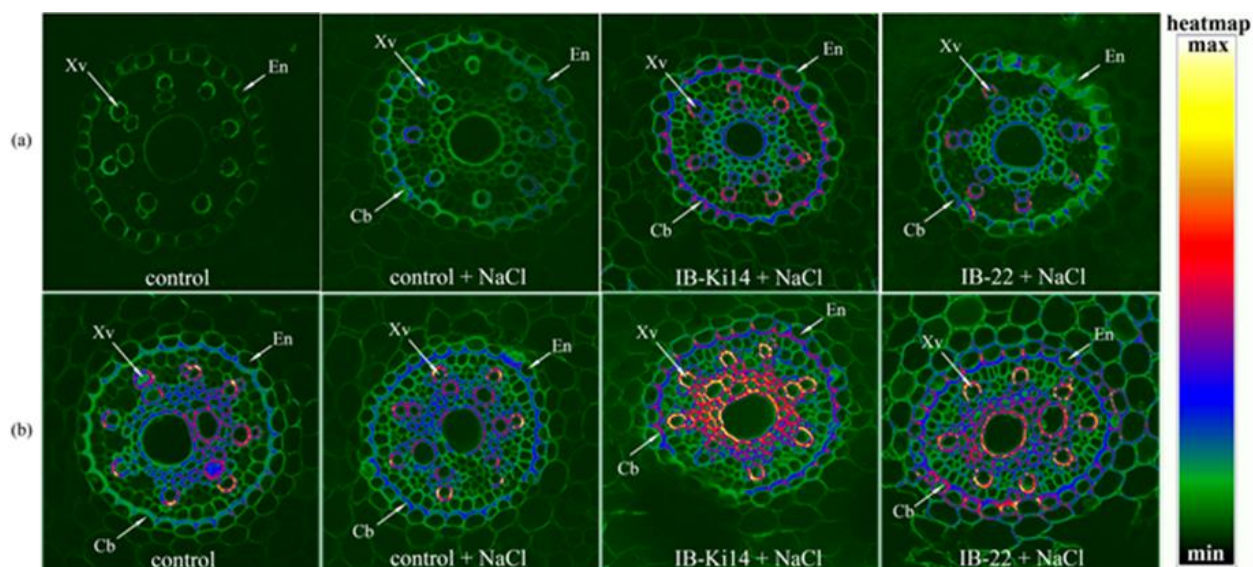


Рис. 5. Локализация лигнина и суберина и обнаружение поясков Каспари в окрашенных берберинем поперечных срезах корней 6-суточных (а) и 11-суточных (б) растений *T. durum*, обработанных бактериальными штаммами (*P. mandelii* IB-Ki14 (IB-Ki14) и *B. subtilis* IB-22 (IB-22) в присутствии соли. Сб – пояски Каспари, En – эндодерма, Xv – сосуды ксилемы.

С помощью окрашивания суберина и лигнина берберином на поперечных срезах базальной части корней мы зарегистрировали усиление отложения лигнина под влиянием бактерий и засоления. Причем влияние бактерий проявлялось быстрее и в большей степени. Компьютерная программа конфокального микроскопа позволяет преобразовать интенсивность свечения берберина в цвет. Зеленый соответствует наиболее слабому свечению, а затем по мере усиления свечения оно кодируется синим, красным и желтым цветом. Действие бактерий на отложение лигнина и суберина было заметно уже через 6 дней после начала солевого и бактериального воздействия (рис. 5). Наибольшее влияние оказал штамм псевдомонад. Особенность действия бактерий этого штамма может быть связана с их способность синтезировать ауксины, которые, по данным литературы, влияют на барьерные функции поясков Каспари (Ursache et al., 2021). У обработанных бактериями этого штамма растений заметно отложение лигнина в области радиальных стенок эндодермы поясков Каспари. Через 11 дней проявляется влияние засоления на укрепление апопластных барьеров, но у обработанных бактериями растений сохраняется более высокий уровень отложения лигнина.

3.1.3. Влияние ризосферных бактерий на концентрацию калия, натрия и фосфора у растений пшеницы (*T. durum* Desf.)

