

АНОХИНА Н.Л., МАРТЫНЕНКО Е.В., ВАСИНСКАЯ А.Н.,
АРХИПОВА Т.Н.

Учреждение РАН Институт биологии Уфимского НЦ РАН
Россия, 450054, Уфа, пр.Октября, 69, email: arkhipova@anrb.ru

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНИНПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* SOHN. НА РОСТ И УРОЖАЙНОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

В последнее время при возделывании различных сельскохозяйственных культур все большее внимание уделяется приемам, с помощью которых можно воздействовать непосредственно на растительный организм. К таким приемам относится обработка растений или их семян различными веществами, в частности регуляторами роста. Несмотря на то, что растение обладает способностью синтезировать гормоны, во многих случаях добавление их извне оказывает на растение положительное действие. Влияние экзогенных гормонов или их синтетических аналогов проявляется особенно эффективно тогда, когда уровень содержания их в растении невысок, что наблюдается при различных стрессах. В настоящее время арсенал используемых фитогормонов ограничен, так как природные фитогормоны, отличающиеся морфогенетическим эффектом, труднодоступны, дороги, а эффективность их синтетических аналогов невысока, и применение последних не окупает затрат на их производство. Наиболее выгодным в этом отношении являются микроорганизмы, способные их синтезировать. По мнению М. Аршад и В. Франкенбергера, инокуляты могли бы отбираться исключительно по их способности синтезировать рострегулирующие вещества [1].

В Институте биологии Уфимского НЦ РАН из коллекции почвенных микроорганизмов был отобран штамм *B. subtilis* ИБ-22 — продуцент цитокининов [2]. В проведенных нами ранее исследованиях введение суспензии штамма в прикорневую среду растений салата ускоряло их рост и повышало устойчивость к засухе [3]. Целью данной работы являлась оценка эффективности применения цитокининпродуцирующих бактерий для повышения урожайности растений пшеницы в лабораторных и полевых условиях.

Материалы и методы

Объектами исследований служили растения твердой яровой пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорт Безенчукская 139). В лабораторных условиях семена пшеницы стерилизовали смесью 96% этанола и 3% раствора перекиси водорода в соотношении 1:1 в течение 5 минут. Vegetационные сосуды наполняли 0,7 кг стерильного песка и растения пшеницы (по 15 семян/сосуд) росли при освещенности 90 Вт/м² и 14-часовой продолжительности светового дня. Температура воздуха в течение светового периода была в пределах 22–25 °С. Растения ежедневно поливали 100% раствором Хогланда — Арнона и дистиллированной водой до достижения уровня 60% от полной

влажностности. Количество добавляемого питательного раствора соответствовало минимальному уровню ежедневной транспирации/сосуд, а индивидуальные различия между сосудами нивелировались добавлением дистиллированной воды. Инокуляцию трехсуточных растений пшеницы проводили путем внесения суспензии микроорганизмов в корнеобитаемую среду (1 мл/растение). Бактерии выращивали в среде, содержащей: крахмал — 10 г/л; кукурузный экстракт, пептон, дрожжевой экстракт и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — по 3 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и KH_2PO_4 — по 2 г/л. Культивирование проводили в колбах объемом 250 мл со 100 мл питательной среды в аппарате УВТМ-12-250 при 37 °С, 160 мин⁻¹ в течение 72 ч. Титр бактериальной суспензии был 2,7–3,8·10⁷ КОЕ/мл. Содержание цитокининов в побегах и корнях растений пшеницы определяли на 2 и 3 сутки после инокуляции, для чего растительный материал гомогенизировали и экстрагировали 80% этанолом. Цитокинины, содержащиеся в водном остатке, концентрировали на картридже С18 и разделяли методом ТСХ в системе растворителей бутанол: аммиак: вода (6:1:2). Содержание гормонов определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа с помощью специфических антител [4]. Для оценки роста растений измеряли длину корней, площадь листьев, определяли сырую и сухую массу.

