

УДК 579.64

DOI: 10.31040/2222-8349-2022-0-3-31-36

**БАКТЕРИИ *BURKHOLDERIA VIETNAMIENSIS* С КОМПЛЕКСОМ
ПОЛЕЗНЫХ ДЛЯ РАСТЕНИЙ СВОЙСТВ УМЕНЬШАЮТ ВЫЗВАННЫЙ
НЕДОСТАТКОМ ВЛАГИ СТРЕСС У МОГАРА (*SETARIA ITALICA* L.)**

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

Могар, чумиза или просо итальянское (*Setaria italica* L.) – зерновая и кормовая культура, которая возделывается в степных районах Российской Федерации, подверженных периодическим засухам. Поскольку растения устанавливают тесные связи с обитающими в их ризосфере микроорганизмами, подбор полезных бактерий и их применение в растениеводстве, в том числе в неблагоприятных почвенно-климатических условиях, считаются перспективным направлением исследований. Целью данной работы было изучение роли штамма – представителя рода *Burkholderia* в стимулировании роста растений и смягчении стресса от засухи у проса итальянского. Штамм *B. vietnamiensis* 8СН фиксирует атмосферный азот, синтезирует индолилуксусную кислоту в количестве 474.8 нг/мл в богатых питательных средах, мобилизует фосфаты и проявляет антагонизм в отношении фитопатогенных грибов. При этом воздействие бактерий рода *Burkholderia* на засухоустойчивость могоара изучалось впервые. Таксономическую принадлежность штамма уточняли путем определения нуклеотидной последовательности гена 16S РНК. Могар выращивали в горшках в лабораторных условиях при искусственном освещении. Влажность почвы поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости в качестве стандарта и 20% для имитации засухи. Белок измеряли по Брэдфорду, малоновый диальдегид – по реакции с тиобарбитуровой кислотой, активность пероксидазы – по скорости окисления гваякола. При 20% влажности почвы обработка растений могоара штаммом *B. vietnamiensis* приводила к увеличению массы побегов на 83%, корней на 160%. Улучшение состояния растений могоара после использования бактерий подтверждалось снижением концентрации в листьях маркера окислительного стресса – малонового диальдегида до уровня контроля. В процессе исследования было выявлено по крайней мере два механизма антистрессового влияния бактерий при дефиците почвенной влаги: активация антиоксидантных ферментов и улучшение водного баланса в растениях. Активность фермента пероксидазы возрастала на 42%, а относительное содержание воды в листьях увеличилось с 74 до 87%.

Ключевые слова: *Burkholderia*, plant growth promoting bacteria, засухоустойчивость, могоар, чумиза.

Могар, чумиза или просо итальянское (*Setaria italica* L.) – устойчивая к болезням и вредителям, засухоустойчивая, теплолюбивая сельскохозяйственная культура. Он дает хорошие урожаи с относительно высоким содержанием белка и низким содержанием синильной кислоты. Зеленая масса могоара подходит для производства сена, травяной муки, силоса, а зерно – комбинированных кормов для животных. В отличие от других видов проса, итальян-

ское просо можно выращивать в более прохладных и засушливых условиях [1]. Степные районы Российской Федерации входят с число регионов, где могоар активно возделывается. В последние годы интерес к этой культуре увеличивается в связи с наметившимися тенденциями в изменении климата, заключающимися в увеличении частоты жарких засушливых периодов, поскольку могоар экономно и эффективно расходует почвенную влагу.

ЧЕТВЕРИКОВ Сергей Павлович – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: che-kov@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

КЕНДЖИЕВА Алия Абдулжалиловна, Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: aliya_kendzieva@mail.ru

В то же время в связи с растущим интересом к развитию устойчивого сельского хозяйства большое внимание учеными уделяется взаимодействию растений с почвенными ризосферными микроорганизмами, смягчающими воздействие на растения стрессовых факторов. Например, показано, что негативное воздействие засухи на растения могоара уменьшается после его обработки культурами бактерий, принадлежащих к родам *Acinetobacter* [2] и *Pseudomonas* [3]. Однако публикаций, посвященных влиянию бактерий рода *Burkholderia* на засухоустойчивость могоара, нами обнаружено не было.