Важно было сопоставить уровень формирования апопластных барьеров у обработанных бактериями растений *T. durum* с результатами элементного анализа. Как видно из данных, представленных на рис. 6, содержание натрия возрастало под влиянием засоления, как в побегах, так и в корнях растений. Однако уровень накопления натрия в побеге снижался под влиянием *P. mandelii* IB-Ki14 на фоне засоления. Более низкий уровень накопления натрия у растений, инокулированных штаммом псевдомонад, можно объяснить тем, что эти бактерии вызывали усиленное формирование апопластных барьеров.

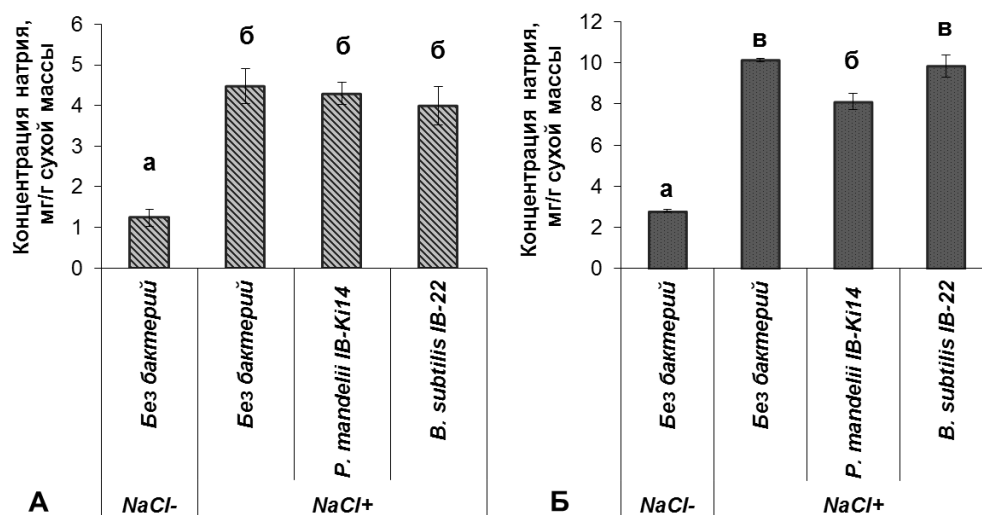


Рис. 6. Влияние 100 мМ NaCl и бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22 на концентрацию натрия в корнях (а) и побегах (б) растений *T. durum* на 11 сутки.

Действие штамма *B. subtilis* IB-22 иначе сказывалось на результатах элементного анализа. Мы зарегистрировали способность бактерий этого штамма предотвращать снижение уровня калия в корнях растений под влиянием засоления и поддерживать нормальный уровень фосфора в побегах (рис. 7).

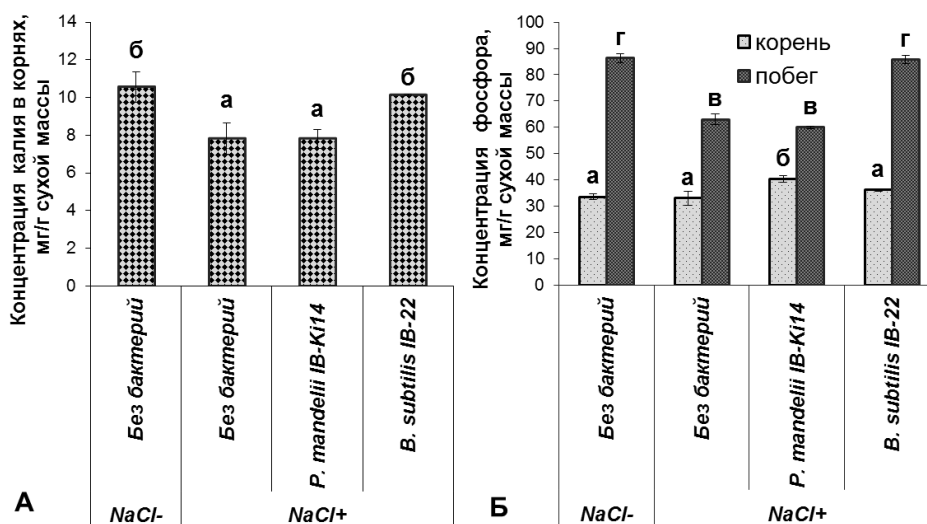


Рис. 7. Влияние 100 мМ NaCl и бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22 на концентрацию калия (а) и фосфора (б) в корнях и побегах растений *T. durum* на 11 сутки.

