

РОЛЬ АУКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРЕОДОЛЕНИИ СТРЕССА РАСТЕНИЯМИ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОБРАБОТКИ ГЕРБИЦИДОМ ЧИСТАЛАН¹

© 2020 г. М. Д. Тимергалин¹, А. В. Феокистова¹, Т. В. Рамеев¹,
Г. Р. Кудоярова¹, С. П. Четвериков^{1,*}

¹ Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450054 Уфа, просп. Октября, 69, Россия

*E-mail: chelab007@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.02.2020 г.

После доработки 27.03.2020 г.

Принята к публикации 10.07.2020 г.

Приведены результаты эксперимента по изучению влияния ауксинпродуцирующих штаммов бактерий *Pseudomonas* sp. ДА1.2 и *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 на растения пшеницы при обработке гербицидом чисталан. Показано положительное влияние бактериальных обработок на суммарное содержание хлорофилла, относительное содержание воды в листьях и роль бактерий в перераспределении АБК и ИУК в побегах и корнях растений пшеницы в условиях гербицидного стресса.

Ключевые слова: *Pseudomonas* sp., PGP-штаммы, пшеница, гербицидный стресс, ауксин, гербицид чисталан.

DOI: 10.31857/S0002188120110113

ВВЕДЕНИЕ

Важным элементом в современных системах интенсивного ведения сельского хозяйства является применение гербицидов для борьбы с сорной растительностью. Однако это одновременно приводит к загрязнению окружающей среды и вызывает стрессовое воздействие, в том числе и на культурные растения [1, 2]. При совокупности негативных факторов гербицидный стресс может существенно снижать урожайность сельскохозяйственных культур [1, 3]. Селективность действия гербицидов, т.е. их способность подавлять рост одних видов растений и не влиять на другие виды, обеспечивает возможность их применения в растениеводстве. Считается, что 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), один из наиболее известных гербицидов, который был первым открыт и нашел широкое применение, подавляет рост двудольных сорняков и не влияет на рост однодольных растений. Этот принцип лежит в основе применения 2,4-Д в посевах зерновых культур (прежде всего пшеницы). Тем не менее, обоб-

щение результатов многолетних испытаний гербицида 2,4-Д выявило немалое количество случаев отрицательного влияния данного гербицида на рост пшеницы [4]. Использование гербицидов может быть более эффективным при совместном применении с антистрессовыми регуляторами роста [3, 5]. Поиск эффективных регуляторов роста в качестве антистрессовых агентов является одной из актуальных задач.

Благоприятное воздействие на развитие растений оказывают бактерии, стимулирующие рост растений (Plant Growth Promoting Bacteria – PGPB). Их применение улучшает состояние растений на фоне действия гербицидного стресса [6]. Действие таких бактерий связывают в первую очередь с их способностью синтезировать фитогормоны (ауксины, цитокинины и др.) [7].

Цель работы – оценка влияния перспективно-го PGP-штамма бактерий *Pseudomonas* sp. с выявленной ранее устойчивостью к гербицидам и способностью продуцировать ауксины [8] на рост, гормональный ответ растений яровой пшеницы и возможность его использования в качестве потенциального биологического антистрессового агента при гербицидном стрессе.

¹ Исследование выполнено в рамках ГЗ Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1 с использованием оборудования РЦКП УФИЦ РАН “Агидель”.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были растения мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Кинельская Юбилейная. В работе использовали ауксинпродуцирующий штамм бактерий *Pseudomonas* sp. ДА1.2, устойчивый к рабочим концентрациям гербицидов (октапон, флоракс, чисталан и наномет), применяемых для обработки посевов пшеницы [8]. Действие нового штамма сравнивали с *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 (основа коммерческого биопрепарата азолен), который является продуцентом ауксинов и цитокининов [9]. Оба штамма хранятся в коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

В качестве гербицида использовали комплексный препарат избирательного действия (против двудольных) на основе ауксиноподобных действующих веществ 2,4-Д (2-этилгексилловый эфир) и дикамбы (натриевая соль) – чисталан экстра (производитель ООО “АХК-АГРО”, Уфа).

