БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, ГЕНЕТИКА

УДК 579.64
DOI: 10.31040/2222-8349-2021-0-4-57-62

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS ZHAODONGENSIS* ДЛЯ СМЯГЧЕНИЯ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА У ПШЕНИЦЫ

© А.А. Кенджиева, Д.В. Четверикова, М.Д. Бакаева, С.П. Четвериков

Распространение форм сорняков, устойчивых к воздействию гербицидов, провоцирует их применение в более высоких дозах. Это может негативно влиять на сельскохозяйственные растения, вызывая окислительный стресс, тормозя рост растений, снижая потенциальную урожайность. Важной задачей является поиск приемов для смягчения гербицидного стресса у сельскохозяйственных культур. Одним из подходов может быть обработка посевов микроорганизмами, благоприятно влияющими на развитие растений. В условиях светоплощадки двухнедельные растения пшеницы опрыскивали гербицидами Октапон эстра (0.1 мкл/растение) на основе 2,4-Д и Наномет (1.3 мкг/растение) на основе метсульфурон-метила и культурой бактерий 12N1 (10^7 КОЕ/растение). Устойчивый к гербицидам штамм 12N1, выделенный ранее из почвы с территории предприятия химической промышленности (Республика Башкортостан, Россия), проявлял нитрогеназную активность 10.1 нмоль $C_2H_4 \cdot ч^{-1} \cdot мл^{-1}$. Гербицидный стресс у пшеницы проявлялся в снижении массы корней на 17%, суммарного содержания хлорофиллов на 13 и 14%, увеличении содержания биохимического маркера стресса пролина в листьях в 2.6 и 5.5 раза под действием Октапона экстра и Наномета соответственно. Применение бактерий стимулировало рост корней пшеницы как в вариантах опыта с гербицидами, так и без них. Обработка культурой бактерий способствовала уменьшению содержания пролина в листьях пшеницы в 1.9 раз на фоне гербицида Октапон экстра и в 6.6 раз на фоне Наномета, а также возвращению показателя суммарного содержания хлорофиллов к контрольным значениям.

На основе полученных данных штамм бактерий 12N1 признан потенциальным антидотом для нивелирования гербицидного стресса у пшеницы. На основании культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и последовательности гена 16S РНК штамм идентифицирован как представитель вида *Pseudomonas zhaodongensis*.

Ключевые слова: гербицидный стресс, антидот, plant growth promoting bacteria, *Pseudomonas*, пшеница, хлорофилл, пролин.

В последние десятилетия интенсивное использование гербицидов привело к их значительному накоплению в почвах. Поскольку гербициды стали одними из наиболее часто встречающихся органических загрязнителей на сельскохозяйственных землях, возникла серьезная обеспокоенность по поводу их возможного воздействия на растениеводство.

Помимо сорняков гербициды способны проявлять токсичность в отношении нецелевых видов растений, в том числе сельскохозяйственных культур. Селективные гербициды, включающие действующие вещества, подобные 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте и сульфонилмочевинам, не приводят к гибели культурных злаков, поскольку те обладают механизмами инактивации данных соединений. Однако на фоне применения гербицидов у культурных злаков может наблюдаться окислительный стресс, повреждение фотосинтетического аппарата [1, 2]. Гербицидный стресс может временно тормозить рост растений, негативно сказываться на урожайности.

В настоящее время в сельском хозяйстве испытываются и активно внедряются новые бактериальные препараты широкого спектра

КЕНДЖИЕВА Алия Абдулжалиловна, Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: aliya_kendzieva@mail.ru
ЧЕТВЕРИКОВА Дарья Владимировна – к.т.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: belka-strelka8031@yandex.ru
БАКАЕВА Маргарита Дмитриевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: margo22@yandex.ru
ЧЕТВЕРИКОВ Сергей Павлович – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: chelab007@yandex.ru

действия, поддерживающие плодородие почв, защищающие от фитопатогенов, повышающие устойчивость к засухе и засолению [3–5]. В этой связи представляет интерес поиск и изучение микроорганизмов, обладающих комплексом свойств, полезных в растениеводстве, и уменьшающих проявления гербицидного стресса у культурных растений.

Ранее из почвы, отобранной с предприятия химической промышленности (Республика Башкортостан, Россия), нами был выделен штамм бактерий 12N1, активно растущий на безазотной среде Эшби, синтезирующий индолилуксусную кислоту в количестве 154±10 нг/мл культуральной жидкости в процессе культивирования на содержащих пептон питательных средах. Штамм сохраняет жизнеспособность в баковых смесях с гербицидами с действующим веществом 2,4-Д (Октапон экстра, Чисталан), флорасулам (Флоракс), метсульфурон-метил (Наномет), что позволяет обрабатывать им посевы одновременно с опрыскиванием их гербицидами. Скрининг и некоторые свойства штамма бактерий 12N1 были описаны в статье Четверикова [6].

Цель работы – протестировать культуру бактерий 12N1 на способность регулировать рост и смягчать проявления гербицидного стресса у пшеницы и определить ее таксономическую принадлежность.

В нашем исследовании для моделирования гербицидного стресса были использованы растения пшеницы (*Triticum aestivum*) и гербициды Октапон экстра и Наномет. Пшеница является одной из основных возделываемых культур во всем мире. Кроме того, как важное сельскохозяйственное растение пшеница часто используется в качестве экотоксикологического индикатора. Гербицид Октапон экстра содержит 500 г/л действующего вещества 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, избирательно действует на двудольные сорняки за счет нарушения гормонального баланса в растении. Наномет содержит 600 г/кг метсульфурон-метила, избирательно действует на двудольные сорняки, ингибирует фермент ацетолактатсинтазу, участвующий в биосинтезе незаменимых аминокислот (ООО «АХК-АГРО», г. Уфа).

Методы исследования. Пшеницу сорта Кинельская юбилейная выращивали в сосудах объемом 0.5 л, заполненных смесью песка с грунтом черноземным в соотношении 1:9, при искусственном освещении (плотность потока фотонов ФАР 190 мкмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$, 14-часовой фотопериод) и температуре 22–26°С. Влажность почвы поддерживали на уровне 60–80% от полной влагоемкости. На седьмые сутки после появления всходов их опрыскивали гербицидом, культурой бактерий или их смесью из расчета на одно растение 0.1 мкл гербицида Октапон экстра, 1.3 мкг гербицида Наномет, 10^7 КОЕ штамма бактерий 12N1. Через 14 сут корни растений тщательно отмывали от почвы, сушили, корни и побеги взвешивали на аналитических весах.

Определение содержания свободного пролина в образцах листьев пшеницы проводили через три дня после обработки гербицидами и бактерией по методу Бейтса с соавт. [7]. Для определения содержания хлорофилла в побегах навески листьев массой 100 мг измельчали и экстрагировали 96% спиртом в течение 24 ч без доступа света. Содержание хлорофилла в экстрактах определяли методом, описанным в статье [2].

Штамм бактерий идентифицировали до вида на основании культурально-морфологических, физиолого-биохимических свойств и последовательности гена 16S РНК. Свойства штамма определяли по общепринятым методикам. Активность нитрогеназы бактерий оценивали по способности восстанавливать ацетилен, как описано в статье [8]. Морфологию клеток исследовали с использованием сканирующего зондового микроскопа ««Solver Pro-M» (NT-MTD»», Российская Федерация). Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием бактериальных праймеров 27F (5` AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3`) и 1492R (5` ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3`) на амплификаторе «My Cycler» («Bio-Rad Laboratories», США). Очистку ПЦР-продуктов и последующую секвенирующую ПЦР проводили с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) согласно инструкциям производителя. Сравнение нуклеотидных последовательностей проводили в EzBioCloud (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon) и GenBank (http:/www.ncbi.nlm.nih.gov). Филогенетические деревья были построены с помощью MEGA-7.0 методом «Neighbor-Joining tree».

Расчет статистических показателей проводили в программе MS Excel. Для определения значимости различий между вариантами опыта использовали *t*-критерий ($p<0.05$) для непарных выборок. Данные были выражены в виде средних значений ± доверительный интервал.

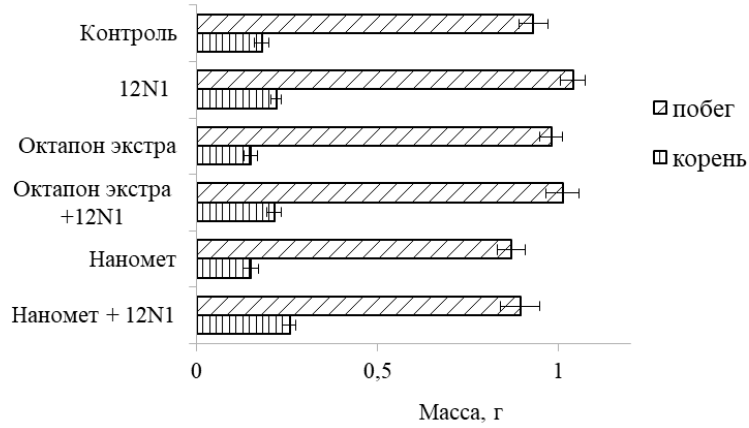

Рис. 1. Масса корней и побегов пшеницы сорта Кинельская юбилейная после обработки гербицидами Октапон экстра, Нанамет и суспензией бактерий штамма 12N1

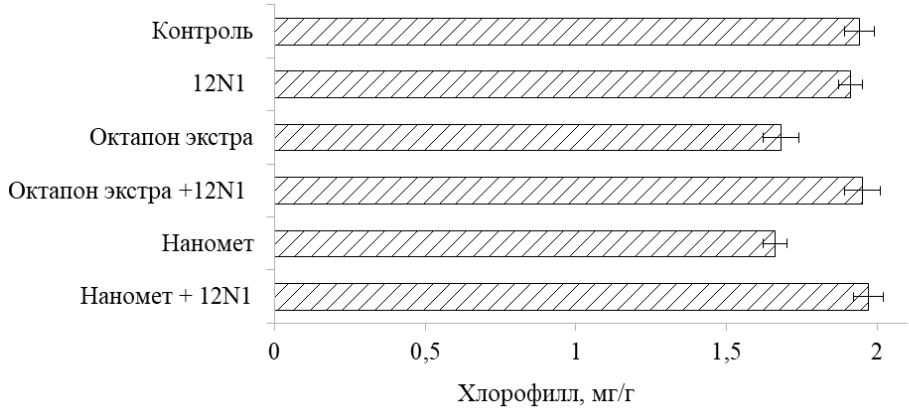

Рис. 2. Количество хлорофилла в листьях растений на третий день после обработки гербицидами Октапон экстра, Нанамет и суспензией бактерий штамма 12N1

Результаты и их обсуждение. Через две недели после опрыскивания гербицидом Нанамет было зарегистрировано уменьшение массы побегов на 6.5% и корней на 17% по сравнению с растениями пшеницы из контрольного варианта (рис. 1). Обработка растений гербицидом Октапон экстра приводила к снижению только массы корневой системы на 17%. Культура бактерий 12N1 проявила себя как стимулятор роста пшеницы. В основном ее действие было направлено на увеличение массы корневой системы (на 19–42% от контроля), что можно объяснить синтезом клетками бактерий ауксина – основного гормона, ответственного за апикальный рост корня. Достоверное увеличение массы побега (на 12%) наблюдалось только в варианте опыта с бактериями, но без гербицидов. Мы связываем его с улучшением минерального питания растений за счет разрастания корневой системы. Однако на фоне применения гербицида Нанамет рост массы корней не сопровождался значимым увеличением массы побегов.

Одной из причин замедления накопления биомассы побегов или корней может быть негативное влияние гербицидов на процессы фотосинтеза. Действительно, суммарное содержание хлорофиллов a и b в листьях пшеницы уменьшалось на 13 и 14% под влиянием Октапона экстра и Нанамета соответственно (рис. 2). В то же время использование штамма бактерий 12N1 в баковой смеси с гербицидами предотвращало разрушение хлорофилла: его содержание в вариантах опыта с двойной обработкой статистически достоверно ($p<0.05$) не отличалось от необработанного гербицидами и бактериями контроля.

Аминокислота пролин может служить биохимическим маркером стресса у растений. Хотя в основном ее накопление связывают с включением защитных механизмов при осмотическом стрессе у растений, есть исследования, связывающие рост содержания пролина в тканях растений и с иными факторами, в том числе с применением гербицидов глифосата [9], хлоротолу-

рона [10]. Это связано с участием пролина в активации антиоксидантной защиты растений в ответ на оксидативный стресс [11]. В нашем исследовании наблюдалось накопление пролина в листьях пшеницы под действием Октапона на 157%, Нанометa на 453% по сравнению с контролем (рис. 3). Нанесение на растения пшеницы штамма бактерий 12N1 приводило к более низкому содержанию в них пролина, чем в вариантах опыта, опрысканных только гербицидами. В вариантах, обработанных баковой смесью Нанометa и бактерий, количество пролина понижалось до контрольного уровня. В научных публикациях встречаются и другие примеры снижения содержания пролина и активности антиоксидантных ферментов под действием бактерий [10], что, очевидно, указывает на уменьшение уровня окислительного стресса в растении. Однако механизмы, лежащие в основе этого явления, остаются нераскрытыми.

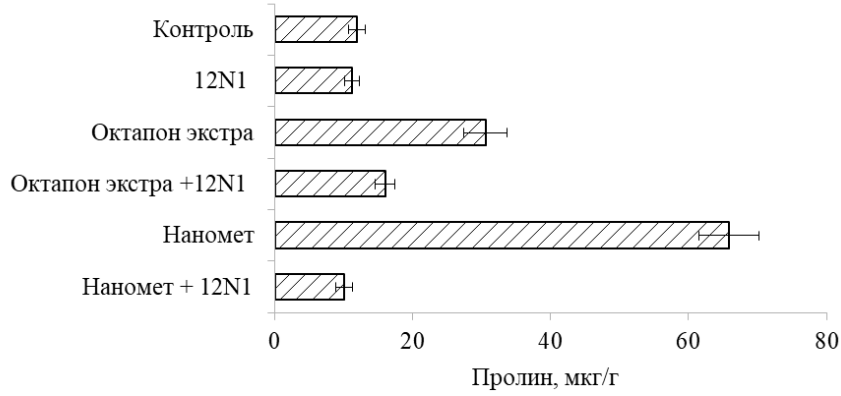

Рис. 3. Количество аминокислоты пролин в листьях пшеницы после обработки гербицидами Октапон экстра, Наномет и суспензией бактерий штамма 12N1

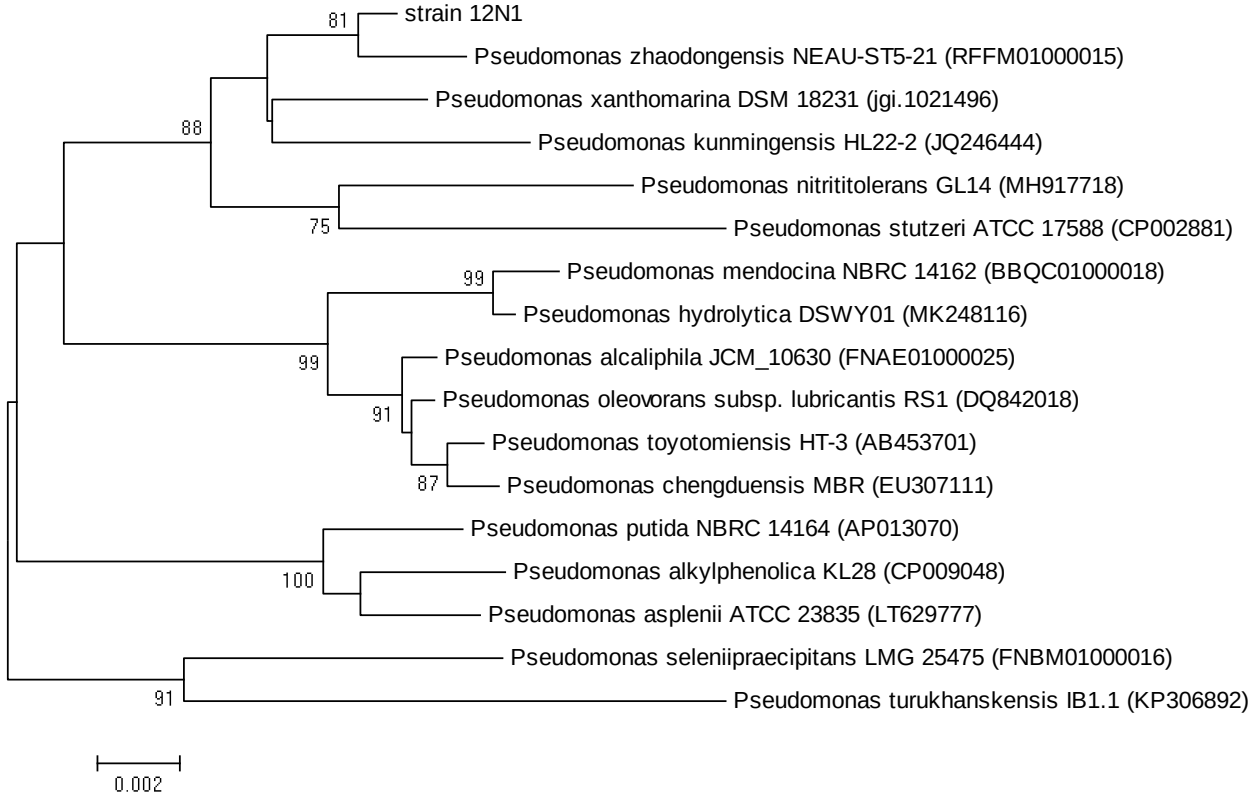

Рис. 4. Филогенетическое положение штамма 12N1 согласно анализу нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 1 нуклеотидной замене на каждые 500 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap» – анализа (показаны величины показателя «bootstrap» – анализа выше 75%)

В связи с положительным воздействием бактерий на растения пшеницы в лабораторных условиях и перспективой дальнейших исследований в этой области с использованием штамма 12N1 он был детально описан и идентифицирован до вида на основании нуклеотидной последовательности (1417 нуклеотидов) гена 16S рРНК, которая была депонирована в GenBank под номером MW479161.

Клетки исследуемого штамма 12N1 – палочковидные, грамотрицательные, длиной 1.5–2.0 мкм, и шириной 0.5–1.0 мкм, с одним полярным жгутиком. Колонии желто-оранжевые, с гладкой поверхностью. Рост аэробный, оптимум температуры роста 28°С, оптимум pH 7, максимум pH 11, максимум NaCl 5%. Тесты на каталазу, оксидазу, восстановление нитратов и Фогес–Проскауэра положительные, тесты на продукцию H_2S и индола отрицательные. Гидролизует крахмал, но не казеин или желатин. Использует в качестве источника питания D-глюкозу, L-арабинозу, мальтозу, D-маннозу, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, глицерин, L-аланин и L-пролин. Не растет на среде с сахарозой, D-фруктозой, D-галактозой, D-маннитом. Производит кислоту из глицерина, L-арабинозы, D-ксилозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, D-маннита, D-мальтозы. Продуцирует щелочную фосфатазу, липазу, эстеразу.

