

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский
федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)
Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии
Наук
(УИБ УФИЦ РАН)

АХТЯМОВА ЗАРИНА АСХАТОВНА

Научный доклад

**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

Выполнила:
Аспирантка 4 курса очной формы
обучения
Направление подготовки
06.06.01 Биологические науки
Направленность
1.5.21. Физиология и биохимия
растений
Научный руководитель
Веселов Дмитрий Станиславович
д.б.н.,
и.о. директора УИБ УФИЦ РАН

Уфа – 2022

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 их урожайности (Ruzzia, Aroca; 2015; Backer et al., 2018). Не прекращается поиск новых штаммов бактерий. Однако для того, чтобы как поиск таких бактерий, так и их применение было более эффективным, необходимо лучше понимать механизм их действия на растения. Способность бактерий синтезировать фитогормоны считается одним из важных свойств бактерий, от которого зависит ускорение роста растений и повышение их устойчивости к стрессовым условиям под влиянием бактерий (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 влиять на гормональный баланс в самих растениях (Kudoyarova et al., 2019). Вместе с тем, содержание гормонов у обработанных бактериями растений определяли не так часто, 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 пшеницы и ячменя и значения этого эффекта в регуляции роста и развития растений, их водного обмена и солеустойчивости.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние введения в ризосферу растений пшеницы бактерий штаммов *Bacillus subtilis* IB-22 и *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 на содержание гормонов (ауксинов и цитокининов) в отсутствие стрессовых воздействий и на фоне засоления.
2. Сопоставить вызванные бактериями сдвиги в содержании гормонов с их влиянием на рост и концентрацию хлорофилла.
3. 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 на фоне засоления и в его отсутствие.
4. Изучить влияние бактерий на содержание абсцизовой кислоты и распределение этого гормона у растений ячменя на фоне засоления и в его отсутствие.
5. Выявить особенности реагирования на инокуляцию бактериями у дефицитного по АБК мутанта ячменя (Az34) по сравнению с его родительской формой Steptoe.
6. Оценить способность бактерий штамма *Bacillus subtilis* IB-22 продуцировать АБК.

7. Изучить влияние засоления и инокуляции бактериями на экспрессию генов, контролирующих метаболизм АБК, у дефицитного по АБК мутанта ячменя (Az34) и его родительской формой *Steptoe*

Научная новизна исследования. Впервые выявлено влияние бактерий, стимулирующих рост растений, на образование апопластных барьеров у растений пшеницы на фоне засоления. Проведено сравнение этой способности у бактерий, продуцирующих цитокинины или ауксины, и сопоставление этих свойств с влиянием бактерий на поглощение токсичных ионов натрия и элементов минерального питания. 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, что можно объяснить повышением уровня калия и фосфора у растений под влиянием бактерий этого штамма. Впервые проведена сравнительная оценка реакции на инокуляцию бактериями у однодольных растений дефицитного по АБК мутанта ячменя и его родительского сорта. Показано, что на фоне засоления обработка бактериями стимулировала рост, как мутанта, так и растений его исходного генотипа. Инокуляция бактериями снижала уровень стресс-индуцированного накопления абсцизовой кислоты в побегах растений, но повышала её концентрацию в корнях. Показано, что повышение концентрации АБК в корнях растений под влиянием бактерий 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 с предотвращением накопления токсичных ионов 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.

2. Вызванные бактериями изменения в содержании гормонов способствуют активации роста растений пшеницы и ячменя как в нормальных условиях, так и при засолении.

3. Бактерии штамма *B. subtilis* IB-22 снижают уровень стресс индуцированного накопления АБК в побегах растений ячменя, но повышают уровень АБК в корнях, что способствует поддержанию оводненности растений при засолении.

4. У дефицитного по АБК мутанта ячменя, как и у растений исходного сорта, выявлена активация роста под влиянием *B. subtilis* IB-22 в нормальных условиях и при засолении, что является следствием нормализации метаболизма АБК под влиянием бактерий.

5. Ускорение и усиление отложения лигнина и формирования апопластных барьеров под влиянием ризосферных бактерий, ограничивающих неконтролируемые потоки ионов по апопласту, 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.), 5 Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация: итоги и перспективы» (Казань, 2021), 5 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. Доля участия в написании статей – 60%.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечены значительным объёмом экспериментального материала, обработанного с применением современных статистических методов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах, содержит 7 таблиц и 36 рисунков. Включает в себя введение, обзор литературы (глава 1), описание методов исследования (глава 2), результаты исследования и их обсуждение (глава 3), заключение, выводы и список литературы, включающий 341 источник, в т.ч. 322 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.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты проводили на растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Stepoe, его дефицитном по абсцизовой кислоте мутанте Az34, ячмене сорта Прерия и растениях твёрдой яровой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) сорта Башкирская 27.

В качестве субстрата для выращивания растений ячменя использовали песок, почву и вермикулит. Растения пшеницы 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 % от 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 /г субстрата для пшеницы и 10^8 КОЕ /г субстрата для ячменя – 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

мкмоль м⁻² с⁻¹ ФАР и 14 ч фотопериоде. На протяжении эксперимента влажность песка и вермикулита поддерживали на уровне 80% полной влагоемкости, 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.

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 нашей статье (Martynenko et al., 2022). Содержание гормонов измеряли посредством твердофазного иммуоферментного анализа, используя антитела к соответствующим гормонам. Надежность использования иммуоанализа 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). Транспирация 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). 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 пшеницы проводили с помощью эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой ICPE-9000 (Шимадзу, 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 на конфокальном лазерном сканирующем конфокальном 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)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нашей работы было изучено влияние бактерий на содержание в растениях гормонов стимулирующего типа действия: цитокининов (зеатина, его рибозида и нуклеотида) и ауксинов (ИУК).

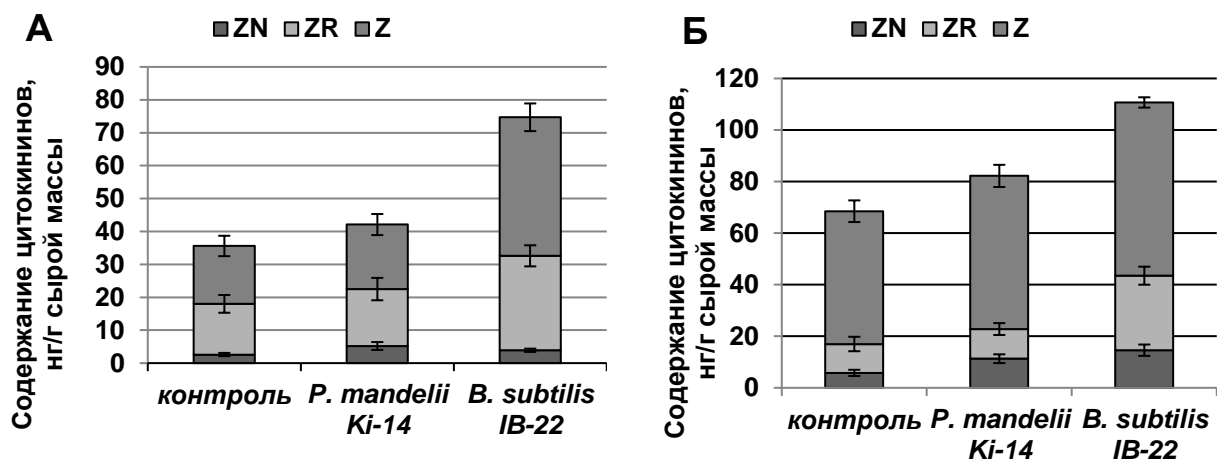


Рис. 1. Содержание цитокининов в корнях (А) и побегах (Б) растений пшеницы на 6 сутки после обработки семян *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22.

Как видно из рис.1, штамм бацилл, способный, как было показано ранее (Arkhipova et al., 2005), продуцировать цитокинины, увеличивал содержание цитокининов как в побегах, так и корнях растений пшеницы. 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).

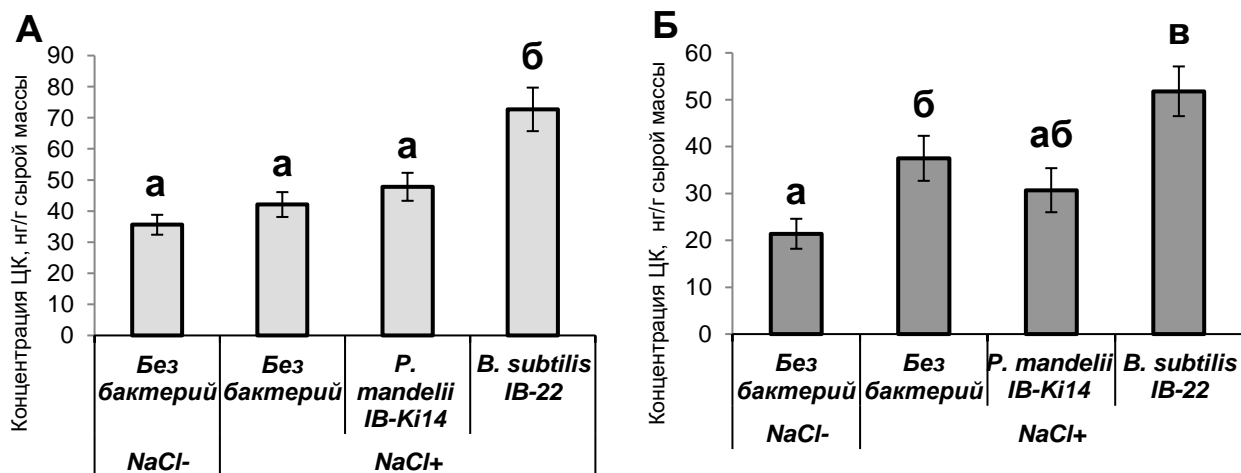


Рис. 2. Влияние 100 мМ NaCl и бактериальной обработки *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 (IB-14) и *Bacillus subtilis* IB-22 (IB-22) на концентрацию цитокининов в корнях (а) и побегах (б) шестидневных растений пшеницы.

Бактерии *P. mandelii* IB-Ki14, напротив, способствовали увеличению содержания ауксинов в побегах и корнях растений (рис. 3), как без засоления

(рис. 4), так и на фоне его (данные приведены в диссертации и статье (Martynenko et al., 2022), что соответствует сведениям о том, что они способны продуцировать ауксины. Бактерии штамма *B. subtilis* IB-22 не оказывали существенного влияния на уровень ауксинов растениях (рис. 3 и 4).

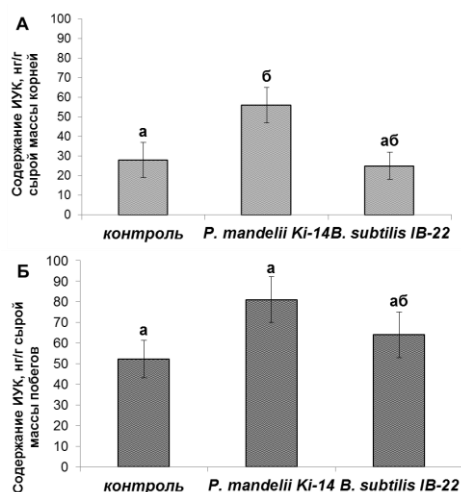


Рис. 3. Содержание ИУК в корнях (а) и побегах (б) растений пшеницы на 6 сутки после обработки семян *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22.

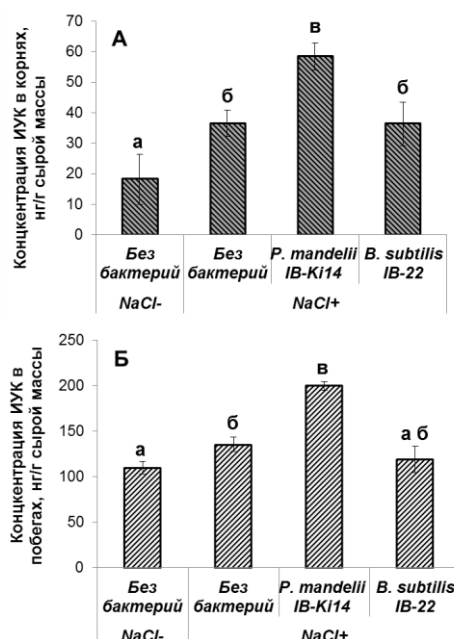


Рис. 4. Влияние засоления (100 мМ NaCl) и бактериальной обработки (*P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22) на концентрацию индол-3-уксусной кислоты в корнях (а) и в побегах (б) шестидневных растений пшеницы.

Повышение концентрации гормонов под влиянием бактерий сопровождалось и, очевидно, было причиной увеличения массы побегов

растений пшеницы, и содержания хлорофилла (табл. 1). Степень проявления стимулирующего действия была выше у штамма 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 пшеницы в контроле и на фоне интродукции в ризосферу бактерий

Вариант обработки	Сырая масса корней, мг	Сырая масса побегов, мг	Концентрация хлорофилла
Контроль	96±11 ^б	305±8 ^а	21±1 ^а
<i>P. mandelii</i> IB-Ki14	85±8 ^{а^б}	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 их влиянием ризосферных бактерий (Bharti et al., 2016).

Таблица 2. Сырая масса корня (n=10) и побега (n=40) растений пшеницы на 12-й день экспериментов по засолению почвы

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

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.

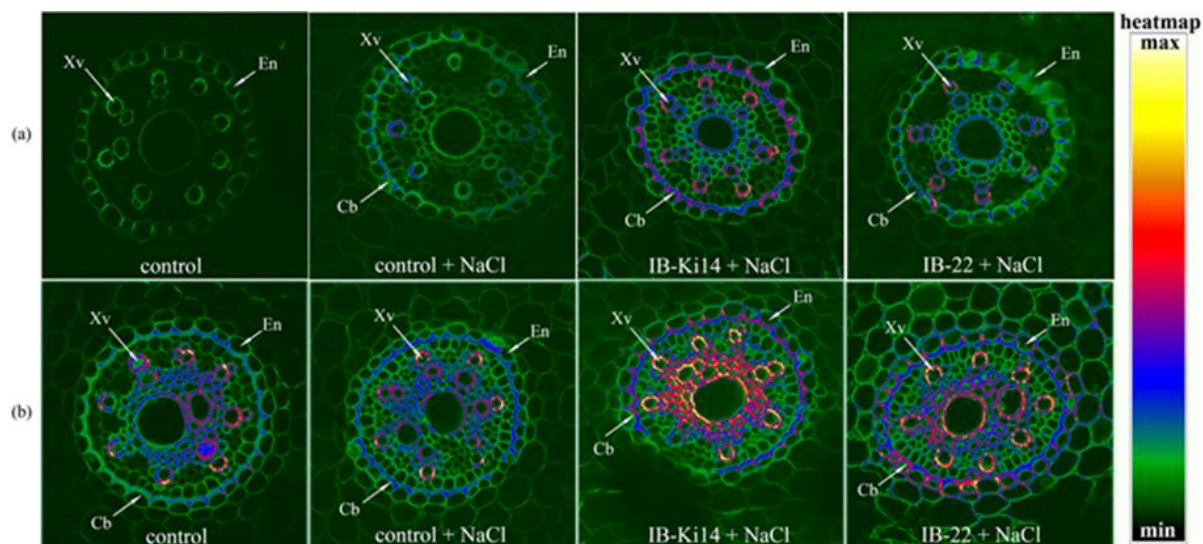


Рис. 5. Локализация лигнина и суберина и обнаружение поясков Каспари в окрашенных берберинем поперечных срезах корней 6-суточных (а) и 11-суточных (б) растений пшеницы, обработанных бактериальными штаммами (*Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 (IB-Ki14) и *Bacillus subtilis* IB-22 (IB-22) в присутствии соли.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

С помощью окрашивания суберина и лигнина берберинем на поперечных срезах базальной части корней мы зарегистрировали усиления 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 способностью синтезировать ауксины, которые, по данным

влиянием засоления и поддерживать нормальный уровень фосфора в побегах (рис. 7).

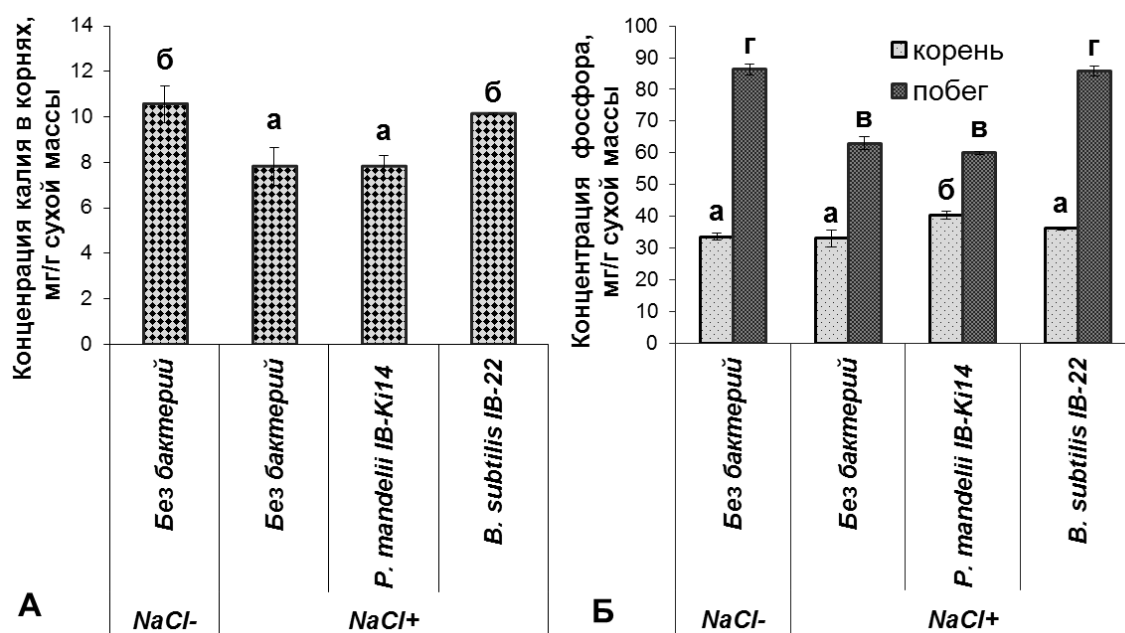


Рис. 7. Влияние 100 мМ NaCl и бактериальной обработки *P. mandelii* IB-Ki14 и *B. subtilis* IB-22 на концентрацию калия (а) и фосфора (б) в побегах и корнях растений пшеницы на 11 сутки.

Представляет интерес тот факт, что растения 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 связана 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.

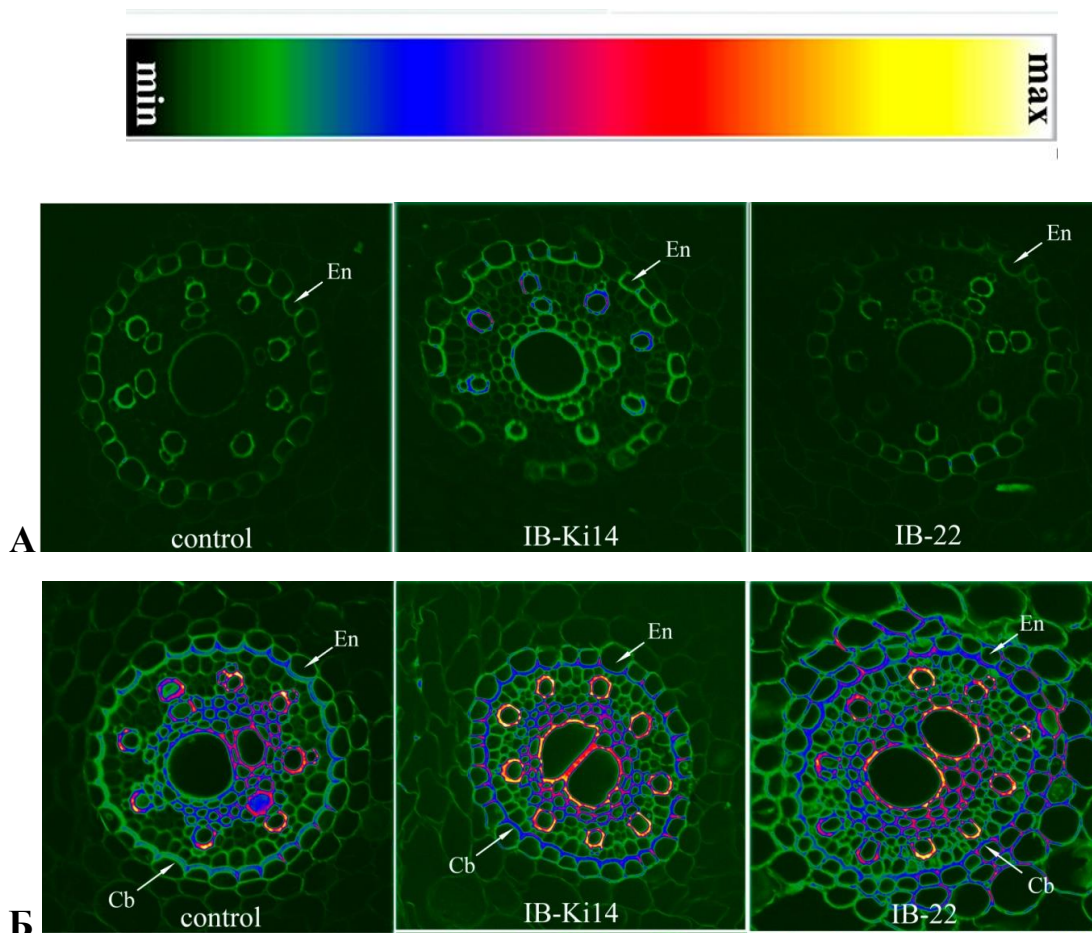


Рис. 8. Выявление лигнина и суберина по флуоресценции берберина на поперечных срезах базальной части корней пшеницы через 6 (а) и 11 (б) дней после обработки семян *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22. Обозначения, как на рис. 5

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).

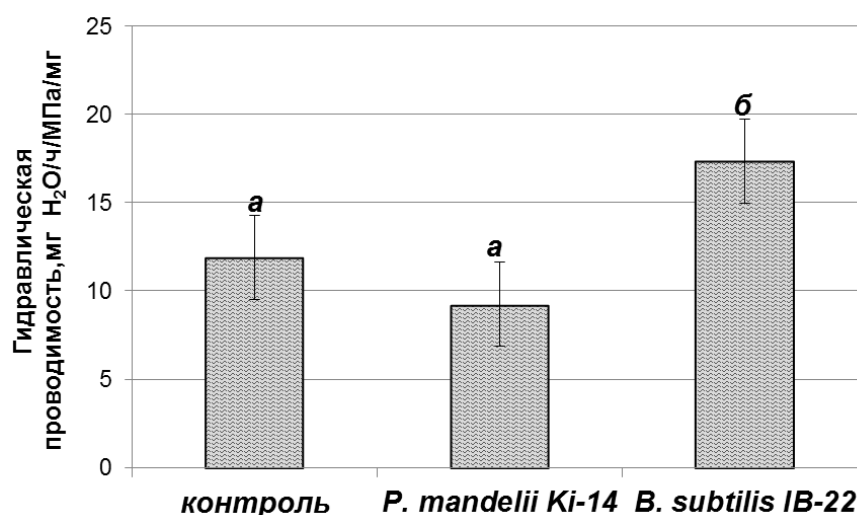


Рис. 9. Гидравлическая проводимость корней растений пшеницы на 13 сутки после обработки семян *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22. Приведены средние (n=6) значения и их ошибки.

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 ячменя под влиянием данного штамма псевдомонад (Arkhipova et al., 2022).

Известно, что АБК способна повышать уровень аквапоринов в корнях растений (например, Sharipova et al., 2016). Представляло интерес проверить, как влияет бактеризация на уровень АБК в растениях. Опыты проводили на растениях ячменя, поскольку в нашем распоряжении был дефицитных 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 эффективны в стимуляции роста растений на фоне засоления. В предварительных опытах были подобраны условия выращивания растений, при которых проявлялось рост стимулирующее действие бактерий (данные приведены в диссертации).

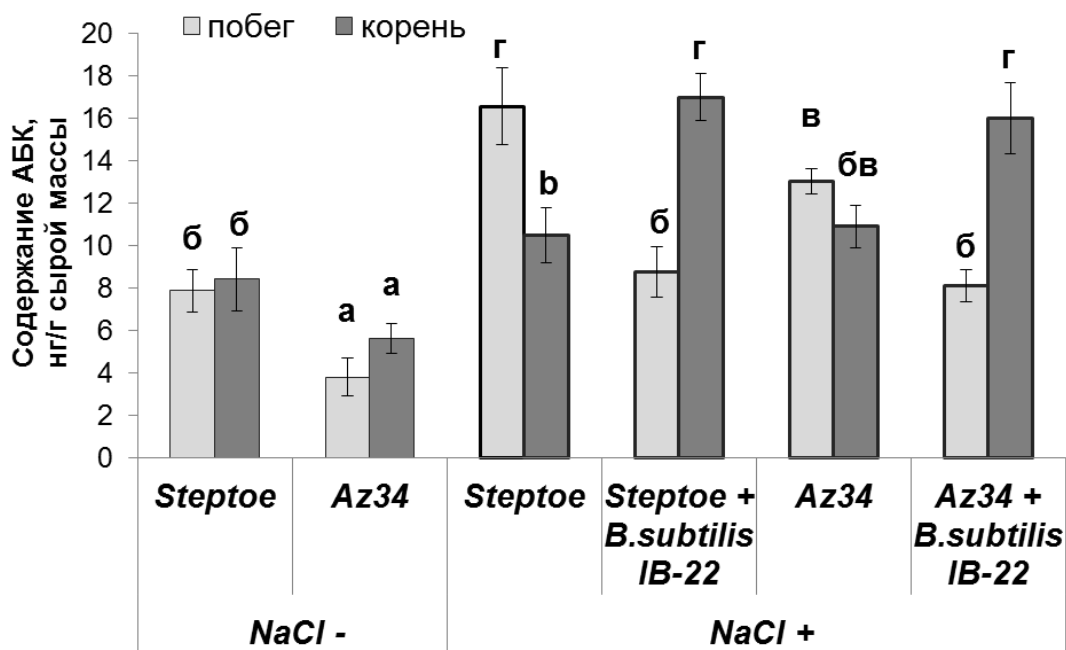


Рис. 10. Влияние *B. subtilis* IB-22 на содержание АБК в побегах и корнях растений ячменя, дефицитных по АБК (Az34) и его родительского сорта (Steptoe).

Определение содержания АБК у растений ячменя 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 Стептое. 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 накопление АБК.

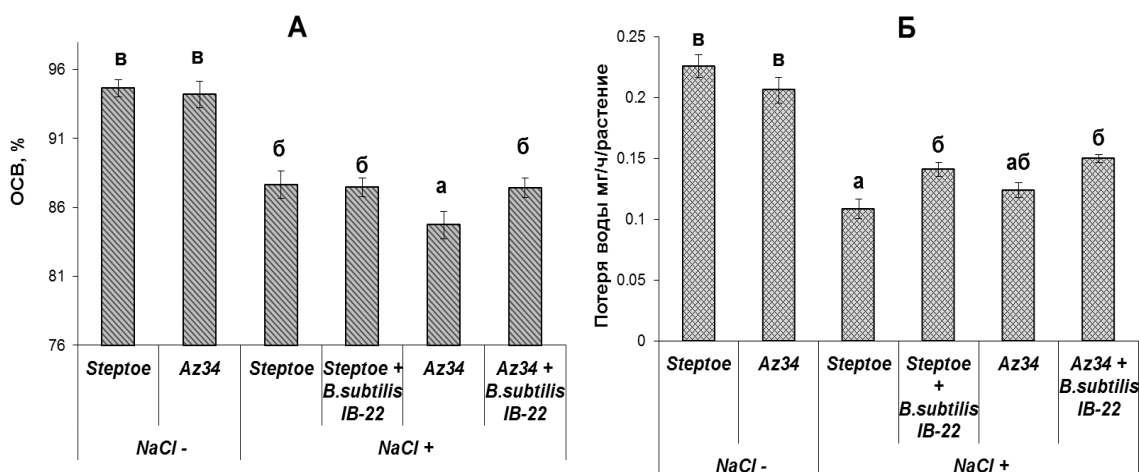


Рис. 11. Влияние *B. subtilis* IB-22 и засоления на относительное содержание воды (а) и транспирационные потери воды (б) у растений ячменя, дефицитных по АБК (Az34) и его родительского сорта (Steptoe).

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.

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 по порядок выше в корнях, чем в побеге и возрастала под влиянием засоления.

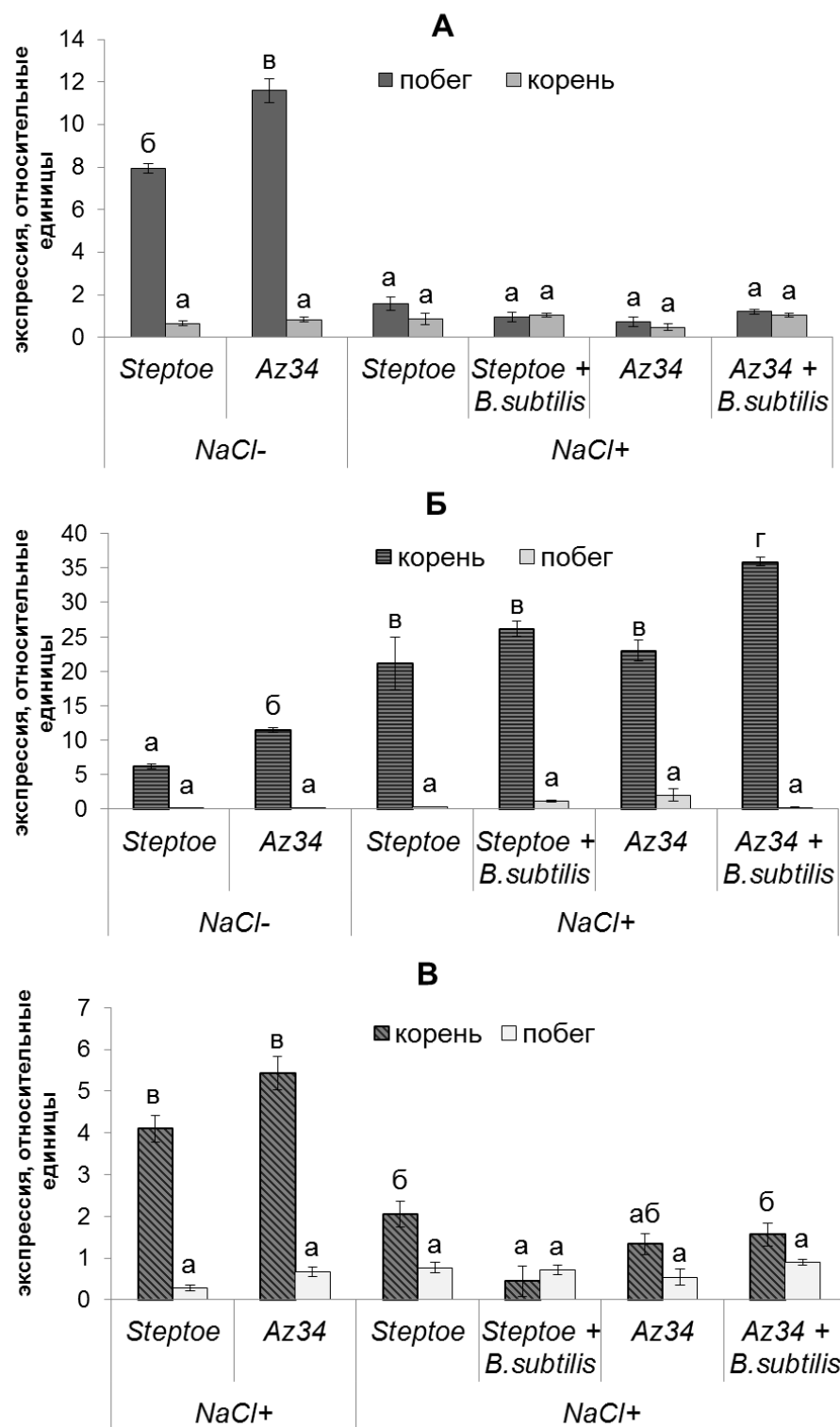


Рис. 12. Влияние бактериальной обработки *B. subtilis* IB-22 на содержание транскриптов генов *HvNCED1* (а), *HvNCED2* (б) и *HvCYP707A1* (в) в побегах и корнях растений дефицитного по АБК мутанта ячменя Az34 и его родительского сорта Стептое. Значения экспрессии генов, ответственных за метаболизм АБК у ячменя, нормированы относительно гена ячменя *HvGADPH*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу.

Очевидно, у растений ячменя данного возраста АБК на фоне засоления синтезировалась, в основном, в корнях. Накопление АБК в корнях растений в результате бактериальной обработки было результатом поглощения АБК, синтезируемого *Bacillus subtilis* IB-22. В культуральной жидкости бактерий этого штамма было обнаружено около 20 нг АБК на мл. Кроме того, повышение уровня этого гормона в результате бактериальной обработки Az34 было очевидно следствием самого высокого уровня транскрипта в этом варианте (рис. 12). Очевидно, он компенсировал пониженную активность молибденового фактора у мутантных растений, необходимого для превращения альдегида АБК в АБК. У растений Степное бактериальная обработка снижала экспрессию 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 ячменя положительно отзывался на обработку штаммом бацилл. Очевидно, это было связано как с особенностями штамма бактерий, так и растений.

Заключение

На примере бактерий *P. mandelii* IB-Ki14 или *B. subtilis* IB-22 показано, что их присутствие в ризосфере пшеницы и ячменя 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 ускоряла образование поясков Каспари и повышала уровень лигнификации корней, а усиленное формирование апопластных барьеров, контролирующих потоки ионов по апопласту, способствовали ионному гомеостазу на фоне засоления. Обработка растений ячменя 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 ячменя 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.

Проделанная нами работа позволяет сделать следующие **выводы**:

1. Как в благоприятных для роста условиях, так и на фоне засоления, выявлено повышение уровня цитокининов в корнях и побегах растений пшеницы, обработанных бактериями штамма *Bacillus subtilis* IB-22, в то время как бактерии штамма *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14, , увеличивали концентрацию ауксинов.

2. Обнаружена связь между повышением концентрации гормонов в растениях под влиянием бактерий и их положительным действием на рост, и концентрацию хлорофилла

3. Установлено, что на фоне интродукции бактерий в ризосферу растений пшеницы, усиливалась лигнификация и ускорялось образование поясков Каспари, более выраженные в случае штамма *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14.

4. Обработка растений бактериями штамма *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14 снижала накопление натрия в побегах на фоне засоления, в то время

как под влиянием бактерий штамма *Bacillus subtilis* IB-22 поддерживался уровень калия в корнях и фосфора – в побегах растений.

5. Выявлено снижение уровня стресс-индуцированного накопления АБК в побегах растений ячменя на фоне засоления в результате обработки бактериями штамма *Bacillus subtilis* IB-22, что является индикатором снижения повреждающего действия неблагоприятного фактора под влиянием бактерий.

6. Обнаружено перераспределение АБК в корни растений под влиянием бактерий на фоне засоления, что способствует нормализации водных отношений.

7. Не выявлено различий в действии бактерий штамма *Bacillus subtilis* IB-22 на растения дефицитного по АБК мутанта ячменя (Az34) по сравнению с его родительской формой Steptoe.

8. Повышение уровня АБК в корнях инокулированных бактериями растений было связано, как со способностью бактерий штамма *Bacillus subtilis* IB-22 синтезировать АБК, так и с влиянием бактерий на уровень генов, контролирующих метаболизм АБК: повышение экспрессии гена *NCED2*, ответственного за синтез АБК и снижение уровня транскриптов гена *CYP707A1*, обеспечивающего катаболизм АБК.

Список публикаций по теме исследования:

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ:

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)

Публикации в других изданиях:

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; NPQ – нефотохимическое тушение; PGPR – plant growth promoting rhizobacteria.