Представляет интерес тот факт, что бактерии штамма *B. subtilis* IB-22 были более эффективны в стимуляции роста растений на фоне засоления (табл. 2). Очевидно, у растений этого вида и возраста поддержание гомеостаза калия и

фосфора было более важно для их роста, чем предотвращение накопления натрия. Поддержание уровня калия у растений под влиянием *B. subtilis* IB-22 может быть связано со способностью бактерий этого штамма продуцировать цитокинины. Как было показано в опытах с трансгенными растениями томатов, индукция синтеза АБК препятствовала снижению концентрации калия в растениях при засолении (Ghanem et al., 2011).

Полученные нами результаты подтверждают положительную роль апопластных барьеров для растений как способ защиты от проникновения токсичных ионов при засолении. Однако эти барьеры снижают способность корней проводить воду. Важно было проверить, как влияют бактерии на отложение лигнина и суберина в отсутствие стресса и как их влияние сказывается на гидравлической проводимости растений.

Как видно из результатов, представленных на рис. 8, бактерии стимулировали образование апопластных барьеров в отсутствие засоления так же, как и на фоне засоления.

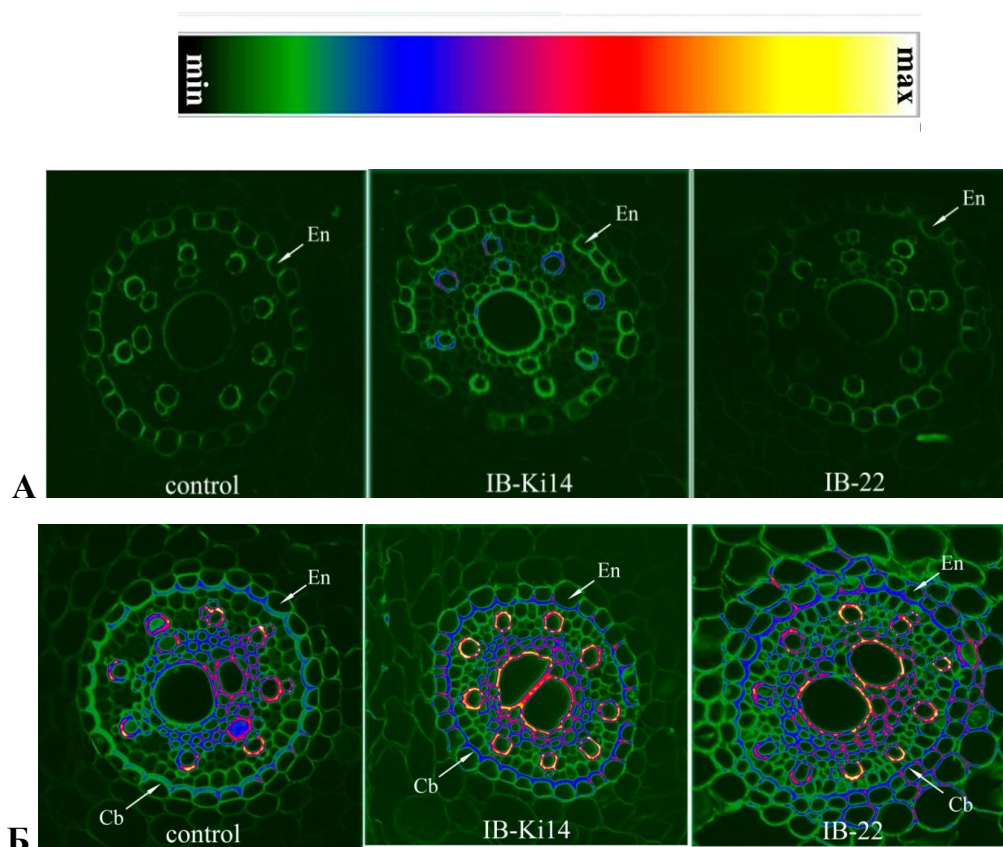


Рис. 8. Выявление лигнина и суберина по флуоресценции берберина на поперечных срезах базальной части корней *T. durum* через 6 (а) и 11 (б) дней после бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 (IB-Ki14) или *B. subtilis* IB-22 (IB-22). Обозначения, как на рис. 5.

Тем не менее, гидравлическая проводимость растений, обработанных штаммом псевдомонад, была не ниже, чем в контроле, а в случае бацилл даже выше, чем в контроле (рис. 9).