В жидкой культуре 12N1 была измерена активность нитрогеназы – ключевого фермента процесса биологической фиксации атмосферного азота. Ее уровень составил 10.1 нмоль $C_2H_4 \bullet ч^{-1} \bullet мл^{-1}$. Известно, что обладающие нитрогеназной активностью бактерии способствуют улучшению почвенного плодородия [12].

На построенном для изучаемого штамма филогенетическом древе (рис. 4) он входит в один кластер со штаммом *Pseudomonas zhaodongensis* NEAU-ST5-21(T) и имеет с ним наибольшую степень сходства (99.65%).

Таким образом, в результате проведенных исследований были установлены принадлежность штамма 12N1 к виду *Pseudomonas zhaodongensis* и наличие у него полезных признаков: устойчивость к гербицидам, биосинтез ауксинов, нитрогеназная активность, способность стимулировать рост и смягчать стресс, обусловленный влиянием 2,4-Д и метсульфурон-метила, у растений пшеницы. Добавление антидота на основе бактерий в баковые смеси с гербицидами может стать полезным приемом при возделывании пшеницы и заслуживает детального изучения.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № АААА-А19-119021390081-1 с использованием оборудования РЦКП УФИЦ РАН «Агидель».

Литература

1. Wang M., Zhou Q. Effects of herbicide chlorimuron-ethyl on physiological mechanisms in wheat (*Triticum aestivum*) // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2006. V. 64, № 2. P. 190–197.

2. Тимергалин М.Д., Феоктистова А.В., Рамеев Т.В., Кудоярова Г.Р., Четвериков С.П. Роль ауксинпродуцирующих бактерий в преодолении стресса растениями пшеницы в условиях обработки гербицидом Чисталан // Агрохимия. 2020. № 11. С. 35–40.

3. Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Мелентьев А.И., Логинов О.Н. Оценка эффективности применения нового регулятора роста растений на культуре гречихи обыкновенной // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 4. С. 71–76.

4. Kumar A., Patel J.S., Meena V.S., Srivastava R. Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019. V. 20. art. 101271.

5. Koryagin Y., Kulikova E., Efremova S., Sukhova N. The influence of microbiological fertilisers on the productivity and quality of winter wheat // Plant Soil Environ. 2020. V.66, № 11. P. 564–568.

6. Четвериков С. П. Отбор антистрессовых бактериальных агентов для защиты сельскохозяйственных растений // Естественные и технические науки. 2019. № 11. С. 81–84.

7. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies // Plant and Soil. 1973. V. 39. P. 205–207.

8. Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil Biol. Biochem. 1973. V. 5. P. 47–81.

9. Shahid M., Khan M.S. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities // 3 Biotech. 2018. V. 8, № 2. Art. 131.

10. Song N.H., Yin X.L., Chen G.F., Hong Yang H. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils // Chemosphere. 2007. V. 68, № 9. P. 1779–1787.

11. Banu M.N.A., Hoque M.A., Watanabe-Sugimoto M., Matsuoka K., Nakamura Y., Shimoishi Y. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cellsunder salt stress // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. P. 146–156.

12. Igiehon N.O., Babalola O.O. Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018. V. 15, № 4. Art. 574.

References

1. Wang M., Zhou Q. Effects of herbicide chlorimuron-ethyl on physiological mechanisms in wheat (*Triticum aestivum*) // Ecotoxicol. Environ. Saf., 2006, vol. 64, no. 2, pp. 190-197.

2. Timergalin M.D., Feoktistova A.V., Rameev T.V., Kudoyarova G.R., Chetverikov S.P. Role of auxin-producing bacteria in overcoming the stress of wheat plants under treatment with the herbicide Chistalan // Agrohimiya, 2020, no. 11, pp. 35-40 (in Russian).

3. Kuzina E.V., Rafikova G.F., Melent'ev A.I., Loginov O.N. Evaluation of efficiency of a new plant growth regulator in common buckwheat culture // Proceedings of the RAS Ufa Scientific Center, 2018, no. 4, pp. 71-76 (in Russian).

4. Kumar A., Patel J.S., Meena V.S., Srivastava R. Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture // Biocatal. Agric. Biotechnol, 2019, vol. 20, art. 101271.

5. Koryagin Y., Kulikova E., Efremova S., Sukhova N. The influence of microbiological fertilisers on the productivity and quality of winter wheat // Plant Soil Environ, 2020, vol. 66, no. 11, pp. 564–568.

6. Chetverikov S.P. Selection of anti-stress bacterial agents for the protection of agricultural plants // Estestvennye i tekhnicheskie nauki, 2019, no. 11, pp. 81-84 (in Russian).

7. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies // Plant and Soil, 1973, vol. 39, pp. 205-207.

8. Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil Biol. Biochem, 1973, vol. 5, pp. 47–81.

9. Shahid M., Khan M.S. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities // 3 Biotech, 2018, vol. 8, no. 2, Art. 131.

10. Song N.H., Yin X.L., Chen G.F., Hong Yang H. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils // Chemosphere, 2007, vol. 68, no. 9, pp. 1779-1787.

11. Banu M.N.A., Hoque M.A., Watanabe-Sugimoto M., Matsuoka K., Nakamura Y., Shimoishi Y. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cellsunder salt stress // J. Plant Physiol, 2009, vol. 166, pp. 146–156.

12. Igiehon N.O., Babalola O.O. Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture // Int. J. Environ. Res. Public Health, 2018, vol. 15, no. 4, Art. 574.

PROSPECTS FOR USING *PSEUDOMONAS ZHAODONGENSIS* TO MITIGATE HERBICIDAL STRESS IN WHEAT

© A.A. Kendzhieva, D.V. Chetverikova, M.D. Bakaeva, S.P. Chetverikov

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

The proliferation of herbicide-resistant forms of weeds provokes herbicide application in higher doses. It may have a negative impact on agricultural crops, causing oxidative stress, inhibiting the growth of plants, reducing yield potential. An important task is to find methods to mitigate herbicidal stress in crops. One approach may be to treat crops with microorganisms that favorably affect the growth of plants. Under the conditions of the light site, two-week wheat plants were sprayed with herbicides Octapon estra (0.1 μl/plant) based on 2,4-D and Nanomet (1.3 μg/plant) based on metsulfuron-methyl and a culture of bacteria 12N1 (10^7 CFU/plant). Herbicide-resistant strain 12N1, previously isolated from soil from the territory of a chemical industry enterprise (Republic of Bashkortostan, Russia), showed nitrogenase activity of 10.1 nmol $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot ml^{-1}$.The use of bacteria stimulated the growth of wheat roots both in the variants of the experiment with and without herbicides. Treatment with bacterial culture reduced the proline content in wheat leaves by 1.9 times against the background of the herbicide Octapon extra and by 6.6 times against the background of Nanomet, as well as the return of the total chlorophyll content to the control values.

On the basis of the obtained data, the bacterial strain 12N1 was recognized as a potential antidote for mitigating herbicidal stress in wheat and was identified as member of the species Pseudomonas zhaodongensis based on the cultural, morphological, physiological, biochemical features and the sequence of the 16S RNA gene.

Key words: herbicidal stress, antidote, plant growth promoting bacteria, Pseudomonas, wheat, chlorophyll, proline.