

УДК 579.841.11.017.617

## ВЛИЯНИЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ ИНДОЛ-3-УКСУСНУЮ КИСЛОТУ БАКТЕРИЙ *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* 66 И *PSEUDOMONAS PUTIDA* NBR9 НА ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

<sup>1</sup>Мацкова Ю.А., <sup>2</sup>Олюнина Л.Н., <sup>2</sup>Сухов В.С., <sup>2</sup>Неруш В.Н.,  
<sup>2</sup>Синицына Ю.В., <sup>2</sup>Веселов А.П.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, e-mail: yuliya.matskova@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»,  
Нижний Новгород, e-mail: kfr@bio.unn.ru

Проведено электрофизиологическое исследование влияния симбиотических ризосферных бактерий, экскретирующих либо утилизирующих индол-3-уксусную кислоту (ИУК), на устойчивость растений-хозяев к прогреванию. Показано, что колонизация корней бактериями *Azotobacter chroococcum* 66 (штамм-гиперпродуцент ИУК) повышала термостойкость проростков пшеницы. Защитный эффект *Pseudomonas putida* NBr9 (штамм, утилизирующий ИУК) оказался более выраженным, чем эффект азотобактера. Это проявлялось более значительным влиянием *P. putida* NBr9 на амплитуду первичной деполяризации плазматической мембраны клеток побега проростков после нагревания и достоверным увеличением скорости первичной деполяризации, а также преобладанием в группе доли устойчивых растений. Выявленный эффект, возможно, обусловлен разнонаправленным влиянием азотобактера и псевдомонад на гормональный баланс растений-хозяев.

**Ключевые слова:** термостойкость, инокуляция, пшеница, ризосферные бактерии

## THE INFLUENCE OF INDOLE-3-ACETIC ACID PRODUCING BACTERIA *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* 66 AND *PSEUDOMONAS PUTIDA* NBR9 ON THERMOTOLERANCE OF WHEAT SEEDLING (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

<sup>1</sup>Matskova Y.A., <sup>2</sup>Olyunina L.N., <sup>2</sup>Sukhov V.S., <sup>2</sup>Nerush V.N., <sup>2</sup>Sinitsyna Y.V., <sup>2</sup>Veselov A.P.

<sup>1</sup>State Educational Establishment of Higher Professional Training Nizhny Novgorod State Medical  
Academy of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhni Novgorod,  
e-mail: yuliya.matskova@yandex.ru;

<sup>2</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, e-mail: kfr@bio.unn.ru

Rizospheric bacteria can participate both in root system growth and whole plant development due to concentration of indol-3-acetic acid (IAA) changing ability. Involvement of two kinds of bacteria – excreting and/or consuming IAA – in plant stresses resistance formation by modifying their hormonal balance is assumed. The resistance of inoculated and non-inoculated wheat seedlings (*Triticum aestivum* L. «Moscow-35») to heat shock was investigated with the electrophysiological method. Non-inoculated seedlings served as control. Thermostability testing (heating at 42°C, 15 min) of 7-day-old wheat seedlings was based on comparison of amplitude and pulsed bioelectric reactions velocity ratios before and after stress influence. It has been shown that *Azotobacter chroococcum* 66 (excrete IAA) or *Pseudomonas putida* NBr9 (excrete and consume IAA) root colonization increased the resistance of wheat seedlings to hyperthermia. Protective effect of *Pseudomonas putida* NBr9 was more expressed: the quantity of hyperthermia-resistant plants was 5 times bigger than in control variant.

**Keywords:** thermotolerance, inoculation, wheat, rhizospheric bacteria

Общепризнанно, что многие симбиотические бактерии, в частности представители родов *Azotobacter* и *Pseudomonas*, способны регулировать рост растений-хозяев посредством экскреции ряда биологически активных веществ, прежде всего индол-3-уксусной кислоты (ИУК), а также фиксации атмосферного азота [5, 9]. Создание высокоэффективных биопрепаратов с использованием живых культур ассоциативных микроорганизмов является одним из приоритетных на сегодняшний день направле-

ний в рамках концепции экологизации сельского хозяйства. Однако следует помнить, что в естественных местообитаниях оптимальные условия существования, легко воспроизводимые в лаборатории, являются скорее исключением, чем правилом, как для микроорганизмов, так и для растений, не способных, подобно животным, уйти (в прямом смысле этого слова) от действия неблагоприятного фактора. Следовательно, эффективность биопрепаратов, разработанных без учета особенностей устойчивости

микроорганизмов, может оказаться невысокой. В связи с вышесказанным при разработке бактериальных удобрений направленного действия, на наш взгляд, целесообразно экспериментальное моделирование условий среды, являющихся стрессовыми и для бактерий, и для их растений-хозяев (например, действие высокой температуры).