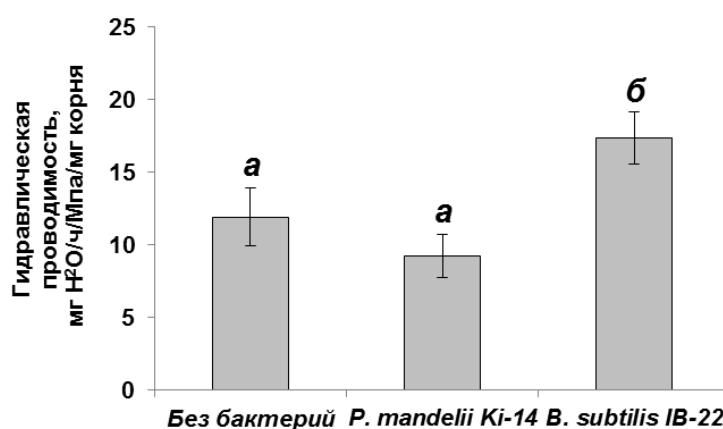


Рис. 9. Гидравлическая проводимость корней растений *T. durum* на 13 сутки после бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22.

Можно было предполагать, что потенциальная способность апопластных барьеров снижать гидравлическую проводимость могла быть скомпенсирована повышением активности транспорта воды через мембраны клеток с участием аквапоринов. Это предположение подтвердили недавно полученные в нашей лаборатории данные о повышении уровня аквапоринов у растения *H. vulgare* под влиянием данного штамма псевдомонад (Arkhipova et al., 2022).

3.2. Влияние штамма *B. subtilis* IB-22 на дефицитный по гормону АБК мутант ячменя (*H. vulgare* L.) Az34 и растения его родительского сорта Steptoe

Известно, что АБК способна повышать уровень аквапоринов в корнях растений (Sharipova et al., 2016). Представляло интерес проверить, как влияет бактериализация на уровень АБК в растениях. Опыты проводили на растениях *H. vulgare*, поскольку в нашем распоряжении был дефицитный по АБК мутант, и было важно сравнить его реакцию на действие бактерий с реакцией исходного генотипа. Для работы был выбран *B. subtilis* IB-22, поскольку бактерии этого штамма были более эффективны в стимуляции роста растений *T. durum* на фоне засоления. В предварительных опытах были подобраны условия выращивания растений *H. vulgare*, при которых проявлялось рост стимулирующее действие бактерий (данные приведены в диссертации).

3.2.1. Влияние *B. subtilis* IB-22 на содержание АБК у растений ячменя (*H. vulgare* L.)

