

УДК 579.64:633.111:577.175.1.[48+557]

**КОЛОНИЗАЦИЯ РИЗОСФЕРЫ ПШЕНИЦЫ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS* С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНИНОВ**

© Л. Ю. Кузьмина\*, Т. Н. Архипова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН  
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 69.

Тел.: +7 (347) 235 62 47

\*Email: ljku@anrb.ru

Изучена колонизация поверхности корня (ризопланы) проростков пшеницы интродуцируемыми штаммами *Bacillus subtilis* IB-21 и IB-22, различающихся по способности к продукции цитокининов, и аборигенными бактериями. Большая доза внесения препаратов бацилл –  $10^9$  КОЕ/растение определяла высокую плотность популяции интродуцированных бактерий в ризоплане ( $10^8$ – $10^9$  КОЕ/г корней). При меньшей дозе обработок ( $10^5$ – $10^6$  КОЕ/семя или 0.2 кг/т семян) численность популяции интродуцированных штаммов в ризоплане составляла  $10^6$  КОЕ/г. Количество аборигенных бактерий в ризоплане составляло  $10^8$  КОЕ/г, вне зависимости от штамма бацилл и метода инокуляции. Внесение в ризосферу пшеницы клеток *B. subtilis* IB-22 вызвало значительные изменения в содержании цитокининов в растениях, сопровождающееся ростстимулирующим эффектом. Напротив при обработке штаммом *B. subtilis* IB-21 – содержание цитокининов в растениях не отличалось от контроля, а рост-стимулирующий эффект был выражен слабо.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, цитокинины, пшеница, колонизация, ростстимулирующий эффект.

Применение бактерий для обработки семян или растений, с целью повышения устойчивости растений к болезням и повышения урожайности сельскохозяйственных культур, рассматривается как направление связанное с экологически чистой технологией производства продуктов питания [3, 7]. Бактерии рода *Bacillus* Cohn являются перспективными агентами защиты растений от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, продуцентами фитогормонов, обладают способностью к фосфатомобилизации, имеют высокую приспособляемость и выживаемость в неблагоприятных условиях. Однако, применение бациллярных препаратов в сельскохозяйственной практике зачастую оказывается малоэффективным. Главную причину неудач в таких случаях объясняют не изученностью поведения бацилл в ризосфере обрабатываемых растений [6, 8].

В настоящей работе была поставлена задача, исследовать приживаемость бацилл, обладающих различной специфичностью по продукции цитокининов в корневой системе проростков пшеницы.

**Объекты и методы исследований**

Объектом исследований служили два штамма бацилл из коллекции Института биологии УНЦ РАН: *Bacillus subtilis* IB-22 – обладающий способностью к продукции цитокининов [5] и мобилизацией фосфора из органических соединений и *B. subtilis* IB-21 – не продуцирующий фитогормонов. Эффективность инокуляции семян и численность бацилл в ризосфере и ризоплане изучали на проростках пшеницы (*Triticum durum* L.) сорта Безенчукская 139.

Изучение колонизации бациллами прикорневой зоны пшеницы проводили в вегетационных опытах при разных методах внесения бактерий:

поливом культуральной жидкостью растений и обработкой семян сухим препаратом.

Семена пшеницы не стерилизовали для сохранения аборигенной микрофлоры семян. Песок для выращивания растений просеивали, промывали и прокаливали. Растения выращивали в сосудах объемом 500 см<sup>3</sup>. В каждый сосуд помещали по 10 семян растений. Влажность поддерживали весовым методом регулярным поливом стерильной водопроводной водой. Растения выращивали на светоплощадке с 14 ч режимом освещения при 90 Вт/м<sup>2</sup>.

Препараты бактерий культивировали в колбах на ротационных качалках ( $n = 120$  об/мин<sup>-1</sup>) при 37 °С в течение 72–96 ч на среде К1Г, содержащей (г/л): крахмал – 10.0; дрожжевой экстракт – 5.0; пептон – 4.0; кукурузный экстракт – 1.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 1.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 1.0; дистиллированная вода – 1 л; pH в среде – 7.6–7.8.

При инокуляции бацилл в корневую систему растений использовали 72 ч культуры. Препарат вносили в виде культуральной жидкости с титром клеток  $10^9$  КОЕ/мл.

Сухие препараты для инокуляции семян получали высушиванием культуральной жидкости (96 ч) на лиофильной сушилке «Иней 3-2». Инокуляцию зёрен препаратом бактерий производили в колбах в присутствии прилипателя Na-карбоксиметилцеллюлозы (0.01%). При использовании сухих препаратов бацилл их применяли в дозе 0.2 кг/т семян, что соответствовало численности интродуцированных бактерий на семени –  $10^5$ – $10^6$  КОЕ.

Корневую систему трех – суточных растений для варианта обработки культуральной жидкостью анализировали через два часа и на четвертые сутки после обработки. В другом варианте опыта числен-

ность бактерий определяли на семени и на шестые сутки выращивания растений.

Корни с прилипшим грунтом, стерильно отделяли от растений, помещали в ступку и увлажняли 100 мл водопроводной стерильной воды. Затем отмытые корни извлекали крючком, а смытый песок – ризосферный грунт и воду переносили в колбы. Для микробиологического анализа поверхности корней (ризопланы) их вносили стерильно в ступку с кварцевым песком и легко растирали, а затем помещали в колбы со 100 мл водопроводной воды. Колбы с грунтом или корнями встряхивали в качалках в течение 20 мин.

Численность интродуцированных и аборигенных бактерий определяли методом разведений и посевом на картофельный агар. Через 3 суток инкубирования в термостате при 37 °С подсчитывали количество выросших колоний и пересчитывали на численность колониеобразующих единиц (КОЕ) в расчете на 1 зерно, 1 г массы сухих корней или грунт. Численность интродуцированных бактерий анализировали на семенах, в ризосфере (грунте прилипшем к корневой системе) и ризоплане (на поверхности корневой системы).

В опытах с инокуляцией растений культуральной жидкостью бактерий через 42, 78 и 144 часа после внесения препаратов определяли динамику содержания цитокининов в корнях и побегах, а также производили оценку показателей развития (сырой, сухой вес побега и длина растений). Содержание цитокининов (сумма зеатина, зеатинрибозид, зеатиннуклеотида, изопентениладенина, зеатин-О-глюкозида) определяли методом ИФА после спиртовой экстракции растительного материала, очистки на картридже C18 и разделении с помощью тонкослойной хроматографии [2].

### Результаты исследований и их обсуждение

В проведенных микровегетационных опытах использовали разные дозы и способы внесения

препаратов. При использовании препаративной формы в виде рабочего раствора – «культуральной жидкости» способом полива применяли дозу – 1 мл на растение. Эта доза и форма внесения препарата на основе штамма *B. subtilis* IB-22 была эффективно апробирована в лабораторных микровегетационных опытах на растениях пшеницы и салата [1, 4].

В сельском хозяйстве при применении бактериальных препаратов в жидкой форме методом полива используют дозы 0.5–1% рабочего раствора (из препаративной формы) в количестве 200–2000 л/га в зависимости от сельскохозяйственной культуры. Препаративную форму сухих микробиологических препаратов получают из порошка микробной биомассы, в состав которого входят жизнеспособные клетки микроорганизмов и продукты метаболизма (фитогормоны, внеклеточные ферменты, антибиотические вещества и т.д.) и наполнители (носители или биоудобрения), в соотношении 1:20.

В варианте внесения по 1 мл культуральной жидкости на растение пересчет на дозы по рабочему раствору для жидких форм дает расход – 17 600 л/га, что в 350 раз превышает общепринятые дозы использования биопрепаратов.

В опыте при инокуляции семян сухими препаратами бактерий доза внесения составляла 0.2 кг/т семян, что соответствует дозам промышленных препаратов с наполнителями – 4 кг/т и соотносится с общепринятыми нормами использования биопрепаратов 0.4–4 кг/т семян.

В табл. 1 представлены данные по колонизации интродуцируемыми бактериями прикорневой зоны (ризосферы) и корневой системы (ризопланы) при разных дозах и способах внесения бактериальных клеток в корневую систему пшеницы. Как следует из представленных данных (табл. 1) во всех вариантах интродукции бактерий и без обработок наблюдалась высокая численность аборигенных и

Таблица 1

Численность аборигенных и интродуцированных бактерий на поверхности корня (ризоплане) пшеницы и в ризосферном грунте при инокуляции препаратов *B. subtilis* на семени или в прикорневую зону

Форма препарата	Время, часов	КОЕ/	10 <sup>6</sup> КОЕ/семя (г сухих корней или грунт)				
			Контроль	<i>B. subtilis</i> IB-21		<i>B. subtilis</i> IB-22	
			аборигенные	интродуцированные	аборигенные	интродуцированные	аборигенные
Культуральная жидкость	0*	растение	нд	2891.58 ± 125.63	нд	1718.76 ± 371.61	нд
		г грунта	нд	48.18 ± 15.14	нд	28.65 ± 11.39	нд
	2	г грунта + корней	4.43 ± 2.58	32.04 ± 12.51	9.99 ± 4.79	50.99 ± 22.19	0.001 ± 0.0005
		г грунта	7.85 ± 3.02	34.83 ± 10.92	19.37 ± 7.19	43.92 ± 17.92	17.49 ± 6.99
96	г корней		197.46 ± 78.19	1947.27 ± 398.49	185.86 ± 97.39	161.32 ± 56.38	635.84 ± 225.38
Сухой препарат	0	семя	0.001 ± 0.0005	0.61 ± 0.07	0.001 ± 0.0005	1.33 ± 0.14	0.001 ± 0.0005
		г грунта	7.75 ± 0.98	0.01 ± 0.007	1.01 ± 0.29	0.12 ± 0.07	5.28 ± 1.14
	144	г корней	271.45 ± 127.59	1.75 ± 0.08	172.61 ± 87.71	7.04 ± 2.15	243.76 ± 78.73

\* Величина численности бактерий расчетная по количеству внесенного препарата бактерий; нд – нет данных.

интродуцированных бактерий в ризоплане по сравнению с ризосферой. В вариантах обработок растенной культуральной жидкостью бацилл численность интродуцированных бактерий в ризоплане была в 4–56 раз больше чем в ризосферном грунте, а для аборигенных бактерий это соотношение составляло 10–36 раз.

В случае обработки растений сухими препаратами бацилл численность интродуцированных и аборигенных бактерий в ризоплане была в 40–170 раз больше чем в ризосферном грунте.

При внесении препаратов бацилл методом полива культуральной жидкостью через два часа численность аборигенных бактерий на корнях во всех вариантах обработок была того же порядка, что и в контроле (табл. 1). Однако, на четвертые сутки после внесения бацилл численность аборигенных бактерий в грунте около корней возрастала на порядок. Увеличению численности аборигенных бактерий на корнях растений способствует внесение микробных метаболитов, содержащихся в культуральной жидкости.

На четвертые сутки после полива растений культуральной жидкостью численность бацилл в ризосфере (грунте), примыкающей к корням, оставалась неизменной. В тоже время в ризоплане количество интродуцированных бацилл возрастало в десятки и сотни раз (табл. 1).

При инокуляции семян сухими препаратами бацилл, через шесть суток выращивания растений, интродуцированные штаммы колонизировали ризоплану в численности  $10^6$  КОЕ/г корней и обнаруживались в ризосфере  $10^4$ – $10^5$  КОЕ/г грунта (табл. 1).

Оба исследуемых штаммов штамма бацилл, в т.ч. продуцент цитокининов *B. subtilis* IB-22 и штамм, не обладающей способностью к продукции фитогормонов – *B. subtilis* IB-21, при разных дозах и способах использования препаратов, успешно колонизировали корневую систему пше-

ницы на ранних стадиях её развития. Следует отметить что использование штаммов даже в очень высокой дозе не вызвало угнетения растений как в этом опыте, так и в ранее проведенных экспериментах.

Было показано (табл. 2), что внесение в ризосферу пшеницы суспензии клеток цитокининпродуцирующего штамма *B. subtilis* IB-22 в дозе  $10^9$  КОЕ/растение вызвало значительные изменения в содержании цитокининов в инокулированных растениях и, как следствие, наблюдался значительный ростстимулирующий эффект. Ростстимулирующее действие бактерий проявилось в усилении роста листьев и в накоплении сырой и сухой массы растений (табл. 2). Тогда как интродукция штамма *B. subtilis* IB-21 не сопровождалась изменениями в содержании гормонов, а ростстимулирующий эффект был выражен слабо и был статистически недостоверным.

Полевые мелкоделяночные опыты с предпосевной обработкой семян препаратом из клеток и продуктов метаболизма цитокининпродуцирующих бактерий также показывали повышение продуктивности растений. В зависимости от дозы обработки ( $10^5$ – $10^7$  КОЕ/семя) урожай пшеницы увеличивался на 40–70% (рис.). Повышение урожая складывалось из увеличения количества подгона (в среднем на 62%), веса зерен в подгоне одного растения (93%), числа колосков (6%) и семян (15%) в главном колосе, массы 1000 семян (7%).

Таким образом, даже возможно непродолжительное присутствие в ризосфере растений цитокининпродуцирующих микроорганизмов (из-за вытеснения в дальнейшем интродуцированных микроорганизмов аборигенной микрофлорой) приводит к значительным положительным последствиям для роста и урожая как за счет притока цитокининов в растение, стимуляции выработки эндогенных фитогормонов, так и за счет создания благоприятного микробного сообщества.

Таблица 2

Динамика содержания цитокининов в корнях и побегах, показатели развития (сырой, сухой вес побега и длина растений) при инокуляции растений пшеницы бактериальными суспензиями штаммов *B. subtilis* в прикорневую зону

Варианты	Час после обработки									
	48				72	144				
	ЦК, нг/г сырого веса Корень/ побег	Сырой вес, мг/ растение	Сухой вес, мг/ растение	Длина первого листа, мм	ЦК, нг/г сырого веса	ЦК, нг/г сырого веса	Сырой вес, мг/ растение	Сырой вес, мг/ растение	Длина листьев	
					Корень / побег	Корень / побег			1	2
Контроль	66.5 / 57.0	110	14.2	121.0	34.2 / 43.3	44.0 / 32.2	202	23.6	219.6	116.0
IB-21	53.7 / 52.9	116	13.4	120.5	32.4 / 43.7	39.0 / 29.2	212	23.5	223.4	117.5
IB-22	103.1* / 62.9	130**	13.2	125.3	23.5 / 90.2*	29.2* / 42.5*	233**	25.8**	226.7**	124.4**

ЦК – цитокинины; контроль – не инокулированные растения; IB-21, IB-22 – штаммы *B. subtilis*, непродуцирующий и продуцирующий цитокинины соответственно; \* и \*\* – различия по сравнению с контролем достоверны с вероятностью более 95% по критерию Стьюдента ( $p=9$ ) и ( $p=25$ ) соответственно.

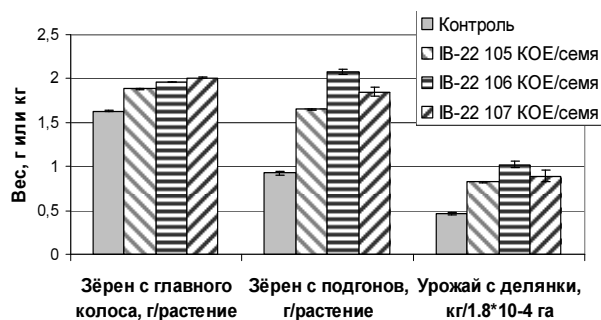


Рис. Урожайность пшеницы в полевом мелкоделяночном опыте при обработке семян суспензией штамма *B. subtilis* IB-22 в разных дозах.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-97049).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова Т. Н., Веселов С. Ю., Кудоярова Г. Р. Влияние цитокининпродуцирующих микроорганизмов на рост растений салата при различном уровне их влагообеспеченности // *Агрохимия*. 2003. №5. С. 36–41.
2. Веселов С. Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений и их метаболитов: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Уфа, 1999. 48 с.
3. Гарипова С. Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве // *Успехи современной биологии*. 2012. Т. 132. №5. С. 493–505.
4. Мартыненко Е. В. Влияние цитокининпродуцирующих бактерий рода *Bacillus* Cohn на рост растений салата и пшеницы: автореф. дис. ... к-та. биол. наук. Уфа, 2009. 22 с.
5. *Bacillus subtilis* IB-22 продуцент цитокининов / Мелентьев А. И., Кудоярова Г. Р., Веселов С. Ю., Архипова Т. Н., Гильванова Е. А., Усанов Н. Г., Кузьмина Л. Ю., Симонян М. В. Россия. Патент RU 2178970 C2, МПК A01N63/00. Заявл. 13.03.2000. Опубл. 10.02.2002. Бюл. № 4. С. 1–10.
6. Bais H. P., Fall R., Vivanco J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* Is facilitated by biofilm formation and surfactin production // *Plant Physiology*. 2004. V. 134. P. 307–319.
7. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // *Applied and environmental microbiology*. 2005, V. 71. No. 9. P. 4951–4959.
8. Gardener B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems // *Phytopathology*. 2004. No. 94. P. 1252–1258.

Поступила в редакцию 23.09.2014 г.

## COLONIZATION OF WHEAT RHIZOSPHERE BY *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS PRODUCING DIFFERENT LEVELS OF CYTOKININS

© L. Y. Kuzmina\*, T. N. Arkhipova

*Institute of Biology of Ufa Scientific Centre of RAS  
69 Oktyabrya Ave., 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Phone: +7 (347) 235 62 47.*

*\*Email: ljku@anrb.ru*

Wheat germs rhizosphere colonization by introduced *Bacillus subtilis*, strains IB-21 and IB-22, differing in ability to cytokinin production, and aboriginal bacteria was studied. Large dose of treatment with bacillar preparations ( $10^9$  CFU/plant) determined high density of introduced bacterial populations in rhizosphere ( $10^8$ – $10^9$  CFU/g of roots). Abundance of introduced bacteria in rhizosphere was  $10^6$  CFU/g at smaller treatment doses ( $10^5$ – $10^6$  CFU/seed or 0.2 kg/t of seeds). Number of aboriginal bacteria in rhizosphere was  $10^8$  CFU/g regardless of bacilli strains and method of treatment. Introduction of *B. subtilis*, strain IB-22 cells into wheat rhizosphere resulted to remarkable changes in cytokinin content in the plants accompanied with growth-promoting effect. In contrast, at treatment by *B. subtilis*, strain IB-21, cytokinin concentration in plants no differed with control plants and growth-promoting influence was mild.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, cytokinins, wheat, colonization.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at [bulletin\\_bsu@mail.ru](mailto:bulletin_bsu@mail.ru) if you need translation of the article.

### REFERENCES

1. Arkhipova T. N., Veselov S. Yu., Kudoyarova G. R. *Agrokhimiya*. 2003. No. 5. Pp. 36–41.
2. Veselov S. Yu. *Ispol'zovanie antitel dlya kolichestvennogo opredeleniya, ochildki i lokalizatsii regulyatorov rosta rastenii i ikh metabolitov: avtoref. dis. ... d-ra. biol. nauk. Ufa, 1999.*
3. Garipova S. R. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2012. Vol. 132. No. 5. Pp. 493–505.
4. Martynenko E. V. *Vliyanie tsitokininproduktivnykh bakterii roda Bacillus Cohn na rost rastenii salata i pshenitsy: avtoref. dis. ... k-ta. biol. nauk. Ufa, 2009.*
5. *Bacillus subtilis* IB-22 produtsent tsitokininov / Melent'ev A. I., Kudoyarova G. R., Veselov S. Yu., Arkhipova T. N., Gil'vanova E. A., Usanov N. G., Kuz'mina L. Yu., Simonyan M. V. *Rossiya. Patent* Pp. 2178970 C2, MPK A01N63/00. Zayavl. 13.03.2000. Opubl. 10.02.2002. *Byul. No. 4. Pp. 1–10.*
6. Bais H. P., Fall R., Vivanco J. M. *Plant Physiology*. 2004. Vol. 134. Pp. 307–319.
7. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E. A. *Applied and environmental microbiology*. 2005, V. 71. No. 9. Pp. 4951–4959.
8. Gardener B. B. M. *Phytopathology*. 2004. No. 94. Pp. 1252–1258.

*Received 23.09.2014.*