Поэтому целью настоящего исследования стало изучение роли штамма – представителя рода *Burkholderia* в стимулировании роста растений и смягчении стресса от засухи у проса итальянского. Штамм 8СН представляет собой аэробную мезофильную протеобактерию, которая фиксирует атмосферный азот, синтезирует индолилуксусную кислоту в количестве 474.8 нг/мл в богатых питательных средах, мобилизует фосфаты и проявляет антагонизм в отношении грибов родов *Alternaria*, *Bipolaris*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* [4].

Материалы и методы. Бактерии для проведения опытов культивировали 4 суток в колбах со 100 мл мясо-пептонного бульона на термостатируемом шейкере (160 оборотов в минуту) при 28°C. Выделение тотальной ДНК и амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили аналогично тому, как было описано ранее в статье [5]. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программах MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>) и Sequence Scanner v1.0. Гомологичные последовательности искали в базах данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) и GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), филогенетическое древо формировали в программе MEGA-7.0 методом «Neighbor-Joining tree».

Вегетационный опыт ставили, высаживая по семь проростков могоара сорта Бельский в горшки объемом 0.5 л, заполненные смесью песка с грунтом черноземным (с. Булгаково, Уфимский район, Республика Башкортостан) в соотношении 4:6. Растения выращивали на светоплощадке при плотности потока фотонов ФАР 190 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, 14-часовом фотопериоде и температуре 22–26°C. Влажность почвы поддерживали на уровне 60% от полной влаго-

емкости в качестве стандарта и 20% для имитации засухи. Растения делили на контрольную группу без обработки бактериями и опытную группу, в которой непосредственно перед посевом на семена наносили штамм 8СН в количестве 2.6·10⁴ КОЕ/растение.

Листья и корни взвешивали на аналитических весах A&D HR-250AZG (Япония) сразу после их отделения от растения через 28 суток после появления всходов. Относительное содержание воды (ОСВ) в свежесрезанных листьях рассчитывалось по формуле Barrs и Weatherley [6]. Количество белка в листьях измеряли по методу Брэдфорда [7]. Содержание малонового диальдегида (МДА) в листьях определяли спектрофотометрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой на 24 сутки после появления всходов [8]. Активность фермента пероксидазы в листьях оценивали по скорости окисления гваякола внесенной в реакционную смесь 0.3% перекисью водорода [9]. Гваякол детектировали фотометрически при длине волны 440 нм. Измерения проводили в 3 биологических и в 3 аналитических повторях.

Данные были выражены в виде средних значений ± доверительный интервал, рассчитанных с использованием MS Excel. Достоверность различий между средними показателями анализировалась с помощью t-критерия.

Результаты. Для уточнения видовой принадлежности бактериального штамма 8СН из его чистой культуры была выделена тотальная ДНК и проведено секвенирование фрагмента гена 16S РНК размером 1380 пар нуклеотидов. Поиск гомологичных последовательностей в базах генетических данных позволил установить 100% сходство секвенированного фрагмента с нуклеотидной последовательностью, зарегистрированной для типового штамма *Burkholderia vietnamiensis* LMG 10929^T (рис. 1). Таким образом была подтверждена принадлежность исследуемого штамма к роду *Burkholderia*.

В лабораторном вегетационном опыте было изучено влияние *B. vietnamiensis* 8СН на ростовые и некоторые физиологические характеристики у молодых растений могоара (табл.). При благоприятной для растений влажности почвы (60%) у растений, обработанных бактерией, на 50.5% возростала сырая масса побегов, в то время как достоверного увеличения массы корней обнаружено не было. Дефицитное увлажне-

ние почвы (20%) приводило к уменьшению размеров растений могара, а использование на его фоне *B. vietnamiensis* 8СН к росту массы побегов на 83% и корней на 160%.

В засушливых условиях в листьях могара нарушался водный баланс, и ОСВ падало на 13% (рис. 2). Одновременно в листьях активнее накапливался МДА. В то время как в варианте опыта с инокуляцией бактериями содержание воды и МДА в листьях регистрировались на уровне контрольных значений.

Содержание общего белка в разных вариантах опыта колебалось незначительно (табл.). Наблюдалась тенденция к росту активности фермента пероксидазы в листьях могара, для обработки которого был использован штамм 8СН (рис. 2). Особенно заметно эта тенденция прояв-

лялась в засушливых условиях, где ферментативная активность достоверно увеличивалась на 42.4%.

Обсуждение результатов. Согласно полученным результатам, бактерии *B. vietnamiensis* 8СН положительно влияли на рост могара при разных уровнях увлажнения почвы. При благоприятной влажности почвы увеличение массы побегов не сопровождалось увеличением массы корней. Вероятно, рост побегов обеспечивался обогащением почвы доступными азотными и фосфорными соединениями за счет жизнедеятельности внесенного штамма бактерий. Вызванная бактериями стимуляция роста не сопровождалась снижением содержания в листьях могара белка, а значит, не ухудшалась их потенциальная кормовая ценность.

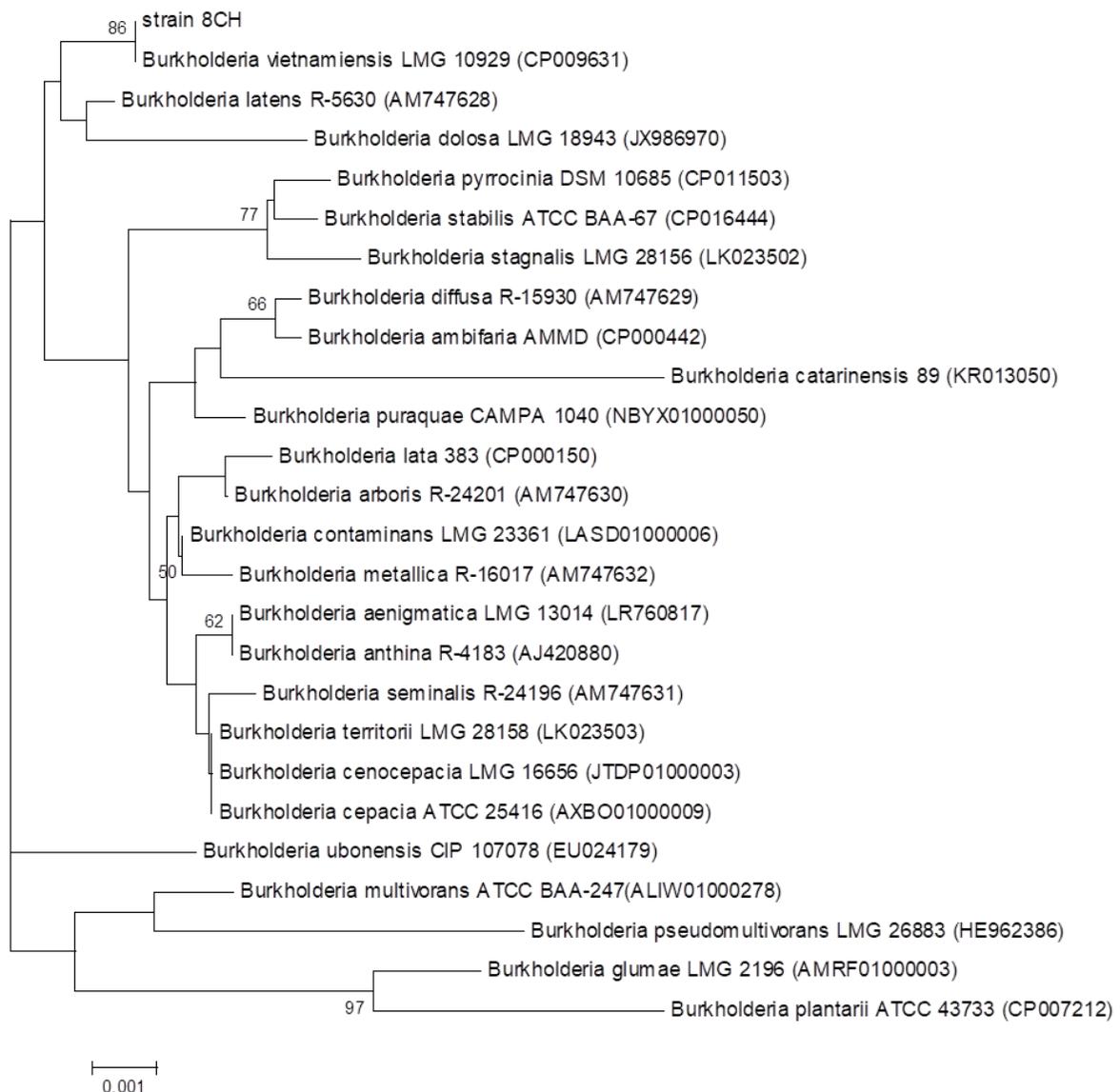


Рис. 1. Филогенетическое положение штамма 8СН. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 1000 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления

Сырой вес листьев, корней и относительное содержание воды в листьях могора через 28 суток роста

Обработка бактериями	Влажность почвы, %	Сырой вес корней, г/растение	Сырой вес листьев, г/растение	Белок, мг/г
Без бактерий	60	0.108±0.009 ^b	0.184±0.006 ^b	1.29±0.04 ^a
<i>B. vietnamiensis</i> 8СН	60	0.094±0.006 ^b	0.277±0.007 ^c	1.27±0.05 ^a
Без бактерий	20	0.030±0.003 ^a	0.132±0.004 ^a	1.24±0.04 ^a
<i>B. vietnamiensis</i> 8СН	20	0.078±0.008 ^b	0.242±0.008 ^b	1.34±0.08 ^a

Примечание. Одинаковыми латинскими буквами помечены достоверно не отличающиеся значения (p>0.05)

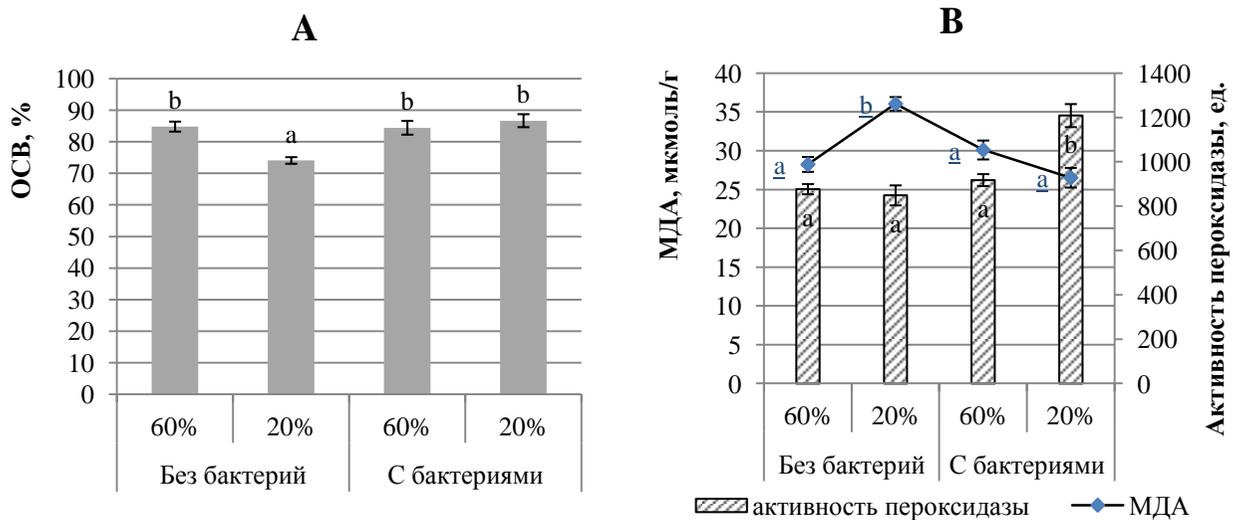


Рис. 2. Относительное содержание воды (А), малонового диальдегида и активность пероксидазы (В) в листьях могора

Очевидно, важным фактором, повлиявшим на биомассу могора в засушливых условиях, стало нарушение водного баланса в тканях листа. Снижение ОСВ является одной из ранних реакций на засуху и обычно сопровождается закрытием устьиц. Что в свою очередь приводит к ряду негативных эффектов: накоплению активных форм кислорода, нарушению стабильности мембран, фотосинтеза, поглощения ионов и синтеза аминокислот [10]. МДА – хорошо известный маркер наличия активных форм кислорода, образующийся в результате окисления липидов мембран. Рост его содержания в листьях могора при дефиците воды указывает на окислительный стресс у могора, а нормализация его количества в результате применения *B. vietnamiensis* 8СН на нивелирование этого стресса. Причиной нормализации может быть восстановление водного баланса в растениях за счет активизации роста корней и увеличения таким способом их поглощающей способности.

Соотношение веса корней к весу побегов, которое в варианте опыта с засухой без бактерий составляло 0.23, увеличилось до 0.32 в варианте с засухой и применением *B. vietnamiensis* 8СН.

Антиоксидантные ферменты играют решающую роль в борьбе с окислительным стрессом. Они могут улучшать физиологическое состояние растительных тканей, удаляя активные формы кислорода или индуцируя активность других антиоксидантов, чтобы свести к минимуму вызванное стрессом окислительное повреждение [11]. В описанном выше эксперименте активность антиоксидантного фермента пероксидазы в листьях могора возрастала при одновременном воздействии дефицита влаги и бактерий *B. vietnamiensis* 8СН, что было еще одним механизмом противодействия окислительному стрессу.

Заключение. Впервые было показано положительное влияние представителя рода

Burkholderia со свойствами, характерными для ростстимулирующих бактерий, на накопление биомассы молодыми растениями могоара в засушливых условиях и при нормальном увлажнении почвы. Полученные результаты указывают на наличие, по крайней мере, двух механизмов антистрессового влияния бактерий при дефиците почвенной влаги: активации антиоксидантных ферментов и улучшения водного баланса в растениях за счет увеличения объема корневой системы.

Исследование выполнено в рамках Госзадания Минборнауки России № 075-03-2021-607 от 29.12.2020 по теме № 122031000309-7 с использованием оборудования РЦКП УФИЦ РАН «Агидель», а также в рамках программы создания и развития Селекционно-семеноводческого центра по кормовым культурам УФИЦ РАН (соглашение № 075-15-2021-549).

Литература

1. Nadeem F., Ahmad Z., Ul Hassan M., Wang R., Diao X., Li X. Adaptation of foxtail millet (*Setaria italica* L.) to abiotic stresses: a special perspective of responses to nitrogen and phosphate limitations // *Frontiers in Plant Science*. 2020. V. 11. Article 187.
2. Kour D., Rana K.L., Yadav A.N., Sheikh I., Kumar V., Dhaliwal H.S., Saxena A.K. Amelioration of drought stress in Foxtail millet (*Setaria italica* L.) by P-solubilizing drought-tolerant microbes with multifarious plant growth promoting attributes // *Environmental Sustainability*. 2020. V. 3. № 1. P. 23–34.
3. Niu X., Song L., Xiao Y., Ge W. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with Foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress // *Frontiers in Microbiology*. 2018. V. 8. Article 2580.
4. Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Кенджиева А.А., Бакаева М.Д. Новые устойчивые к гербицидам штаммы микроорганизмов для защиты сельскохозяйственных растений // *Проблемы агрохимии и экологии*. 2020. № 4. С. 36–40.
5. Кенджиева А.А., Четверикова Д.В., Бакаева М.Д., Четвериков С.П. Перспективы использования бактерии *Pseudomonas zhaodongensis* для смягчения гербицидного стресса у пшеницы // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2021. № 4. С. 57–62.
6. Barrs H.D., Weatherley P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves // *Australian Journal of Biological Sciences*. 1962. V. 15. № 3. P. 413–428.
7. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты) / Ю.Ю. Невмержицкая,

О.А. Тимофеева. Казань: Казанский университет, 2012. 36 с.

8. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Analytical Biochemistry*. 1978. V. 86. № 1. P. 271–278.

9. Кинетические, биохимические и биологические методы анализа / Л.В. Мосталыгина. Курган: Курганский государственный университет, 2016. 30 с.

10. Yang X., Lu M., Wang Y., Wang Y., Liu Z., Chen S. Response mechanism of plants to drought stress // *Horticulturae*. 2021. V. 7. № 3. Article 50.

11. Laxa M., Liebthal M., Telman W., Chibani K., Dietz K.-J. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance // *Antioxidants*. 2019. V. 8. № 4. Article 94.

References

1. Nadeem F., Ahmad Z., Ul Hassan M., Wang R., Diao X., Li X. Adaptation of foxtail millet (*Setaria italica* L.) to abiotic stresses: a special perspective of responses to nitrogen and phosphate limitations // *Frontiers in Plant Science*, 2020, vol. 11, article 187.
2. Kour D., Rana K.L., Yadav A.N., Sheikh I., Kumar V., Dhaliwal H.S., Saxena A.K. Amelioration of drought stress in Foxtail millet (*Setaria italica* L.) by P-solubilizing drought-tolerant microbes with multifarious plant growth promoting attributes // *Environmental Sustainability*, 2020, vol. 3, no. 1, pp. 23–34.
3. Niu X., Song L., Xiao Y., Ge W. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with Foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress // *Frontiers in Microbiology*, 2018, vol. 8, article 2580.
4. Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Кенджиева А.А., Бакаева М.Д. New strains of microorganisms resistant to herbicides for the protection of agricultural plants // *Problemy agrohimii i ekologii*, 2020, no. 4, pp. 36–40.
5. Kenjjeva A.A., Chetverikova D.V., Bakaeva M.D., Chetverikov S.P. Prospects for using *Pseudomonas zhaodongensis* to mitigate herbicidal stress in wheat // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAS*, 2021, no. 4, pp. 57–62.
6. Barrs H.D., Weatherley P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves // *Australian Journal of Biological Sciences*, 1962, vol. 15, no. 3, pp. 413–428.
7. Practicum on plant physiology and biochemistry (proteins and enzymes): Educational and methodological manual / Yu.Yu. Nevmerzhitskaya, O.A. Timofeeva, 2012, 36 p.
8. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Analytical Biochemistry*, 1978, vol. 86, no. 1, pp. 271–278.

9. Kinetic, biochemical and biological methods of analysis / L.V. Mostalygina, 2016, 30 p.

10. Yang X., Lu M., Wang Y., Wang Y., Liu Z., Chen S. Response mechanism of plants to drought stress // Horticulturae, 2021, vol. 7, no. 3, article 50.

11. Laxa M., Liebthal M., Telman W., Chibani K., Dietz K-J. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance // Antioxidants, 2019, vol. 8, no. 4, article 94.



BACTERIA *BURKHOLDERIA VIETNAMENSIS* WITH A COMPLEX OF PROPERTIES USEFUL FOR PLANTS REDUCE DROUGHT STRESS IN MOGAR (*SETARIA ITALICA* L.)

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

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

Foxtail millet (*Setaria italica* L.) is a grain and fodder crop that is cultivated in the steppe regions of the Russian Federation, subject to periodic droughts. Since plants are closely related to the microorganisms living in their rhizosphere, the selection of beneficial bacteria and their use in crop production, including in adverse soil and climatic conditions, are considered a promising area of research. The purpose of this work was to study the role of a strain – a representative of the genus *Burkholderia* in stimulating plant growth and mitigating drought stress in *Setaria italica*. The bacterial strain *B. vietnamiensis* 8CH fixes atmospheric nitrogen, synthesizes indoleacetic acid (474.8 ng/ml) in rich nutrient media, mobilizes phosphates, and demonstrates antagonism against phytopathogenic fungi. At the same time, the effect of bacteria of the genus *Burkholderia* on the drought resistance of foxtail millet was studied for the first time. The taxonomic affiliation of the strain was clarified by determining the nucleotide sequence of the 16S RNA gene. Foxtail millet was grown in laboratory in pots under artificial lighting. Soil moisture was maintained at 60% of the total moisture capacity as standard and 20% to simulate drought. Protein was measured by Bradford, malondialdehyde – by reaction with thiobarbituric acid, peroxidase activity - by the rate of oxidation of guaiacol. At 20% soil moisture, the treatment of foxtail millet with the *B. vietnamiensis* led to an increase of the shoots' mass by 83%, and roots' mass by 160%. The improvement of the foxtail millet plants' status after the bacterial treatment was confirmed by a decrease in the concentration of the oxidative stress marker – malondialdehyde in the leaves to the control level. During study, at least two mechanisms of the anti-stress effect of bacteria in soil moisture deficiency were identified: activation of antioxidant enzymes and improvement of the water balance in plants. The activity of the peroxidase enzyme rose by 42%, and the relative water content in the leaves increased from 74 to 87%.

Keywords: *Burkholderia vietnamiensis*, plant growth promoting bacteria, drought tolerance, foxtail millet.