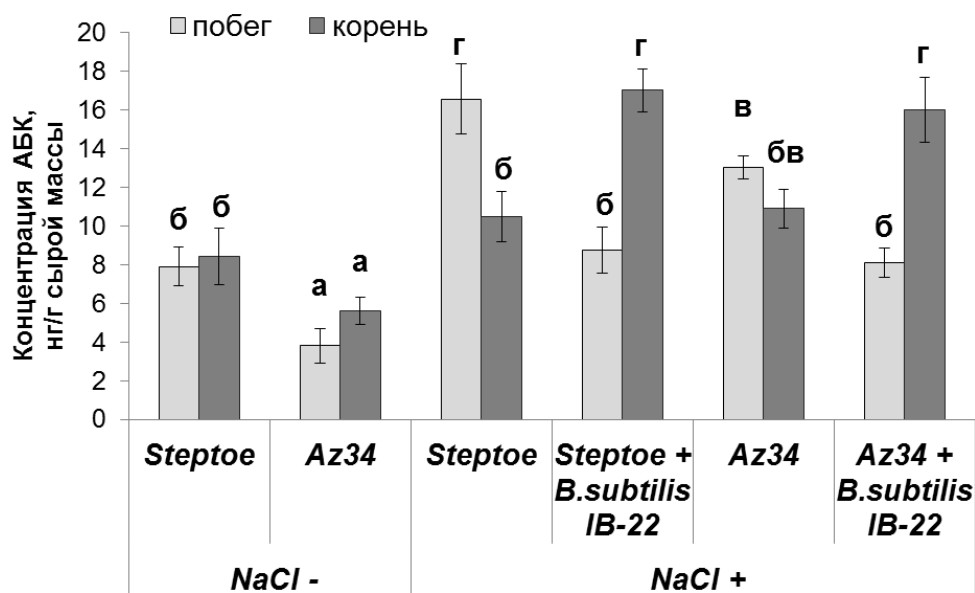


Рис. 10. Влияние *B. subtilis* IB-22 на содержание АБК в побегах и корнях растений *H. vulgare*, дефицитных по АБК (Az34) и его родительского сорта (Stepptoe).

Определение содержания АБК у растений *H. vulgare* выявило, как и ожидалось, более низкий уровень этого гормона как в побегах, так и в корнях дефицитного по АБК мутанта Az34 (рис. 10). Уровень АБК возрастал в побегах растений обоих генотипов под влиянием засоления, но был ниже у мутанта по сравнению с растениями исходного сорта Stepptoe. Бактериальная обработка снижала уровень стресс-индуцированного накопления АБК у растений обоих генотипов. Поскольку уровень накопления АБК при стрессе можно рассматривать как индикатор неблагоприятного воздействия на растения, снижение уровня этого гормона под влиянием бактерий свидетельствует об уменьшении стрессовой нагрузки, что проявлялось в уменьшении ингибирующего действия засоления на рост растений. В корнях, напротив, бактериальная обработка увеличивала приводила к накоплению АБК.

3.2.2. Рост, содержание хлорофилла и водный обмен у растений ячменя (*H. vulgare* L.), в ризосферу которых вводили бактерии

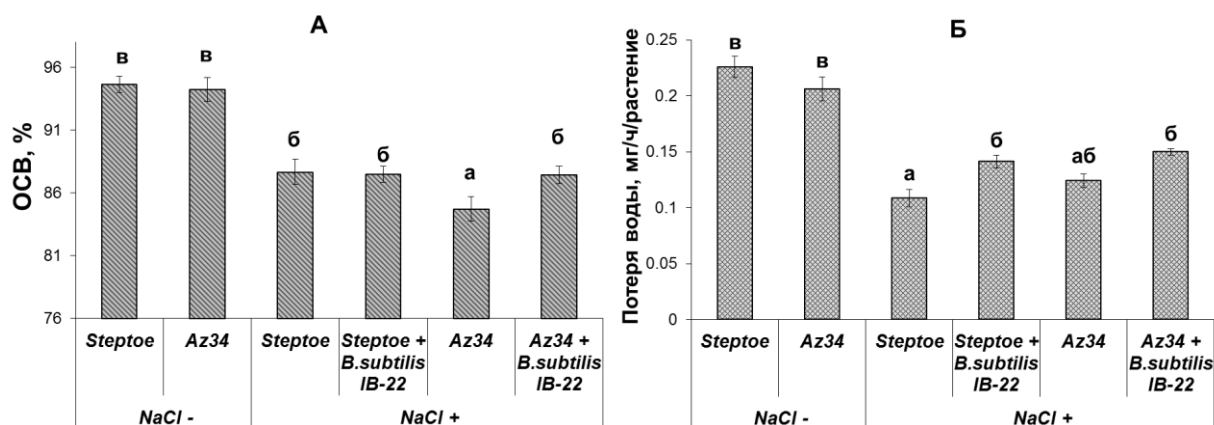


Рис. 11. Влияние *B. subtilis* IB-22 и засоления на относительное содержание воды (А) и транспирационные потери воды (Б) у растений *H. vulgare*, дефицитных по АБК (Az34) и его родительского сорта (Steptoe).