В формировании мутуалистических взаимоотношений ризобактерий и растений наиболее важным соединением-посредником служит ИУК, к экскреции и/или утилизации которой способны многие ризосферные микроорганизмы [8, 9]. Вполне справедливо «бактериальную» ИУК рассматривать в качестве аллелохимиката, полезного и для организмов-продуцентов (бактерий) – алломона, и для организмов-реципиентов (растений-хозяев) – кайромона.

По мнению большинства исследователей, изменяя концентрацию ИУК в прикорневой зоне и соответственно в клетках корней, ризосферные микроорганизмы тем самым «вмешиваются» не только в развитие корневой системы, но и растения в целом [9]. В том числе можно предполагать участие бактерий, экскретирующих и/или потребляющих ИУК, в формировании устойчивости растений к меняющимся условиям внешней среды за счет модификации их гормонального баланса и, следовательно, исходного физиологического состояния. При этом нельзя исключить, что изменения устойчивости растений, спровоцированные присутствием бактерий, разнонаправленно влияющих на гормональный баланс своих хозяев, также могут оказаться неравнозначными.

Настоящая работа посвящена выявлению особенностей влияния на термостойкость проростков пшеницы штамма-гиперпродуцента ИУК – *Azotobacter chroococcum* 66 и микроорганизма, способного использовать ИУК в качестве универсального ростового субстрата – *Pseudomonas putida* NBr9.

### Материал и методы исследования

Объектами исследований служили проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Московская-35», а также бактерии *Azotobacter chroococcum* 66 (штамм из коллекции Музея микробиологии МГУ, Москва) и *Pseudomonas putida* NBr9 (штамм из коллекции Института физиологии и биохимии микроорганизмов РАН, Пушкино). *A. chroococcum* 66 обладает высокой ИУК-экскретирующей активностью; *P. putida* – наряду с продуцированием способен использовать ИУК как источник углеродного и азотного питания [1].

Семена пшеницы обрабатывали 0,1% раствором  $KMnO_4$  и после промывания, экспонирования в стерильной водопроводной воде (4 ч) проводили инокуляцию бактериями *A. chroococcum* 66 либо *P. putida* NBr9 (опытный вариант). Контролем служили семе-

на, которые оставались стерильными. Бактерии для инокуляции выращивали в течение 24 ч на соответствующих питательных средах: *A. chroococcum* 66 на твердой селективной среде Эшби; *P. putida* NBr9 на жидкой среде М-9. Концентрация микроорганизмов в инокуляте составляла  $10^9$  мл<sup>-1</sup>.

Колонизированные бактериями и контрольные семена проращивали в стерильных влажных чашках Петри при 26°C. На вторые сутки после оценки всхожести проростки переносили в сосуды, содержащие 25 мл стерильной водопроводной воды и покрытые крышками из фольги (15 проростков на сосуд). Проростки культивировали в климатикамерах при 26°C и 14-часовом фотопериоде. На 3-и, 7-е сутки проводили контроль эффективности бактериальной колонизации поверхности корней и околокорневого раствора.

Тестирование термостойкости (прогрев при 42°C, 15 мин) 7-суточных проростков пшеницы проводили по методике, разработанной сотрудниками кафедры биофизики ННГУ им. Н.И. Лобачевского для диагностики воздействия на растения химических веществ [4]. Метод основан на сравнении отношений амплитуд и скоростей импульсных биоэлектрических реакций.

Побеги контрольных и опытных проростков закрепляли в кюветах так, чтобы корни сохраняли контакт с околокорневым раствором. После фиксации растения выдерживали на свету в течение времени, существенно превышающего рефрактерный период. Первое тестирующее охлаждение (до гипертермического воздействия) осуществляли быстрым внесением в кювету ледяной воды, при этом измерительный электрод (ЭВЛ-1М3) контактировал с поверхностью охлаждаемого участка побега, а электрод сравнения – с околокорневым раствором. Прогрев зафиксированных в кюветах проростков осуществляли в термостате через 45 мин после первого тест-воздействия. Повторное тестирующее воздействие проводили через 30 мин после окончания действия стрессора (нагревание).