Семена пшеницы, стерилизованные в течение 20 мин раствором перманганата калия, проращивали в течение 3-х сут. Проростки высаживали в сосуды объемом 0.5 л, заполненные почвой с 10%-ным содержанием песка. Растения выращивали на светоплощадке при плотности потока фотонов ФАР 190 мкмоль/м²/с при 14-часовом фотопериоде и температуре 22–26°C. Влажность почвы поддерживали на уровне 60–80% ПВ почвы.

Через 7 сут после посева семян в почву растения обрабатывали распылением 1 мл водного раствора препарата чисталан на сосуд (рабочая концентрация гербицида с учетом норм внесения согласно регламенту применения препарата составила 0.5 мл/л). В баковую смесь гербицида вносили суспензию бактерий, выращенных в жидкой питательной среде Кинг Б, доведенных до титра 10⁸ КОЕ/мл.

На 2-е сут после обработки растений определяли уровень содержания абсцизовой кислоты (АБК) и индолилуксусной кислоты (ИУК) с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого побеги и корни гомогенизировали и экстрагировали 80%-ным этиловым спиртом. Полученный экстракт упаривали до водного остатка, после центрифугирования последнего отбирали аликвоты супернатанта для анализа. Очистку и концентрирование АБК и ИУК проводили по модифицированной схеме с уменьшением объема [10]. Твердофазный ИФА проводили согласно методике, представленной в [11].

На 3-и сут после обработки растений определяли содержание хлорофилла в листьях. Для определения содержания хлорофилла в побегах

навески массой 100 мг измельчали и экстрагировали 96%-ным спиртом в течение 24 ч без доступа света. В экстрактах измеряли оптическую плотность при длинах волн 665 и 649 нм. Содержание хлорофиллов *a* и *b* рассчитывали по формулам:

$$C_a = 13.7 \times D_{665} - 5.76 \times D_{649},$$

$$C_b = 25.8 \times D_{649} - 7.6 \times D_{665},$$

где C_a и C_b – концентрация хлорофиллов *a* и *b* (мг/л), D_{665} , D_{649} – величины экстинкции при соответствующей длине волны с последующим пересчетом на сырую массу образца. Измерения проводили в 3-х биологических и в 3-х аналитических повторностях.

Относительное содержание воды (**ОСВ**) определяли в дифференцированной части листа побега пшеницы (1-й лист), рассчитывая по формуле:

$$\text{ОСВ} = 100\% \times (\text{сырая масса} - \text{сухая масса}) : (\text{тургорная масса} - \text{сухая масса}).$$

Содержание воды (**СВ**) рассчитывали по формуле:

$$\text{СВ} = 100\% \times (\text{сырая масса} - \text{сухая масса}) : \text{сырая масса}.$$

Сырую массу определяли сразу после отделения листа от растения. Дифференцированную часть листа для определения тургорной массы помещали в закрытые стеклянные сосуды с дистиллированной водой при 20°C на 24 ч в условиях тусклого света. Для определения сухой массы образцы из растущей зоны и дифференцированную часть листа высушивали при 85°C в течение 24 ч.

Массу и длину растений определяли через 14 сут после обработки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя считается, что однодольные растения нечувствительны к действию гербицидов, созданных на основе синтетического ауксина 2,4-Д, в случае их применения до наступления стадии кушения отмечено ингибирование роста растений пшеницы [4].