Накопление АБК в корнях, очевидно, было важным компонентом адаптивной реакции растений на засоление, которая могла обеспечивать баланс между притоком воды и ее испарением. Как видно из рис. 11, на фоне засоления без бактериальной обработки ОСВ у растений Az34 было самым низким, очевидно, из-за того, что приток воды не компенсировал ее потери за счет транспирации. Под влиянием бактерий ОСВ увеличивалось, несмотря на возросшую транспирацию, что свидетельствует об увеличении гидравлической проводимости. Очевидно, это было связано с накоплением АБК в корнях под влиянием бактерий.

3.2.3. Экспрессия генов, контролирующих метаболизм АБК у растений ячменя (*H. vulgare* L.)

Важно было понять, за счет каких механизмов возрастал уровень АБК в корнях растений, обработанных бактериями. С этой целью был проведен ПЦР анализ уровня транскрипта генов, ответственных за метаболизм АБК. Как видно из рис. 12, экспрессия гена *NCED2*, кодирующего фермент, катализирующий лимитирующую стадию синтеза АБК, была на порядок выше в корнях, чем в побеге и возрастала под влиянием засоления.

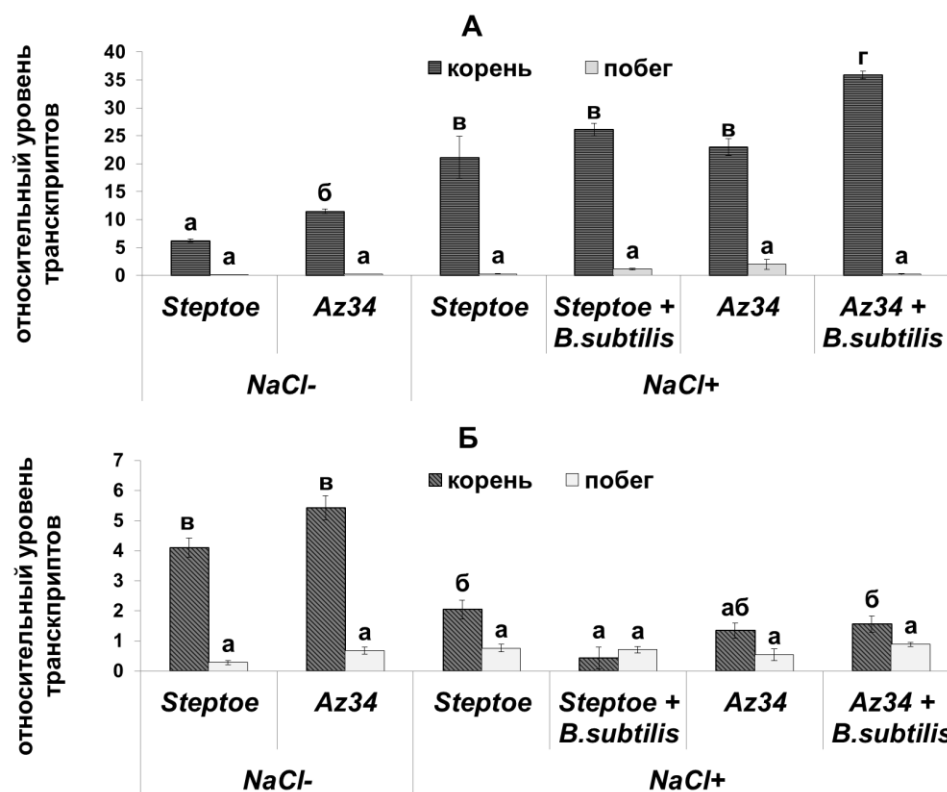


Рис. 12. Влияние бактериальной обработки *B. subtilis* IB-22 на содержание транскриптов генов *HvNCED2* (А) и *HvCYP707A1* (Б) в корнях и побегах растений дефицитного по АБК мутанта *H. vulgare*, Az34 и его родительского сорта Step-toe. Значения уровня транскриптов генов, ответственных за метаболизм АБК у *H. vulgare*, нормированы относительно гена *H. vulgare HvGADPH*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу.