Результаты представлены в виде отношений:  $A_2/A_1$ , где  $A_1$  – амплитуда первой деполяризации (до гипертермического воздействия),  $A_2$  – амплитуда второй деполяризации (после прогрева);  $V_2/V_1$ , где  $V_1$  – скорость первой деполяризации (до гипертермии),  $V_2$  – скорость второй деполяризации (после нагрева). Если эти отношения больше 1,0 (или 100%), то можно говорить о повышенной устойчивости объекта к действию стрессора, если же отношения менее 1,0 (или 100%), то это свидетельствует об угнетении жизнедеятельности растения. Биологическая повторяемость опытов 15-кратная. Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартного программного пакета «STATISTICA 6.0».

### Результаты исследования и их обсуждение

В настоящее время есть вполне достаточные основания полагать, что роль электрогенеза в формировании адаптационного синдрома клеток высших растений при неблагоприятных воздействиях окружающей среды может быть весьма значительной [2]. Неслучайно, что биоэлектрическая активность используется как довольно удобный диагностический показатель функционального состояния растений [6, 4].

В наших исследованиях удалось показать, что тест-воздействие (охлаждение), наносимое на участок побега проростков экспериментальных вариантов (рис. 1) до гипертермического прогрева и через 30 мин после действия стрессора, вызывало различную по амплитуде и скорости первичную деполяризацию плазмалеммы (ПМ) клеток в зоне охлаждения. Амплитуда ( $A$ , мВ) и скорость ( $V$ , с) деполяризации ПМ клеток побега до стресс-воздействия (нагревания) у проростков пшеницы контрольной группы выше, чем у проростков, корни которых контаминированы бактериями *A. chroococcum* 66 или *P. Putida* NBr9. Возможно, данный эффект обусловлен снижением исходного уровня мембранного потенциала, а следовательно, энергизованности ПМ клеток растений при взаимодействии их с ризосферной микрофлорой. Высказанное предположение выглядит небезоснова-

тельным на фоне данных Т. Ersek et al. [7], Y. Bashan, H. Levanony [7], убедительно свидетельствующих о влиянии ризобактерий на мембранный потенциал клеток корней растений-хозяев.

Данные, полученные при сравнении амплитуд и скоростей первичной деполяризации ПМ клеток побега в зоне тест-воздействия до ( $A_1$ ,  $V_1$ ) и после нагревания ( $A_2$ ,  $V_2$ ) у инокулированных и неинокулированных растений, свидетельствуют об инициированном бактериями повышении устойчивости проростков пшеницы. Так, отношение  $A_2/A_1$  достоверно превышало 1,0 у проростков, зараженных *A. chroococcum* 66 или *P. putida* NBr9, особенно в варианте с псевдомонадами (рис. 2). У растений, контактирующих с *P. putida* NBr9, также достоверно возросло отношение  $V_2/V_1$ .

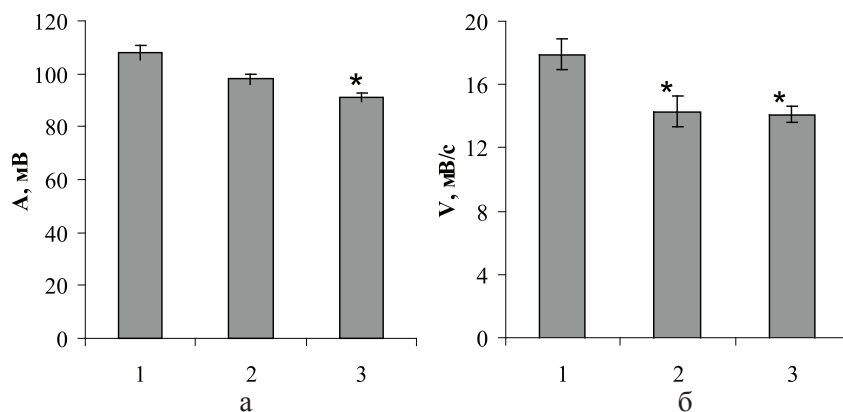


Рис. 1. Амплитуда (а) и скорость (б) деполяризации проростков пшеницы до нагревания:  
\* – различия статистически достоверны по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ );  
1 – без инокуляции; 2 – инокуляция *A. chroococcum* 66; 3 – *P. putida* NBr9