В наших экспериментах обработка чисталаном на стадии выхода 3-го листа приводила к подавлению роста растений пшеницы: длина побега (рис. 1а) и его масса (рис. 1б) были достоверно меньше, чем у контрольной группы растений, не подвергавшихся действию гербицида. Еще одним проявлением отрицательного действия чи-

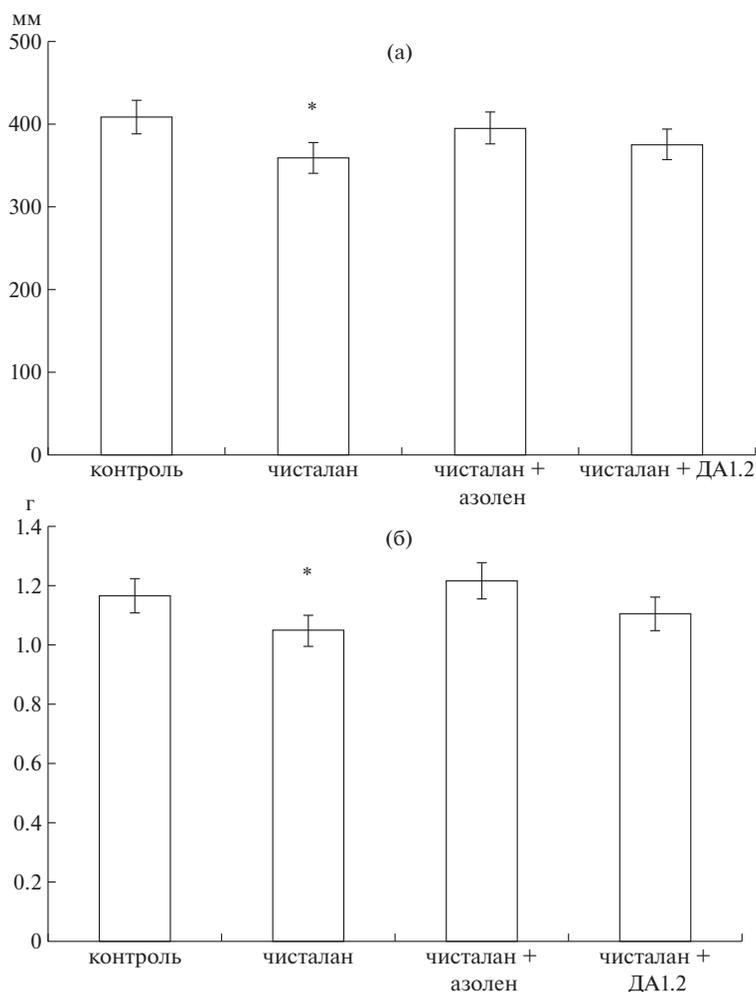


Рис. 1. Длина (а) и масса побега (б) растений пшеницы сорта Кинельская Юбилейная через 14 сут после обработки гербицидом чисталан, гербицидом чисталан с препаратом азолен и с ауксинпродуцирующим штаммом ДА1.2. *Статистически отличающиеся величины, t -тест, $p \leq 0.05$, $n = 9$.

сталана на растения было снижение суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* (табл. 1).

Считается, что действие гербицидов из класса синтетических ауксинов на чувствительные к ним растения обусловлено чрезмерным накоплением ауксинов в растениях и нарушением их распределения между органами, тем самым подавляя рост растения [12]. В наших экспериментах влияние гербицида проявлялось в 3-кратном увеличении содержания ауксинов (рис. 2а). Накопление ауксинов могло быть следствием поглощения растениями экзогенных ауксинов, которые хотя и проявляют слабую иммунореактивность по отношению к антителам ИУК [10], но все же способны реагировать с антителами при высокой концентрации 2,4-Д. Альтернативное объяснение может заключаться в том, что гербицид мог повлиять на концентрацию эндогенных аукси-

нов. Это объяснение соответствует данным литературы о способности 2,4-Д влиять на метаболизм ИУК [13].

Таблица 1. Суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b*, относительное содержание воды (ОСВ) в листьях растений пшеницы сорта Кинельская Юбилейная после обработки гербицидом чисталан, гербицидом чисталан с препаратом азолен и с ауксинпродуцирующим штаммом ДА1.2

Вариант обработки	Суммарное содержание хлорофиллов <i>a</i> и <i>b</i> , мг/г сырой массы	ОСВ, %
Контроль без обработки	95.6 ± 1.8	84.0 ± 0.2
Чисталан	80.6 ± 2.4	81.8 ± 1.1
Чисталан + азолен	86.8 ± 0.1	91.8 ± 1.6
Чисталан + ДА1.2	87.1 ± 1.2	91.7 ± 2.0

Примечание. Указаны ошибки среднего, $n = 9$.

