

Растениеводство

УДК 631.87

DOI: <https://doi.org/10.31857/S2500-2627201963-6>СОРТОВАЯ ОТЗЫВЧИВОСТЬ *Triticum aestivum* L.
НА ИНОКУЛЯЦИЮ КЛЕТКАМИ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *Bacillus subtilis**З.М. Курамшина¹, Р.М. Хайруллин², доктора биологических наук,
Ю.В. Смирнова¹, кандидат биологических наук¹Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета,
453100, Стерлитамак, проспект Ленина, 49
E-mail: kuramshina_zilya@mail.ru²Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
450054, Уфа, проспект Октября, 71

Исследована отзывчивость пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Омская 35, Казахстанская 10 (яровая), Волжская качественная (озимая) на обработку семян клетками эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ. В эксперименте в чашках Петри характер ответа растений на инокуляцию эндофитами зависел от штамма микроорганизма, концентрации клеток в препарате и сорта пшеницы. Наиболее сильный ростстимулирующий эффект оба штамма проявили при обработке семян с использованием суспензий бактерий в концентрации 106 кл./мл. Обработка семян клетками эндофитов в концентрации 109 кл./мл была практически не эффективна в стимуляции роста. Наиболее отзывчивыми на инокуляцию эндофитами оказались растения сорта Омская 35. Сорт был отзывчив в широком диапазоне концентраций клеток в бактериальном препарате. Наименьшая стимуляция роста проростков отмечена у сорта Волжская качественная. В отличие от экспериментов в чашках Петри растения этого сорта хорошо отзывались при выращивании в почве. Вместе с тем в этих условиях они были менее отзывчивы, чем при проращивании в чашках Петри. Разница между размерами побегов обработанных и контрольных проростков сорта Казахстанская 10 отсутствовала, выявлена только стимуляция роста корней. Сделан вывод о том, что существует выраженная сортовая отзывчивость пшеницы на действие эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д – основы биофунгицида Фитоспорин-М, что необходимо учитывать при использовании этого биопрепарата для возделывания пшеницы.

THE RESPONSIVENESS OF *Triticum aestivum* L. VARIETY FOR INOCULATION
BY CELLS OF ENDOPHYTIC STRAINS *Bacillus subtilis*Kuramshina Z.M.¹, Khairullin R.M.², Smirnova Yu.V.¹¹Sterlitamak branch of Bashkir state University,
453100, Sterlitamak, prisppekt Lenina, 49
E-mail: kuramshina_zilya@mail.ru²Institute of biochemistry and genetics of the Ufa Federal research center RAS,
²450054, Ufa, prospect Oktyabrya, 71

In this study, we tested the effect of two strains of bacteria *B. subtilis* 26D and 11BM on three varieties of wheat *Triticum aestivum* L.: Omskaya 35, Kazakhstanskaya 10 (spring), Volzhskaya qualitative (winter). The peculiarity of the plants response to endophytic inoculation depended on the strain of the microorganism, the concentration of cells in the preparation, and the variety of wheat during the experiment in Petri dishes. Both strains showed a strong growth-stimulating effect when seed was inoculated with suspensions of bacteria with a concentration of 106 cells/ml. There was no effect when seed cells were inoculated with bacteria at a concentration of 109 cells/ml. Plants varieties Omskaya 35 were most responsive to inoculation with endophytes. The variety was well responsive to the inoculation of bacteria cells at different concentrations. The variety Volzhskaya quality had the least growth stimulation. Plants of this variety responded well when grown in soil, unlike experiments in Petri dishes. The variety Kazakhstanskaya 10 was less responsive when growing plants in Petri dishes. There was no difference between the size of the shoots of inoculated and non-inoculated plants of the variety Kazakh 10, only stimulation of root growth was observed. It was concluded that there is a pronounced responsiveness of wheat varieties to the effect of endophytic strains of bacteria *B. subtilis* 26D – the basis of biofungicide (Fitosporin-M) and this must be considered when using biofungicide for wheat cultivation.