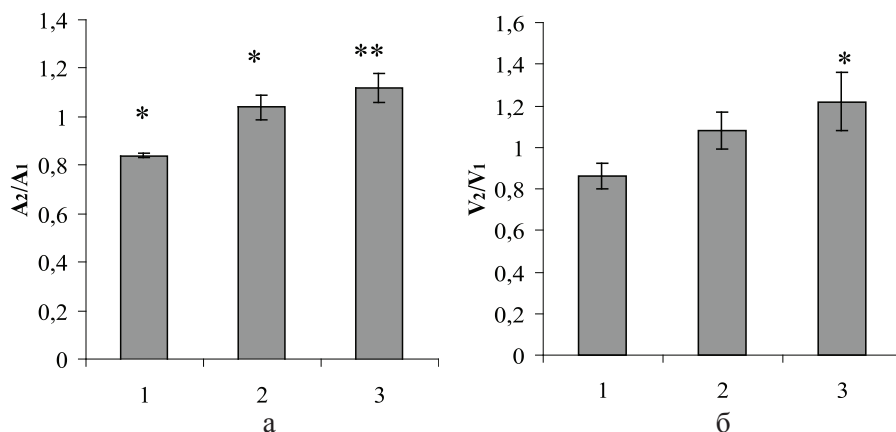


Рис. 2. Отношение амплитуды (а) и скорости (б) деполяризации проростков пшеницы после нагрева ( $A_2$ ,  $V_2$ ) к исходным значениям ( $A_1$ ,  $V_1$ ); различия статистически достоверно отличались от 1,0:  
\* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ;  
1 – без инокуляции; 2 – инокуляция *A. chroococcum* 66; 3 – *P. putida* NBr9

Таким образом, как показали результаты электрофизиологических исследований, инокуляция *A. chroococcum* б6 и *P. putida* NBr9 увеличила термоустойчивость проростков пшеницы. Неинокулированные проростки проявляли пониженную устойчивость к нагреванию –  $A_2/A_1$  было менее 1,0, а отношение  $V_2/V_1$  имело тенденцию к снижению.

Однако в каждом экспериментальном варианте можно было выделить растения, у которых отношения  $A_2/A_1$  и  $V_2/V_1$  превышали 1,0 и были менее 1,0, т.е. растения с повышенной устойчивостью к нагреванию при 42 °С (15 мин) и не устойчивые к этой дозе воздействия соответственно. Тем не менее, вычислив долю растений, у которых оба отношения превышали 1,0 (N), можно говорить о том, что среди инокулированных проростков доминировали высокоустойчивые индивиды, тогда как доля устойчивых растений в контрольной группе довольно мала (рис. 3). Кроме того, количество устойчивых растений несколько преобладало в варианте с *P. putida* NBr9 по сравнению с группой проростков, инокулированных *A. chroococcum* б6.

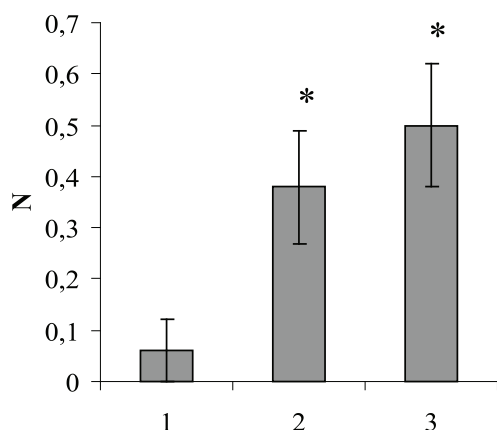


Рис. 3. Доля проростков пшеницы, у которых  $A_2/A_1$  и  $V_2/V_1$  превышали 1,0; \* – различия статистически достоверны по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ); 1 – без инокуляции; 2 – инокуляция *A. chroococcum* б6; 3 – *P. putida* NBr9

### Заключение

Полученные данные позволяют говорить о повышении устойчивости проростков пшеницы к нагреванию при сосуществовании с бактериями *A. chroococcum* б6 и *P. putida* NBr9. Защитный эффект *P. putida* NBr9 при данных условиях эксперимента оказался более выраженным, чем эффект *A. chroococcum* б6. Это проявлялось более

значительным влиянием *P. putida* NBr9 на амплитуду первичной деполяризации плазматической мембраны клеток побега проростков после нагревания, достоверным увеличением скорости этой первичной биоэлектрической реакции, а также преобладанием в группе доли устойчивых растений. Одна из вероятных причин неодинаковой устойчивости проростков пшеницы в присутствии *P. putida* NBr9 или *A. chroococcum* б6 может заключаться в разнонаправленном влиянии исследованных микроорганизмов на гормональный баланс растений-хозяев. Это предположение открывает перспективы для дальнейшего углубленного исследования механизмов вмешательства бактерий в работу гормональной сигнальной системы эукариотических организмов.