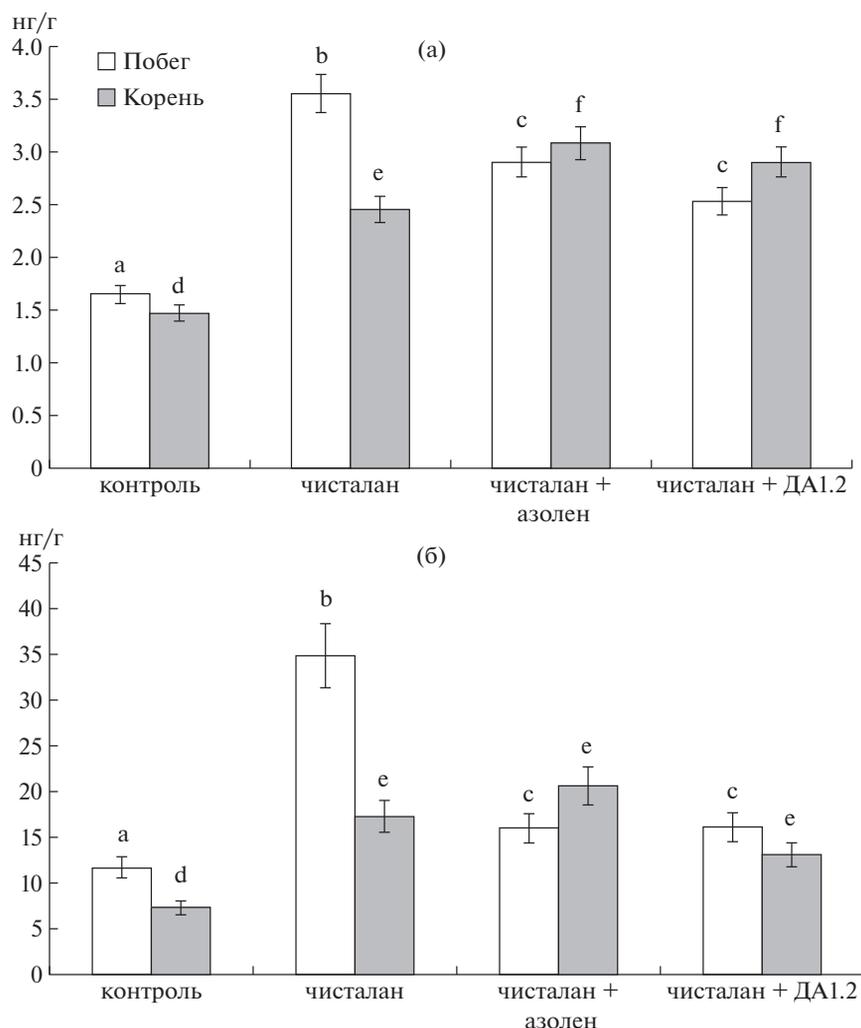


Рис. 2. Содержание ИУК (а) и АБК (б) в побегах и корнях (на г сырой массы) растений пшеницы сорта Кинельская Юбилейная на 2-е сут после обработки гербицидом чисталан, гербицидом чисталан с препаратом азолен и с ауксин-продуцирующим штаммом ДА1.2. Статистически отличающиеся величины отмечены разными буквами, ANOVA, LSD-test, $p \leq 0.05$, $n = 6$.

Обработка растений чисталаном также сопровождалась повышением концентрации АБК относительно контроля более чем в 1.5 раза в побеге и в 2.0 раза – в корне (рис. 2б). Причиной накопления АБК могло быть повышение уровня содержания ауксинов в растениях, поскольку известно, что ауксины способствуют активации синтеза АБК [14]. Существует мнение, что действие 2,4-Д на растения связано именно с его способностью стимулировать накопление АБК [15]. Поскольку АБК способна ингибировать рост растений [16], повышение ее содержания в растениях, обработанных чисталаном, могло быть причиной ингибирования роста растений пшеницы.

Под влиянием гербицида сырая масса побега относительно контроля снижалась, хотя различия были недостоверными. При этом достоверно

возрастала относительно варианта с одним только гербицидом (без бактерий) масса побега при добавлении азолен (на 15%). Масса корня растений в вариантах с гербицидами была на 20% меньше, чем у контрольных растений, при этом внесение бактерий не приводило к достоверному увеличению массы корня.

Добавление к препарату гербицида бактериального препарата азолен стимулировало рост побега, в результате чего растения в этом варианте не отличались от контроля (рис. 1а). Положительное влияние бактерий выразилось в нивелировании негативного влияния гербицида на фотосинтетический аппарат. Это отражалось на количественном содержании пигментов в растениях (табл. 1). В обоих случаях инокуляция бактериями приводила к повышению суммарного со-

держания хлорофилла на фоне гербицидного стресса.

Трехкратное повышение концентрации ауксинов в побеге при обработке только гербицидом (без инокуляции бактерий) нивелировалось влиянием обоих штаммов бактерий таким образом, что уровень ауксинов в побегах превышал показатели необработанного контроля не более чем в 1.5 раза. Уменьшение накопления ауксинов могло быть следствием деструкции 2,4-Д бактериями. Способность бактерий разрушать пестициды известна из литературы [17]. Тем не менее, это предположение нуждается в проверке, принимая во внимание, что гербицид контактировал с бактериями непродолжительное время. Альтернативное объяснение может заключаться в нормализации метаболизма эндогенных ауксинов под влиянием бактериальных препаратов.

Так или иначе, стабилизация количества ауксинов в варианте с бактериями могла благоприятно сказаться на содержании АБК. Показано (рис. 2б), что совместная обработка растений гербицидами и бактериями приводила к уменьшению накопления АБК в побегах по сравнению с растениями, обработанными только гербицидом. Как снижение накопления ауксинов, так и АБК под влиянием бактериальных препаратов могло способствовать уменьшению отрицательного влияния гербицида на рост и содержание хлорофилла.

Важной особенностью действия бактерий оказалась их способность поддерживать высокое относительное содержание воды в растениях (табл. 1). В вариантах с бактериальными обработками обоими штаммами *ОСВ* составило 92%, что значительно превышало величину этого показателя у растений на фоне применения чисталана (82%) и в контроле (84%). Повышение содержания воды в побеге могло быть следствием усиления ее притока из корней. Известно, что гормон АБК увеличивает водный потенциал растений не только за счет изменения устьичной [18], но и гидравлической проводимости [19]. Регуляция гидравлической проводимости под влиянием АБК наиболее ярко проявляется в корнях растений, что соответствует полученным нами данным, свидетельствующим о том, что инокуляция бактерий на фоне применения гербицида способствовала перераспределению АБК в пользу корня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о том, что ауксинпродуцирующий штамм бактерий *Pseudomonas* sp. ДА1.2 наряду с *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 оказывал положитель-

ное влияние на содержание хлорофилла и способствовал поддержанию оводненности тканей листа в условиях гербицидного стресса. При этом, несмотря на то что *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 был более эффективен в плане влияния на показатели роста растений пшеницы, оба штамма при внесении в баковую смесь гербицида чисталан снижали его негативное действие, выраженное в нарушении перераспределения ауксинов и АБК. Таким образом, рассмотренные штаммы бактерий проявляли свойства антистрессантов и могут быть рекомендованы для оптимизации технологии применения гербицидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злотников А.К., Злотников К.М. Борьба с пестицидным стрессом – важный резерв повышения продуктивности пшеницы // Земледелие. 2009. № 4. С. 30–31.
2. Кутузова Р.С., Воробьев Н.И., Круглов Ю.В. Структура микробного комплекса ризосферы пшеницы в условиях гербицидного стресса // Почвоведение. 2006. № 2. С. 220–227.
3. Наумов М.М., Зимица Т.В., Хрюкина Е.И., Рябчинская Т.А. Роль полифункциональных регуляторов роста растений в преодолении гербицидного стресса // Агрехимия. 2019. № 5. С. 21–28.
4. Kumar S., Singh A.K. A review on herbicide 2,4-D damage reports in wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Chem. Pharm. Res. 2010. V. 2. № 6. P. 118–124.
5. Эффективность гербицидов и фунгицидов при совместном применении с антистрессовыми регуляторами роста на зерновых культурах (опыт и рекомендации) / Под ред. Усманова У.Г. Уфа: Гилем, 2003. 80 с.
6. Ahemad M., Khan M.S. Ameliorative effects of *Mesorhizobium* sp. MRC4 on chickpea yield and yield components under different doses of herbicide stress // Pest. Biochem. Physiol. 2010. V. 98. P. 183–190.
7. Кудоярова Г.Р., Курдин И.К., Мелентьев А.И. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // Изв. Уфимского НЦ РАН. 2011. № 3–4. С. 5–16.
8. Четвериков С.П. Отбор антистрессовых бактериальных агентов для защиты сельскохозяйственных растений // Естеств. и техн. науки. 2019. Т. 137. № 11. С. 81–84.
9. 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.
10. Veselov S.U., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Guili-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // Physiol. Plantarum. 1992. V. 86. P. 93–96.

11. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Yu., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Yu. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants // *Acta Physiol. Plantarum*. 2017. V. 39. P. 253.
12. Grossmann K. Auxin herbicide action: lifting the veil step by step // *Plant Signal Behav.* 2007. V. 2. № 5. P. 421–423.
13. Sung Z.R. Relationship of indole-3-acetic acid and tryptophan concentrations in normal and 5-methyltryptophan-resistant cell lines of wild carrots // *Planta*. 1979. V. 145. № 4. P. 339–345.
14. Shuai H., Meng Y., Luo X. Exogenous auxin represses soybean seed germination through decreasing the gibberellin/abscisic acid (GA/ABA) ratio // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 12620.
15. Christoffoleti P.J., Figueiredo M.R.A., Peres L.E.P., Nissen S., Gaines T. Auxinic herbicides, mechanisms of action, and weed resistance: A look into recent plant science advances // *Sci. Agricola*. 2015. V. 72. № 4. P. 356–362.
16. Lorrain R., Boccaccini A., Ruta V., Possenti M., Costantino P., Vittorioso P. Abscisic acid inhibits hypocotyl elongation acting on gibberellins, DELLA proteins and auxin // *AOB PLANTS*. 2018. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply061>
17. Han L., Zhao D., Li C. Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71 // *Brazil. J. Microbiol.* 2015. V. 46. № 2. P. 433–441.
18. 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.
19. 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.

Role of Auxin-Producing Bacteria in Overcoming the Stress of Wheat Plants under Treatment with the Herbicide Chistalan

M. D. Timergalin^{a, #}, A. V. Feoktistova^a, T. V. Rameev^a,
G. R. Kudoyarova^a, and S. P. Chetverikov^a

^a Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of RAS
prosp. Oktyabrya 69, Ufa 450054, Russia

[#]E-mail: chelab007@yandex.ru

The results of an experiment to study the effect of auxin-producing strains of *Pseudomonas* sp. DA1.2 bacteria and *Pseudomonas koreensis* IB-4 on wheat plants when treated with the herbicide Chistalan, are presented. The positive effect of bacterial treatments on the total chlorophyll content, the relative water content in the leaves, and the role of bacteria in the redistribution of ABA and IAA in the shoots and roots of wheat plants under herbicidal stress are shown.

Key words: PGPB, wheat plants, herbicidal stress, auxins, herbicide Chistalan.