Ключевые слова: пшеница, эндофитные штаммы *B. subtilis*, рост, сортовая отзывчивость

Key words: wheat, endophytic strains of *B. subtilis*, growth, responsiveness of varieties

Эндофитные штаммы *B. subtilis* выделяют из разных видов растений и их можно применять как PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) для стимуляции роста, защиты от патогенов, повышения устойчивости макроорганизма к неблагоприятным факторам среды и рекультивации земель [1-3]. Эндофитные бактерии *B. subtilis* 26Д – основу биофунгицида Фитоспорин-М активно использует компания «БашИнком» в составе различных препаратов для растениеводства. Некоторые свойства этого штамма, а также *B. subtilis* 11ВМ,

депонированного в коллекции Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (способность синтезировать гормоны, органические кислоты, антибиотики и др.), исследованы. Доказано, что эти бактерии обладают ростстимулирующей активностью и способны проникать в корни и побеги проростков различных растений за относительно короткое время (в тканях проростков кукурузы и гороха эндофитные бактериальные популяции обнаружены на 3-и сутки после инокуляции, а тыквы и фасоли – на 5-е) [4].

* Исследования выполнены при частичном финансировании НИР по Госзаданию №АААА-А16-116020350027-7.

Бактерии *B. subtilis*, штаммы 26Д и 11ВМ относятся к одному виду, но фитогормонподобная активность штаммов разная [4], и реакция сортов сельскохозяйственных культур на инокуляцию их эндофитами может различаться. В литературе крайне мало сведений по этому вопросу. Известно, например, что из 7 исследованных штаммов бактерий рода *Bacillus* изolat S50 стимулировал рост стебля у *Triticum durum* Desf. (сорт Marzak (V1)), тогда как изolat S48 способствовал и удлинению корня, и увеличению сырой и сухой массы растения. Наибольшая стимуляция роста растений пшеницы сорта Karim (V2) выявлена при инокуляции изолатом S35 [5].

Известно, что характер ответа растений при действии любого фитогормона как сигнальной молекулы определяется его концентрацией. При этом кривая доза-ответ растения на применение экзогенного ауксина может иметь форму двухвершинной кривой [6]. Если концентрация гормона не оптимальная, то при более низких концентрациях он усиливает [7, 8], при высоких – снижает рост растений [8, 9]. Так же один и тот же штамм бактерии может стимулировать и ингибировать рост растений определенных видов в зависимости от уровня синтезируемого им гормона [7]. Поэтому физиологический ответ растений может различаться в зависимости от концентрации клеток бактерий в инокуляте. Правильный выбор штамма PGPR и наиболее «адекватных» растений-хозяев может улучшить качество и урожайность различных культур без использования минеральных удобрений [5].

В связи с этим мы исследовали отзывчивость различных сортов пшеницы на обработку семян клетками штаммов *B. subtilis* 26Д и 11ВМ в зависимости от концентрации инокулята – 10^5 - 10^9 клеток в 1 мл препарата.

Методика. Объектом исследования была яровая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сортов Омская 35, Казахская 10, а также озимая пшеница сорта Волжская качественная. Сорт Омская 35 – среднепоздний, вегетационный период составляет 87-90 дней, устойчив к полеганию (4,7-5,0 балла), среднезасухоустойчив. Умеренно восприимчив к бурой ржавчине, восприимчив к пыльной головне, сильно восприимчив к твердой головне, стеблевой ржавчине, мучнистой росе, корневым гнилям. Сорт Казахская 10 – скороспелый, вегетационный период составляет 66-90 дней, высокопродуктивный, устойчив к полеганию, осыпанию, прорастанию на корню. В сильной степени поражается пыльной головней, в средней степени – листовыми болезнями. Сорт Волжская качественная – среднеспелый, вегетационный период составляет 304-348 дней, засухоустойчивый, восприимчивый к бурой ржавчине, сильно восприимчивый к снежной плесени, корневым гнилям [10].

В экспериментах использовали два штамма *B. subtilis* Cohn.: 26Д (коллекция ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии – ВНИИСХМ, №128), 11ВМ (ВНИИСХМ, №519) [11, 12]. Первый штамм выделен из поверхностно стерилизованных тканей растений хлопчатника, второй – мягкой яровой пшеницы [11]. В экспериментах использовали калиброванные семена с всхожестью не менее 90%. Семена перед проращиванием промывали в проточной водопроводной воде, а затем в свежеприготовленной дистиллированной воде [13]. Обработку семян бактериями проводили в ламинар-боксе. В опытах использовали 20-часовую культуру бактерий, выращенную на качалке в мясо-пептонном бульоне при 37 °С в колбах объемом 250 мл. Суспензию клеток доводили до необходимой концен-

трации раствором 0,01 М КСl по оптической плотности культуры. Семена обрабатывали встряхиванием 30 с в круглодонной колбе из расчета на 20 мкл суспензии бактерий/г семян. Семена после обработки подсушивали в открытой колбе в течение 1 ч. Семена контрольных растений обрабатывали дистиллированной водой по такой же схеме. Перед посевом чашки Петри различного диаметра вместе с фильтровальной бумагой стерилизовали в сушильном шкафу (ГП-49-3 ЗУПП, «Витязь», Беларусь) 45 мин при температуре 120 °С. Затем в них раскладывали по 30 семян и наливали свежеприготовленную дистиллированную воду в таком объеме, чтобы при прорастании в течение 5 сут бумага оставалась влажной. Растения выращивали в темноте при температуре 18-20 °С.

При выращивании растений в почве (выщелоченный чернозем) насыпали часть почвы в пластиковые сосуды и раскладывали семена, которые засыпали остатком почвы слоем 1 см. Почву поливали из расчета достижения 70% полной полевой влагоемкости (ППВ). Растения выращивали при освещенности люминесцентными лампами (12 кЛк) и 16-часовом фотопериоде в течение 30 сут.

Все опыты проводили в 3 биологических повторях. Статистическая обработка результатов проведена с помощью стандартных программ пакета Microsoft Excel. В таблицах данные представлены в виде среднего арифметического значения повторов и стандартного отклонения. Для выявления значимых различий между обработанными и необработанными бактериями растениями использовали t-критерий Стьюдента. Различия между контрольными и опытными вариантами оценивали как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Наиболее сильный ростстимулирующий эффект оба штамма проявили при обработке семян суспензией бактерий в концентрации 10^6 кл./мл (табл. 1). Обработка семян клетками эндофитов в концентрации 10^9 кл./мл была практически не эффективна для стимуляции роста пшеницы сортов Казахская 10 и Волжская качественная.

Табл. 1. Рост 5-суточных проростков при обработке семян клетками эндофитов (±% от показателя у контрольных растений)

Сорт	Орган	Концентрация клеток в 1 мл				
		10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
<i>B. subtilis</i> 26Д						
Омская 35	Побеги	19,2*	28,6*	28,6*	25,0*	12,5*
	Корни	15,9*	22,9*	17,5*	17,1*	8,3*
Казахская 10	Побеги	-5,6	15,5*	12,7*	12,7*	0
	Корни	8,2	29,8*	27,9*	6,3	-3,4
Волжская качественная	Побеги	1,4	11,4*	11,4*	-1,4	-12,9*
	Корни	0,7	8,5*	5,1	-0,7	-3,4
<i>B. subtilis</i> 11ВМ						
Омская 35	Побеги	28,6*	39,3*	28,6*	25,0*	0
	Корни	15,9*	17,1*	14,9*	13,0	7,3*
Казахская 10	Побеги	1,4	7,0*	-4,2	0	-15,5*
	Корни	23,1*	13,9*	11,5*	0	-3,8
Волжская качественная	Побеги	14,3*	2,8	2,9	0	-28,6*
	Корни	5,1	10,5*	-1,4	0	-17,0*

* Различия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений достоверны при $P < 0,05$.

Полученные нами результаты согласуются с имеющимися в литературе сведениями об оптимальных концентрациях клеток эндофитов в пределах 10^5 - 10^8 кл./мл для инокуляции таких растений, как слоновая трава (*Pennisetum purpureum* Schumach) и гибридов *Pennisetum* при использовании бактерий видов *Sphingomonas*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Enterobacter* (Li et al., 2016).

Наиболее отзывчивыми на инокуляцию эндофитами оказались растения сорта Омская 35. Так, при обработке семян бактериями в концентрации 10^6 кл./мл длина побегов увеличилась на 28,6% при обработке клетками штамма 26Д и на 40% – штамма 11ВМ в сравнении с контрольными растениями. Стимуляция роста надземной части была сильнее, чем корней. Однако соотношение длины корня и длины побега было больше единицы (1,0) (табл.2). Сорт был отзывчив на инокуляцию в широком диапазоне концентраций клеток в бактериальном суспензии.

Табл. 2. Соотношение средней длины корня к длине побега у 5-суточных проростков пшеницы при обработке семян клетками эндофитов

Сорт	Контроль	Концентрация клеток в 1 мл				
		10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
<i>B. subtilis</i> 26Д						
Омская 35	1,12	1,10	1,07	1,06	1,05	1,08
Казахстанская 10	0,59	0,70	0,66	0,66	0,55	0,57
Волжская качественная	0,84	0,84	0,82	0,80	0,85	0,93
<i>B. subtilis</i> 11ВМ						
Омская 35	1,12	1,02	0,95	1,00	1,01	1,20
Казахстанская 10	0,58	0,71	0,62	0,80	0,58	0,67
Волжская качественная	0,84	0,77	0,90	0,81	0,84	0,98

Проростки пшеницы сорта Казахстанская 10 отзывались на инокуляцию семян в более узком диапазоне концентраций: 10^5 - 10^8 кл./мл штамма 26Д и 10^5 - 10^6 кл./мл штамма 11ВМ. Стимуляция роста корней растений этого сорта при обработке семян в концентрации 10^6 кл./мл была сильнее, чем у сорта Омская 35. При превышении концентрации клеток штамма 11ВМ более 10^8 кл./мл рост проростков пшеницы сорта Казахстанская 10 подавлялся. В чашках Петри наименьшей отзывчивостью на обработку семян бактериями характеризовались растения озимой пшеницы сорта Волжская качественная; оба штамма подавляли рост проростков при использовании препаратов в концентрации 10^9 кл./мл. При обработке семян клетками штамма 11ВМ рост растений ингибировался в несколько раз сильнее, чем при обработке клетками штамма 26Д.

Известно, что повреждение или недоразвитие какого либо органа растения компенсируется усилением роста аналогичного органа или возникновением новых [14]. Логично полагать, что преобладающий над побегом рост корня у проростка позволяет растению

обеспечить его потребности в воде как основного необходимого компонента для дальнейшего строительства организма, поэтому соотношение показателей длины или массы корень/побег в сторону преобладания корня может служить одним из показателей потенциала адаптации растения при действии неблагоприятных факторов.

Анализ соотношения длины корня и побега у проростков пшеницы (табл.2) выявил, что при обработке семян клетками бактерий штамма 11ВМ в концентрации 10^9 кл./мл показатель соотношения длины корня к длине побега у всех сортов увеличивался в сравнении с контрольными растениями и был больше, чем у штамма 26Д. Это согласуется с ингибированием роста проростков пшеницы сортов Казахстанская 10 и Волжская качественная при использовании высокой концентрации клеток бактерий (табл. 1). Таким образом, эти данные подтверждают мнение авторов [14] и могут свидетельствовать о более «жестком» действии клеточного штамма 11ВМ, а также служить признаком включения реакции координации физиологических процессов при наступлении неблагоприятных условий среды, в данном случае увеличении плотности клеток бактерий в инокуляте.

При выращивании растений в почве в условиях оптимальной нагрузки клеток бактерий на семена (10^6 кл./мл) отмечена закономерная стимуляция роста проростков (табл. 3), сходная с полученной в опытах в чашках Петри. При обработке бактериями семян пшеницы сорта Омская 35 длина побегов увеличивалась на 10-12%, корней – на 41 и 18% соответственно клетками штамма 26Д и 11ВМ в сравнении с контрольными растениями. У растений сорта Волжская качественная бактерии штамма 26Д и 11ВМ стимулировали рост побегов на 10%, корней – соответственно на 24,9 и 18%. Длина побегов пшеницы сорта Казахстанская 10 достоверно не отличалась при обработке семян бактериями от показателя у контрольных растений. Обработка семян клетками штамма 26Д стимулировала рост корня на 18%, 11ВМ – всего на 2%. Стимуляция роста корней при обработке бактериями у всех сортов была сильнее, чем побегов (табл.4).

В отличие от экспериментов с 5-суточными проростками в чашках Петри озимая пшеница сорта Волжская качественная, как и яровая культура сорта Омская 35, реагировала на обработку семян стимуляцией роста корней, тогда как разница между обработанными и контрольными проростками сорта Казахстанская 10 по размеру побегов практически отсутствовала, отмечена

Табл. 3. Рост (см) 30-суточных растений в почве при обработке семян пшеницы клетками эндофитов**

Сорт	Контроль, без обработки		<i>B. subtilis</i> 26Д		<i>B. subtilis</i> 11ВМ	
	побег	корень	побег	корень	побег	корень
Омская 35	38,7±0,6	46,2±2,2	42,7±0,8*	65,7±3,9*	43,5±0,5*	54,6±2,9*
Волжская качественная	35,4±0,9	46,9±0,9	38,8±0,5	58,6±2,6*	39,1±0,8	55,4±0,9*
Казахстанская 10	44,2±2,5	43,3±4,0	43,2±2,2	51,2±4,0*	44,0±2,5	44,2±3,8

*Различия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений достоверны при $P < 0,05$.
** Указана сумма длин главного и боковых корней.

только стимуляция роста корней. Такой эффект может быть связан с известной скороспелостью данного сорта. За 30 дней роста растения могли приблизиться в развитии к максимальным генетически заложенным размерам органов на определенном этапе онтогенеза, в то время как позднеспелые сорта все еще реализовывали потенциал роста.

Табл. 4. Соотношение средних значений длины корня к длине побега у 30-суточных растений пшеницы при обработке семян *B. subtilis*

Сорт	Контроль, без обработки	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 11ВМ
Омская 35	1,19	1,53	1,25
Волжская качественная	1,32	1,5	1,42
Казахстанская 10	0,98	1,18	1,00

Таким образом, исследованные сорта пшеницы различаются характером реакции на обработку семян клетками изученных эндофитных штаммов бактерий. Диапазон ростстимулирующих концентраций клеток эндофитов более узок для растений скороспелого сорта Казахстанская 10 в сравнении со среднеспелым сортом Омская 35. Для точной оценки эффективной концентрации клеток бактерий лучше использовать постановку экспериментов в модели, приближенной к полевой – выращивание растений в почве. В этом случае на эффекте стимуляции роста может сказаться не только продукция того или иного фитогормона (регулятора роста) бактерией или индукция ею синтеза фитогормонов растением [11], но и способность микроорганизма мобилизовать элементы питания в почве.

Литература

- Liu D.F., Zhao L., Gao Y.Z., Ren H.X., Liu X. L. Conversion of furfural residue to biofertilizer using *Bacillus subtilis* L7 by solid-state fermentation method // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. – 2015. – V. 7 (3). – P.2491-2496.
- Xu M., Sheng J., Chen L., Y. Men, Gan L., Guo S., L. Shen. Bacterial community compositions of tomato (*Lycop L. ersicum esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 30 (3). – P. 835-845
- Yu H., Xing Y., Lei F., Liu Z., Liu Z., Jiang J. Improvement of the enzymatic hydrolysis of furfural residues by pretreatment with combined green liquor and ethanol organosolv // *Bioresour Technol.* – 2014. – V. 167. – P. 46-52.
- Егоришина А.А., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А., Курамишина З.М., Смирнова Ю.В. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы // *Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология*. – 2011. – № 2. – С. 172-182.
- Chrouqi L., Ouahmane L., Jadrane I., Koussa T., Najib Al feddy T. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) product IAA on the growth of two Moroccan wheat varieties (*Triticum durum* Desf.) // *RJPBCS* – 2017 – V. 8(3) – P. 2296- 2302
- Taiz L., Zeiger E. *Plant Physiology*. – Sinauer Associates Inc. Sunderland, 2010 – 782 p.
- Barazani O., Friedman J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growthmediating bacteria // *J. Chem. Ecol.* – 1999. – V. 25. – P. 2397–2406.
- Pattern C.L., Glick B.R. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system // *Appl Environ Microbiol.* – 2002 – V.68 – P. 3795-801.
- Xie H., Pasternak J.J., Glick B.R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic-acid // *Curr. Microbiol.* – 1996. – V.32. – P. 67-71.
- Характеристика сортов сельскохозяйственных культур, включенных в Госреестр по Республике Башкортостан (Пособие для агрономов) / *Акад. наук Респ. Башкортостан, Башк. науч.-исслед. ин-т земледелия и селекции полевых культур; [Разраб. Д. Б. Гареев и др.] – Уфа : БНИИЗИС, 1997. – 95 с.*
- Егоришина А.А., Хайруллин Р.М., Сахабутдинова А.Р., Лукьянцев М.А. Участие фитогормонов в формировании взаимоотношений проростков пшеницы с эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* 11ВМ // *Физиология растений*. – 2012. – Т. 59. – № 1. – С. 148-155.
- Хайруллин Р.М., Минина Т.С., Иргалина Р.Ш., Загребин И.А., Уразбахтина Н.А. Эффективность новых эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* в повышении устойчивости пшеницы к болезням // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2009. – №2. – С.133-137
- Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Лубянова А.Р., Мурзабаев А.Р., Федяев В.В., Шакирова Ф.М. Участие лектина в формировании устойчивости пшеницы к токсическому действию кадмия // *Физиология растений*. – 2011. – Т. 58. – № 6. – С. 907-914.
- Шапошников Ф.И., Моргунов А.И., Акин Б., Макарова Н.М., Белимов А.А., Тихонович И.А.. Сравнительные характеристики корневых систем и корневой экссудации у синтетического, примитивного и современного сортов пшеницы // *Сельскохозяйственная биология*. – 2016. – Т. 51(1). – С. 68-78.

Поступила в редакцию 19.02.19
 После доработки 10.04.19
 Принята к публикации 20.05.19