*Исследования термоустойчивости проростков пшеницы поддержаны проектом № 2575 Задания № 2014/134 на выполнение государственных работ в сфере деятельности в рамках базовой части государственного задания.*

### Список литературы

- Олонина Л.Н., Орлова А.Г., Мацкова Ю.А. Участие индол-3-уксусной кислоты в реакции про- и эукариот на тепловой шок // Сигнальные системы клеток растений, роль в адаптации и иммунитете: тезисы докл. Второго междуна-родн. симп. – Казань, 2006. – С. 99–100.
- Пятыгин С.С. Особенности сигнальной роли потенциала действия у высших растений // Успехи современ. биол. – 2007. – Т. 127, № 3. – С. 293–298.
- Ретивин В.Г., Оприлов В.А., Федулina С.Б. Преадаптация тканей стебля *Cucurbita pepo* к повреждающему действию низких температур, индуцированная потенциалом действия // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 499–510.
- Ретивин В.Г., Пятыгин С.С., Швец И.М., Оприлов В.А., Макин Г.И., Ганичева С.В., Нестеров Г.Н. Способ диагностики воздействия на растения химических веществ // Авт. свид. 1563631 СССР. 1990. Бюл. № 18.
- Цавкелова Е.А. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение / Е.А. Цавкелова, С.Ю. Климова, Т.А. Чердынцева, А.И. Нетрусов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.
- Érsek T., Novacky A., Pueppke S.G. Compatible and incompatible rhizobia alter membrane potentials of soybean root cells / T. Érsek, A. Novacky, S.G. Pueppke // Plant Physiol. – 1986. – Vol. 82, № 4. – P. 1115–1118.
- Bashan Y., Levany H. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense* / Y. Bashan, H. Levany // Plant and soil. – 1991. – V. 137, № 1. – P. 99–103.
- Leveau J.H.J., Lindow S.E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290 / J.H.J. Leveau, S.E. Lindow // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 5. – P. 2365–2371.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 31, № 4. – P. 425–448.

**References**

1. Olyunina L.N., Orlova A.G., Matskova Yu.A. *Signalnye sistemy kletok rasteniy, rol v adaptatsii i immunitete: tezisy dokladov 2 Mezhdunarodnogo Simpoziuma* (2<sup>nd</sup> Int. Symp. Plant cell Signalling) – Kazan, 2006, pp. 99–100.
2. Pyatygin S.S. *Uspekhi sovrem. biol.*, 2007, no. 3, pp. 293–298.
3. Retivin V.G., Opritov V.A., Fedulina S.B. *Physiol. rast.*, 1997, no 3, pp. 499–510.
4. Retivin V.G., Pyatygin S.S., Shvets I.M., Opritov V.A., Makin G.I., Ganicheva S.V., Nesterov G.N. *Avt. svid. 1563631 SSSR*. 1990. Byul. no 18.
5. Zavkelova E.A., Klimova S.Yu., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. *Pril. biochim. i microbiol.*, 2006. Vol. 42, no 2, pp. 133–143.
6. Érsek T., Novacky A., Pueppke S.G. Compatible and incompatible rhizobia alter membrane potentials of soybean root cells / T. Érsek, A. Novacky, S.G. Pueppke // *Plant Physiol.* 1986. Vol. 82, no. 4, pp. 1115–1118.
7. Bashan Y., Levanony H. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense* / Y. Bashan, H. Levanony // *Plant and soil*. 1991. Vol. 137, no. 1. pp. 99–103.
8. Leveau J.H.J., Lindow S.E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290 / J.H.J. Leveau, S.E. Lindow // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 71, no. 5. pp. 2365–2371.
9. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. Vol. 31, no. 4. pp. 425–448.

**Рецензенты:**

Постнов И.Е., д.б.н., профессор кафедры «Водные ресурсы и аквакультура», ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная академия», г. Нижний Новгород;

Смирнов В.Ф., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории НИИ Химии, ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород.