

Хайруллин Р.М., Недорезков В.Д., Мубинов И.Г., Захарова Р.Ш.
Башкирский государственный аграрный университет, г. Уфа

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ ЭНДОФИТНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS SUBTILIS*

Показано, что клетки эндофитного штамма 26Д бактерии *B. subtilis* (основа препарата фитоспорин) способны проникать в растения, повышать урожайность пшеницы и ее устойчивость к корневым гнилям. Впервые выявлена способность эндофита повышать устойчивость растений не только к болезням, но и к абиотическим стресс-факторам – засолению и дефициту влаги.

Для защиты растений от болезней наряду с химическими фунгицидами широко используются биопрепараты на основе живых культур микроорганизмов [1]. Эти препараты часто называются биофунгицидами благодаря способности используемых в качестве их основы микроорганизмов непосредственно подавлять развитие фитопатогенных грибов, проявляя антагонизм [1-6]. Среди микробов-антагонистов особое внимание привлекают эндофиты. Согласно С.И. Kado (1992) и С. Chen с соавт. (1995), к эндофитам относятся микроорганизмы, живущие в растительных тканях без нанесения существенного вреда растению или получения выгоды, большей, чем от места жительства.

Первым отечественным биофунгицидом, содержащим живые споры и клетки эндофитного штамма 26Д бактерии *B. subtilis*, разрешенным для применения на территории Российской Федерации, стал препарат фитоспорин [9]. Обработка семян сельскохозяйственных культур этим препаратом стимулирует рост растений, снижает их поражение различными болезнями, что в итоге приводит к повышению продуктивности растений [10].

Повышение урожайности сельскохозяйственных культур при использовании подобных препаратов, вероятно, связано не только с антагонистичностью эндофитов. Не исключено, что эндофитные бактерии могут повышать устойчивость растений и к абиотическим стрессовым факторам, подобно эндофитным микоризным грибам [11, 12]. В известной нам литературе такие сведения не встречались. Поэтому целью работы было выявление способности эндофитного штамма 26Д бактерии *B. subtilis* повышать устойчивость растений к действию абиотических стресс-факторов.

Клетки штамма 26Д *B. subtilis* (№128 коллекции ВНИИСХМ, г. С.-Петербург) получа-

ли, выращивая их на мясо-пептонном агаре при 37 °С [10]. Клетки отмывали от среды двухкратным центрифугированием (PM 180R Италия, 5000 об/мин, 10 мин.) в растворе 0,01 М хлористого калия и готовили их суспензию в том же растворе. Целостность клеток определяли под микроскопом (ЛЮМАМ, Россия).

Объектом исследований служили трехсуточные проростки пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница, полученные из учебно-опытного хозяйства Башкирского ГАУ. Семена перед посевом стерилизовали минуту 80%-ным этанолом, тщательно промывали дистиллированной водой и обрабатывали суспензией клеток в различных концентрациях из расчета 0,02 мл на 1 г сухих семян. Зерновки проращивали в чашках Петри. В экспериментах измеряли длину coleoptиля и главного корня.

В опытах с действием стресс-факторов семена делили на две партии. Одну из них инокулировали бактерией (10^8 клеток/мл, концентрацию определяли по стандарту мутности на фотоэлектроколориметре ФЭК [13]). Другую партию семян обрабатывали таким же объемом раствора КСl. Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге при 22-24°С в темноте. Двухсуточные проростки отделяли от эндосперма, промывали дистиллированной водой и оставляли на ночь в растворе КСl так, чтобы раствор покрывал только корни растений. Затем обе партии растений делили еще на две партии (контроль и опыт).

В экспериментах с засолением среды в контроле неинокулированные и обработанные бактерией проростки пересаживали в чашки Петри на раствор 1%-ной сахарозы, в опыте – на ту же среду, дополнительно содержащую 1% NaCl.

В опыте с действием дефицита влаги проростки высаживали на 10%-ный раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ, молекулярная мас-

са 6000) в 0,5%-ном растворе сахарозы, контрольные проростки находились на растворе сахарозы. Концентрации соли и ПЭГ, время действия стресс-факторов подбирали на основе работы Безруковой М.В. с соавт. (2001). Через определенное время действие стресс-фактора снималось сменой растворов соли и ПЭГ на раствор сахарозы, который менялся также и у контрольных растений.

С целью установления эндофитности штамма бактерии изучали проникновение ее клеток в проростки и взрослые растения пшеницы. Для этого на среде КВ [10], содержащей возрастающие концентрации стрептомицина (от 10 мг/мл до 400 мг/мл), предварительно селектировали устойчивый к антибиотик у штамм.

Семена пшеницы многократно промывали в проточной воде, поверхностно стерилизовали 3 минуты 0,5%-ным раствором гипохлорита натрия, отмывали стерильной дистиллированной водой и проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге в асептических условиях.

Соблюдая эти же условия, через 4 суток проростки погружали в мензурки с суспензией клеток стрептомицин-устойчивого мутанта (10^8 /мл) и создавали кратковременный вакуум водоструйным насосом. Проростки высеивали в горшочки со стерильным субстратом почва-песок-торф (3:1:1 по объему). Через 3 дня проростки отмывали проточной водой, поверхностно стерилизовали раствором гипохлорита натрия и тщательно промывали стерильной дистиллированной водой. В асептических условиях растения делили на части, растирали каждую в ступке с небольшим количеством дистиллированной воды. Аликво-

ты (0,1 мл) десятикратных разведений суспензии в растворе 0,15М NaCl наносили на поверхность агаризованной среды КВ со стрептомицином (400 мг/л). Аналогично выделяли мутант из растений двухмесячного возраста, которые выращивали в комнатных условиях с искусственным освещением.

Выделенные из тканей растений колонии бактерии идентифицировали по культурально-морфологическим признакам [15]. Число клеток и спор в тканях выражали в колонии образующих единицах (КОЕ).

Полевые опыты проводили в учебно-опытном хозяйстве Башкирского ГАУ (село Миловка Уфимского района Республики Башкортостан). В опыте семена перед посевом обрабатывались препаратом фитоспорин (ООО «Биофаг», Уфа) из расчета 2 л/т семян, расход рабочей жидкости 10 л/т. Контрольную партию семян обрабатывали водой. Агротехника возделывания пшеницы была общепринятой для данной зоны. Развитие корневых гнилей на посевах оценивали по методике ВИЗР [16]. Урожайность зерна учитывали на делянках размером 1 м².

Лабораторные опыты проводили в трехкратной биологической повторности, используя от 10 до 20 проростков в каждой. В полевых опытах делянки размещались систематически в трех повторениях. Результаты подвергали статистической обработке [17].

При инокуляции стерильных проростков пшеницы устойчивым к антибиотик у мутантом из тканей различных частей семидневных проростков на среде со стрептомицином выделялись колонии бактерий. В коллоиде их концентрация была примерно в 10 раз ниже, чем в апикальной, и в 100 раз – чем в базальной части корня (таблица 1). В двухмесячных растениях численность бактерии снижалась до 10^2 КОЕ/г.

Таким образом, мы убедились, что бактерия способна проникать во внутренние ткани растений и развиваться в них бессимптомно.

Проростки, полученные из семян, инокулированных бактерией, были крупнее, чем контрольные (таблица 2). В первые двое суток при использовании концентрации клеток 10^8 /мл отмечалось некоторое угнетение роста корней, которое к концу опыта не только

Таблица 1. Частота выделения устойчивых к стрептомицину колоний штамма *B. subtilis* 26Д из внутренних тканей проростков пшеницы

Возраст, часть растения	КОЕ/г
7-дневный проросток	
Надземная часть	10^6
Базальная часть корня	10^8
Апикальная часть корня	10^7
2-месячное растение	
Стебель	10^4
Листья	10^2

Таблица 2. Рост растений пшеницы под влиянием бактерии *B. subtilis* 26Д

Концентрация, кл./мл	Длина, мм					
	корень	колеоп.	корень	колеоп.	корень	колеоп.
	48 ч		72 ч		96 ч	
0 (контроль)	14,6±0,5	5,1±0,1	29,8±1,5	12,4±1,5	55,4±2,5	43,3±1,1
10 ⁹	16,1±0,5	5,6±0,1	41,5±1,5	19,3±2,0	57,0±4,7	40,2±3,5
10 ⁸	13,9±1,7	5,1±0,4	37,5±1,3	18,4±1,4	66,1±1,8	48,0±0,8
10 ⁷	15,5±1,3	5,0±1,3	34,4±3,1	13,6±1,3	55,1±4,7	39,6±4,3

исчезало, но и менялось на противоположный эффект. Через 96 ч. эффект стимуляции роста был одинаковым при действии клеток как в низкой (10⁷), так и в высокой (10⁹) концентрациях. Поэтому в дальнейших экспериментах семена перед посевом обрабатывали клетками бациллы в концентрации 10⁸/мл.

Эффект стимуляции роста и, вероятно, повышения жизнеспособности растений проявлялся и в полевых опытах. Так, число всходов из обработанных семян было больше, чем из контрольных (таблица 3). К концу вегетации число продуктивных стеблей у инокулированных растений было также больше, чем у контрольных. Аналогичные результаты были получены в исследованиях других авторов при изучении эффективности предпосевной обработки семян препаратом фитоспорин [18-19].

При инокуляции семян эндофит проявлял и защитный эффект, подавляя развитие корневых гнилей непосредственно как антагонист или, возможно, индуцируя устойчивость растений к болезням (таблица 4).

Поскольку урожайность пшеницы в многочисленных полевых опытах была, как правило, выше при бактериализации семян этим эндофитом [10], а поражение растений фитопатогенами является одним из существенных, но не единственным стрессовым фактором, способным снижать продуктивность сельскохозяйственных культур, мы предположили, что эндофит, проникая в ткани растений, способен проявлять адаптогенный эффект при действии абиотических стресс-факторов среды. Для проверки этого предположения партию неинокулированных и инокулированных бактерией проростков помещали на 1%-ный раствор сахарозы (контроль) или 1%-ный раствор NaCl (опыт). Через 7 часов сре-

Таблица 3. Влияние обработки семян препаратом фитоспорин на всхожесть и сохранность растений пшеницы (сорт Жница)

Вариант	Количество всходов, шт./м ²	Число продуктивных стеблей перед уборкой, шт./м ²
Контроль	426±2,6	347±38
Фитоспорин	451±4,6	399±10

Таблица 4. Эффективность обработки семян пшеницы препаратом фитоспорин (сорт Башкирская 24)

Вариант	Распространение корневых гнилей, %	Урожайность зерна, ц/га
Контроль	28,7	31,8
Фитоспорин	12,8	33,8

ды меняли на 1%-ный раствор сахарозы и сутки от начала действия стресса наблюдали за ростом растений.

Как и в предыдущем опыте (таблица 2), инокуляция семян эндофитом стимулировала рост проростков. Засоление среды приводило к отчетливому торможению роста проростков к 7 часам опыта (таблица 5).

Торможение роста корня у неинокулированных растений было примерно в 2,5 раза сильнее, чем у инокулированных (таблица 6). У неинокулированных растений ингибирование роста проявлялось еще 17 часов после стресса, тогда как заселенные эндофитом проростки, испытавшие стресс, не отличались от растений, растущих 24 часа на 1%-ной сахарозе.

В следующем эксперименте мы изучали влияние имитации дефицита влаги на рост проростков пшеницы. Проростки, растущие на 1%-ной сахарозе, переносили на такой же раствор, но дополнительно содержащий 10% ПЭГ. Через 4 часа все растворы меняли на

1%-ную сахарозу и наблюдали за растениями еще 40 часов.

Темпы роста у не испытывавших стресс обработанных эндофитом проростков были выше, чему у контрольных растений (табли-

Таблица 5. Размеры проростков пшеницы после действия солевого стресса

Контроль (1% сахарозы)		Опыт (1% сахарозы + 1% NaCl)	
колеоптиль	корень	колеоптиль	корень
Через 7 ч.			
Неинокулированные			
27,7±0,4	30,5±1,0	25,9±0,4	27,6±0,5
Инокулированные			
29,2±0,2	31,5±0,4	27,5±0,5	30,3±0,4
Через 24 ч.			
Неинокулированные			
43,0±0,4	31,6±0,1	37,7±2,4	28,6±0,1
Инокулированные			
43,6±1,0	32,1±1,2	40,1±2,6	32,0±1,0

Таблица 6. Торможение роста проростков после солевого стресса (%)

Через 7 ч.		Через 24 ч.	
Колеоптиль	Корень	Колеоптиль	Корень
Неинокулированные			
6,5	9,5	12,3	9,5
Инокулированные			
5,8	3,8	Недостоверно	Недостоверно

Таблица 7. Влияние ПЭГ на рост проростков пшеницы

Вариант	Длина, мм					
	4 ч.		20 ч.		44 ч.	
	корень	колеоп.	корень	колеоп.	корень	колеоп.
неинокулированные эндофитом						
Контроль	10,0±0,2	4,8±0,1	14,0±0,1	10,2±0,1	15,0±0,1	18,1±1,4
ПЭГ	9,5±0,1	4,8±0,2	9,6±0,1	6,0±1,2	9,6±0,1	9,5±1,5
инокулированные эндофитом						
Контроль	11,0±0,8	5,7±0,3	18,8±1,8	18,0±1,8	21,0±0,3	29,1±1,0
ПЭГ	10,8±0,1	5,9±0,5	11,8±3,3	8,4±0,4	12,3±3,2	15,0±2,7

Таблица 8. Прирост главного корня и колеоптиля через 40 ч. после имитации водного дефицита

Вариант	Прирост, %	
	корень	колеоптиль
Неинокулированные	101	198
Инокулированные	139	254

цы 7, 8), что согласуется с данными, полученными в других экспериментах (таблицы 2, 5). ПЭГ тормозил рост растений, прекращая рост главного корня у проростков, не инокулированных эндофитом. У заселенных эндофитом проростков в условиях стресса наблюдалась тенденция к его росту.

К 20 ч. эксперимента (через 16 ч. после действия ПЭГ) колеоптиль у инокулированных эндофитом проростков был примерно на 30% длиннее, чему неинокулированных. Прирост главного корня и колеоптиля через 40 ч. после стресса был больше примерно на 40% и 50% у инокулированных растений, в сравнении с неинокулированными.

В настоящее время не подлежит сомнению, что внутренние ткани визуально здоровых растений могут быть заселены не только грибами, но и бактериями. Роль естественных грибных эндофитов в устойчивости и живучести пастбищных трав, а также значение искусственной инокуляции такими микроорганизмами полевых культур для повышения их устойчивости к стрессам хорошо изучены. Так, ассоциации злаков с грибом *Acremonium lolii* более устойчивы к повреждению луговым мотыльком, долгоносиками, клопами, некоторыми видами тлей. Показано, что эндофиты этого рода могут повышать устойчивость растений к фитопатогенам [20], а также другим стрессовым факторам. Например, инокуляция латука *Lactuca sativa* L. микоризными грибами рода *Glomus* при водном дефиците повышает биомассу корней [21].

В отношении бактериальных эндофитов информация подобного рода весьма ограничена. Кроме того, бактерии, определяемые некоторыми авторами как эндофиты, следует осторожно относить к таковым, так как условия и методы их изоляции из внутренних растительных структур не всегда могут быть отнесены к асептическим. По нашим данным, мутант штамма 26Д В. *sutilis*, устойчивый к стрептомицину, способен проникать в растение и распространяться по тканям, сохраняя в стебле и листьях жизнеспособность до двух месяцев. В корнях проростков количество клеток бактерий было больше, чем в надземной части. Показатель КОЕ, аналогичный нашему, наблюдали Zinniel с соавт. [22].

В литературе указывается не менее 30 видов эндофитных микробов как потенциальных агентов биоконтроля. На основе работы J. Hallmann (1999) можно полагать наличие у штамма 26Д *B. subtilis* двух механизмов повышения устойчивости растений к болезням. Первый из них связан с антагонизмом бактерии *in vitro* ко многим фитопатогенам, а также с ее способностью конкурентно занимать их нишу обитания на поверхностных или во внутренних тканях растений. Второй может быть связан с индукцией эндофитом у растений системной устойчивости к биотическому стрессу.

Так как при действии различных стресс-факторов растения могут включать одни и те же сигнальные пути и активировать одинаковые классы защитных белков, неудивительно, что инокуляция растений эндофитом *B. subtilis* 26Д повышает также их устойчивость к хлоридному засолению среды, а также к дефициту влаги, имитированному ПЭГ. После семи часов действия соли неинокулированные проростки отставали в росте до 24 ч. опыта (таблица 5), тогда как инокулированные эндофитом проростки в это же время не отличались по размерам от растений, не испытывавших стресс.

Инокулированные эндофитом проростки быстрее преодолевали кратковременное воздействие водного дефицита (таблицы 6, 7); корни неинокулированных проростков не росли даже через 40 ч. опыта, тогда как обработанные клетками эндофита проявили способность к росту через 16 ч. после стрес-

са. Поскольку уже к 4 ч. действия ПЭГ была заметна разница в росте coleoptилей инокулированных и неинокулированных проростков, корректнее было провести сравнение не абсолютных, а относительных показателей (таблица 7). Видно, что темпы роста корня и coleoptили обработанных эндофитом растений оставались более высокими, в сравнении с необработанными (139% и 254%, 101% и 198% соответственно).

Таким образом, мы впервые показали антистрессовый и адаптирующий эффект обработки семян клетками эндофитного антагонистического штамма 26Д *B. subtilis* в условиях засоления среды и имитации засухи. Не исключено, что в основе повышения продуктивности растений при обработке семян клетками и спорами эндофитных представителей этого вида бактерий лежит их способность не только (а возможно, и не столько) повышать устойчивость растений к фитопатогенам. Как следует из нашей работы, инокуляция эндофитом растений пшеницы повышает их устойчивость и адаптационные свойства к действию абиотических стрессоров, таких как высокая концентрация солей в почвенном растворе и засуха. Возможно, аналогичный эффект проявляется также при воздействии на растения низких и высоких температур, токсичных соединений и других стресс-факторов. Изучению этих вопросов, а также поиску механизмов адаптации растений эндофитными штаммами *B. subtilis* к действию абиотических стресс-факторов посвящена следующая часть наших работ.

Список использованной литературы:

1. Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Силищев Н.Н. и др. Роль бактерий-антагонистов фитопатогенов в защите сельскохозяйственных растений от болезней. – Уфа: Гилем, 2001. – 66 с.
2. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В., Томилова О.Г. / Биопрепараты в защите растений: Учебное пособие. – Новосибирск: Новосиб. гос. аграр. ун-т, 2000. – 128 с.
3. Павлюшин В.А. Стратегические задачи исследований по обеспечению фитосанитарного оздоровления агроэкосистем в условиях адаптивно-ландшафтного земледелия // Фитосанитарное оздоровление экосистем (материалы II Всероссийского съезда по защите растений). – С.-Пб. – Пушкин, 2005. – Том 2. – 594 с.
4. Gerhardson B. Biological substitutes for pesticides. // Trends Biotechnol. – 2002. – Vol.20. – P.338–343.
5. Postma, J., Montanari M., Van den Boogert P.H.J.F. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost // Eur. J. Soil Biol. – 2003. – Vol.39. – P.157–163.
6. Welbaum, G., Sturz A.V., Dong Z., Nowak J. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems // Crit. Rev. Plant Sci. – 2004. – Vol.23. – P.175–193.
7. Kado C.I. The Prokaryotes. – Springer-Verlag: New-York, 1992. – Vol.2. – 352 pp.
8. Chen C., Bauske E.M., Musson G. et al. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria // Biological Control. – 1995. – Vol.5. – P.83–91.
9. Менликиев М.Я., Недорезков В.Д., Ваньянц Г.М., Минеев М.И. Фитоспорин. – Уфа: ГУП «Иммунопрепарат», 1996. – 24 с.
10. Недорезков В.Д. Биологическая защита пшеницы от болезней в условиях Южного Урала. – М.: Изд-во МСХА, 2002. – 173 с.

11. Narisawa K., Kawamata H., Currah R.S., Hashiba T. Suppression of Verticillium wilt in eggplant by some fungal root endophytes // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2002. – Vol.108. – P. 103-109.
12. Pozo M.J., Cordier C, Dumas-Gaudot E. et al. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol.53. – P.525-534.
13. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др.; Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
14. Безрукова М.В., А.Р. Сахабутдинова, Р.А. Фатхутдинова и др. // Влияние салициловой кислоты на содержание гормонов и рост проростков пшеницы при водном дефиците // *Агрехимия.* – 2001. – №2. – С.51-54.
15. Хоулт Дж., Криг Н. Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
16. Санин С.С., Неклеса Н.П. Методические указания по проведению производственных демонстрационных испытаний средств и методов защиты зерновых культур от болезней // *Защита и карантин растений.* – 2004. – Приложение. – 23 с.
17. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 324 с.
18. Султанова М.Х., Джалилов А.У. Биологические препараты эффективные в борьбе с болезнями хлопчатника и пшеницы в Таджикистане // *Фитосанитарное оздоровление экосистем (материалы II Всероссийского съезда по защите растений).* – С.-Пб. – Пушкин, 2005. – Том 2. – 594 с.
19. Менликиев М.Я., Байгузина Ф.А. Новый биопрепарат // *Земледелие.*-1998.-№4. – С.15-16.
20. Gwinn K.D., Blank C.A., Cole A.M. et al. Resistance of endophyte-infected tall fescue seedlings to pathogens and pests. [<http://ohld.ag.utk.edu/pss/fescue/fesart9.html>.1998].
21. Ruiz-lozano J.M., Gomez M., Azcon R. Influence of different *Glomus* species on the time-course of physiological plant-responses of lettuce to progressive drought stress periods // *Plant Sci.* – 1995. – Vol. 110. – P.37-44.
22. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants // *Applied and environmental microbiology.* – 2002. – Vol. 68. – P.2198–2208.
23. Hallmann J., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control // *Soil Biol. Biochem.* -1999. – Vol.31.– P.551-560.

Статья рекомендована к публикации 22.01.07