Очевидно, у растений *H. vulgare* данного возраста АБК на фоне засоления синтезировалась, в основном, в корнях. Уровень транскрипта *HvNCED2* повышался, а *HvCYP707A1* – снижался под влиянием засоления. Повышение содержания АБК в корнях растений в результате бактериальной обработки было результатом поглощения этого гормона, синтезируемого *B. subtilis* IB-22. В культуральной жидкости бактерий этого штамма было обнаружено около 20 нг АБК на мл. Кроме того, возрастание содержания этого гормона у Az34 в результате бактериальной обработки было очевидно следствием повышения уровня транскрипта *HvNCED2* (рис. 12). Очевидно, повышение уровня транскрипта этого гена компенсировало пониженную активность молибденового фактора у мутантных растений, необходимого для превращения альдегида АБК в АБК. У растений Step-toe бактериальная обработка снижала уровень транскрипта гена, контролирующего распад АБК, что также способствовало накоплению этого гормона.

В отличие от работы (Porcel et al., 2014), в которой было зарегистрировано отсутствие роста стимулирующего действия *Bacillus megaterium* на дефицитный по АБК мутант томатов, в наших опытах аналогичный мутант *H. vulgare* положительно отзывался на обработку штаммом бацилл. Очевидно, это было связано как с особенностями штамма бактерий, так и видом растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере бактерий *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22 показано, что их присутствие в ризосфере *T. durum* и *H. vulgare* может повышать концентрацию в растениях тех гормонов, которые бактерии продуцируют: *P. mandelii* IB-Ki14 – ауксины, *B. subtilis* IB-22 – цитокинины и АБК. Вызванные бактериями изменения в концентрации гормонов способствуют активации роста растений, как в нормальных условиях, так и на фоне засоления. Инокуляция бактерий ускорила образование поясков Каспари и повышала уровень отложения лигнина и суберина в корнях, а усиленное формирование апопластных барьеров, контролируемых потоки ионов по апопласту, способствовали ионному гомеостазу на фоне засоления. Обработка растений *H. vulgare* бактериями штамма *B. subtilis* IB-22 снижала уровень индуцированного засолением накопления АБК, что является индикатором снижения под влиянием бактерий стрессовой нагрузки. В то же время выявлено накопление АБК в корнях растений *H. vulgare* под влиянием бактерий. Эта реакция может играть важную двойственную роль в адаптации растений к условиям обитания, с одной стороны, способствуя формированию апопластных барьеров (Akhiyarova et al., 2021), а с другой – оптимизируя водный обмен за счет активации транспорта через мембраны. Повышение концентрации АБК в корнях растений под влиянием *B. subtilis* IB-22 является следствием не только способности бактерий этого штамма продуцировать АБК, но и влиять на метаболизм этого гормона в самих растениях. В отличие от дефицитного по АБК мутанта томатов, у которых ризосферные бактерии не вызывали стимуляции роста, выявлена активация роста дефицитного по АБК мутанта ячменя под влиянием *B. subtilis* IB-22. Эта особенность действия данного штамма обусловлена его способностью нормализовать метаболизм АБК.

ВЫВОДЫ

1. Бактерии *Bacillus subtilis* штамма IB-22 увеличивали концентрацию цитокининов, а бактерии *Pseudomonas mandelii* штамма IB-Ki14 – концентрацию ауксинов в корнях и побегах растений *Triticum durum*, как в благоприятных для роста растений условиях, так и на фоне засоления, что сопровождалось стимуляцией роста и повышением концентрации хлорофилла.

2. Установлено увеличение отложения лигнина и суберина, а также ускорение образования поясков Каспари в корнях *T. durum* на фоне интродукции бактерий в ризосферу растений пшеницы. Эффект был более выражен в случае *P. mandelii* штамма IB-Ki14.

3. В условиях засоления обработка растений *T. durum* бактериями *P. mandelii* штамма IB-Ki14 снижала накопление натрия в побегах, в то время как бактерии *B. subtilis* штамма IB-22 поддерживали уровень калия в корнях и фосфора – в побегах, что указывает на различия в механизмах регуляции ионного баланса под влиянием бактерий этих двух штаммов.

4. Показано, что интродукция бактериями *B. subtilis* IB-22 стимулировала рост растений дефицитного по АБК мутанта Az34 *Hordeum vulgare* и его родительского сорта Steptoe.

5. Бактериальная обработка *B. subtilis* IB-22 снижала уровень стресс-индуцированного накопления АБК в побегах, и увеличивала содержание этого гормона в корнях растений *H. vulgare*, что предотвращало падение оводненности побега у мутанта при засолении.

6. Повышение уровня АБК в корнях *H. vulgare* при обработке *B. subtilis* IB-22 имело важное адаптивное значение и было связано, как со способностью бактерий синтезировать АБК, так и с влиянием бактерий на метаболизм этого гормона в растениях.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из изданий, рекомендованных ВАК

1. **Ахтямова З.А.**, Архипова Т.Н., Мартыненко Е.В., Нужная Т.В., Иванов Р.С., Кузьмина Л.Ю. Влияние штамма *Bacillus subtilis* на содержание абсцизовой кислоты у дефицитного по этому гормону мутанта ячменя и растений его родительского сорта // Таврический вестник аграрной науки. 2021. Т. 2. № 26. С. 28-40.
2. **Akhtyamova Z.A.**, Arkhipova T.N., Martynenko E.V., Nuzhnaya T.V., Kuzmina L.Yu., Kudoyarova G.R., Veselov D.S. Growth-Promoting Effect of Rhizobacterium (*Bacillus subtilis* IB-22) in Salt-Stressed Barley Depends on Abscisic Acid Accumulation in the Roots // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22(19). P. 10680. (WoS Q1)
3. Martynenko E., Arkhipova T., Safronova V., Seldimirova O., Galin I., **Akhtyamova Z.**, Veselov D., Ivanov R., Kudoyarova G. Effects of Phytohormone-Producing Rhizobacteria on Casparian Band Formation, Ion Homeostasis and Salt Tolerance of Durum Wheat // Biomolecules. 2022. V. 12. № 2. P. 230. (WoS Q2)

Статьи в других журналах и материалах конференций

1. **Ахтямова З.А.** Архипова Т.Н., Мартыненко Е.В. Сравнение реакции растений ячменя на обработку микроорганизмами, продуцирующими ауксины и цитокинины // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 1. С. 66-73.
2. **Ахтямова З.А.** Сравнение реакции растений ячменя на обработку микроорганизмами, продуцирующими ауксины и цитокинины // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC 2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». 2020. С. 11.
3. **Ахтямова З.А.**, Архипова Т.Н., Мартыненко Е.В., Нужная Т.В., Кузьмина Л.Ю. Зависит ли рост стимулирующее действие ризосферных бактерий от способности растений продуцировать АБК в стрессовых и оптимальных условиях? // Клеточная сигнализация: итоги и перспективы: тезисы докладов V Российского симпозиума с международным участием. 2021. С. 8-9.
4. **Ахтямова З.А.**, Архипова Т.Н., Мартыненко Е.В., Нужная Т.Н., Кузьмина Л.Ю., Иванов Р.С. Штамм *Bacillus subtilis* IB-22 повышает уровень АБК у дефицитного по этому гормону мутанта ячменя // Программа и сборник тезисов V Всероссийской школы-конференции с международным участием для молодых ученых «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий». 2021. С. 27.

Список сокращений: АБК – абсцизовая кислота; ИУК – индолилуксусная кислота; ИФА – иммуноферментный анализ; КОЕ – колониеобразующие единицы; ОСВ – относительное содержание воды; ФАР – фотосинтетически активная радиация; ЦК – цитокинины.