Полевые эксперименты проводились на опытном участке в Иглинском районе Башкирии, пос. Балтика (почва серая лесная) по общепринятой методике [5]. Анализировались 4 варианта обработки семян в 4-х повторностях (всего 16 делянок). Учетная площадь делянки 1,8 м². Вегетационный период характеризовался высокой температурой и недостаточным уровнем осадков. Уборка урожая проводилась на стадии восковой спелости. Концентрацию препарата рассчитывали согласно рекомендациям по инокуляции семян пшеницы препаратом фитоспорин (а именно, для обработки 1 т семян необходимо 500 г препарата для получения титра 10⁶ КОЕ/семя) [6]. В качестве прилипателя применяли Na-КМЦ в дозе 0,2 кг/т с добавлением воды (20 л/т). Пропорции зерновок и бактерий брали с таким расчетом, чтобы получить титр 10⁵, 10⁶, 10⁷ КОЕ/семя. Бактерии выращивали, как описано ранее [2]. Эффективность предпосевной бактериализации семян определяли по влиянию на показатели элементов структуры урожая. Выборка для анализа структуры урожая составила 50 растений с каждой делянки. Определяли вес зерен с 50 растений главного колоса и вес семян подгона этих же растений после высушивания их при комнатной температуре в течение нескольких дней до постоянного веса.

Результаты и обсуждение

В процессе работы были использованы штаммы из коллекции микроорганизмов Института биологии УНЦ РАН, различающиеся по способности продуцировать цитокинины: *B. subtilis* ИБ-22 (ЦТК+) и *B. subtilis* ИБ-21 (ЦТК-) (600 и 6 нг-экв. зеатина/мл культуральной жидкости, соответственно) [2]. Внесение в ризосферу растений пшеницы суспензии бактерий с низкой продукцией цитокининов не приводило к существенным изменениям в со-

держании эндогенных цитокининов у этих растений по сравнению с контролем. В то же время внесение бактериальной суспензии ЦТК+ штамма вызвало значительные изменения в содержании цитокининов у инокулированных растений, как по общему их количеству, так и по отдельным формам.

Результаты измерений сырой массы растений показали быструю ростовую реакцию на внесение бактерий. Уже ко второму дню после инокуляции нами отмечалось увеличение сырой массы побегов, в особенности у растений, инокулированных ЦТК+ культурой бактерий. Однако сухая масса опытных растений в этот период не только не увеличилась, но и была несколько ниже, чем масса контрольных растений. К четвертому дню растения, инокулированные цитокининпродуцирующими бактериями, имели большую сухую биомассу по сравнению с контролем, в отличие от растений, инокулированных ЦТК- штаммом. Эти результаты подтверждают предположение о том, что именно цитокинины являются действующим веществом в рост-стимулирующем влиянии бактерий на растения.

Таким образом, присутствие цитокининпродуцирующих микроорганизмов в ризосфере растений пшеницы сопровождалось существенным увеличением суммарного содержания цитокининов в растениях. Подтверждением роли микроорганизмов в обеспечении растений цитокининами является то, что для данного штамма характерно накопление рибозида зеатина в питательной среде [2], и именно содержание рибозида зеатина наиболее существенным образом повышалось в растениях при инокуляции. На поступление цитокининов из ризосферы, инокулированной гормонпродуцирующими бактериями, указывает также то, что их содержание возрастало сначала в корнях и только затем — в побегах растений пшеницы. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что инокуляция растений пшеницы цитокининпродуцирующими микроорганизмами повышает уровень содержания в них цитокининов и стимулирует рост растений, в то время как в присутствии микроорганизмов, не способных синтезировать значительного количества цитокининов, общее содержание цитокининов не изменялось и стимуляция роста была выражена в значительно меньшей степени. Это указывает на роль микробных цитокининов как фактора, обеспечивающего рост-стимулирующее действие бактерий на растения.

Инокуляция прикорневой зоны растений, которая применялась в экспериментах, описанных выше, требует наработки большого количества суспензии. Более перспективным и экономичным является предпосевная обработка семян растений бактериальным препаратом. Поэтому мы проверили эффективность такого способа обработки семян ЦТК+ штаммом в полевых условиях.

Предпосевная обработка семян пшеницы положительно сказывалась на росте растений, о чем свидетельствует увеличение высоты обработанных растений по сравнению с контролем (в среднем на 9,3%). Инокуляция семян благоприятно отражалась на всех показателях, определяющих структуру урожая: увеличилась длина главного колоса (в среднем на 4,5% по сравнению с контрольными растениями), количество колосков в главном колосе

(на 4%), количество зерен главного колоса (на 15%). Количество неозерненных колосков в главном колосе под влиянием обработки снизилось в среднем на 34%. Наблюдалась прямая зависимость между дозой вносимого инокулянта и массой зерен с главного колоса. Значительная прибавка (в 2 раза) наблюдалась в массе зерен с дополнительных побегов растений пшеницы. Это было связано как с увеличением количества дополнительных побегов (подгон), так и качеством зерна в них. Кроме того, при инокуляции возростала густота стояния при уборке (при одинаковой норме высева). Все эти показатели вносили свой вклад в повышение общего урожая зерна, который в среднем увеличился на 70% по сравнению с контрольными необработанными растениями. В количественном отношении доля вклада отдельных показателей была неравноценной. Определяющую роль в прибавке урожая сыграло возрастание количества подгона (в среднем на 62%), количества и веса зерен в подгоне одного растения (на 93%).

Представляет интерес то, насколько полученные нами результаты соотноствуются данным литературы о влиянии цитокининов на показатели урожайности растений. Так было показано, что обработка растений синтетическим цитокинином повышает как количество колосьев на растении, так и вес зерна в них (так же и в наших опытах). Как известно, цитокинины подавляют апикальное доминирование [7], что проявляется в повышении как количества боковых побегов, так и колосков в колосе. Имеются также сообщения о положительном влиянии кинетина на урожай пшеницы, который увеличивался в результате опрыскивания листьев в фазу цветения и повторно через неделю на 13% за счет увеличения числа (но не размеров) зерен [8]. Вообще же в литературе имеются различные данные относительно влияния кинетина на урожай пшеницы [9, 10]. Это объясняется, очевидно, специфичностью сортов, условиями обработки и рядом факторов внешней среды. Н. Ниловская отмечает, что обработка кинетином пшеницы сорта Мироновская способствовала увеличению урожая только при неблагоприятных условиях выращивания [11, 12]. Это согласуется с мнением, что цитокинины способны смягчать последствия деструкционных процессов, вызванных различными стрессовыми факторами [13].

Использование фитогормонов микробного происхождения в растениеводстве перспективно ввиду того, что они являются природными соединениями, не чуждыми растительным организмам, быстро связываются и катаболизируются в клетке, где уже зачастую имеются рецепторы и специфические ферментные системы [14, 15]. В отличие от химических веществ они являются препаратами мягкого действия, способны в различных сочетаниях регулировать отдельные процессы онтогенеза. Необходимо отметить, что преимуществом технологии предпосевной обработки семян растений такого рода препаратами является экологическая чистота и безопасность, т.к. действующее вещество продуцируется микроорганизмами, выделенными из естественной природной среды (почвы) и в растениях имеются механизмы, исключающие накопление избытка фитогормонов. Такой подход является также потенциально более дешевым, поскольку не требует пред-

варительной наработки и очистки действующего вещества (цитокининов), а активные соединения могут продуцироваться микроорганизмами в почве в процессе вегетации.

Выводы

1. Сравнение ростовой реакции растений на инокуляцию штаммами, различающимися по способности синтезировать цитокинины, свидетельствует о том, что именно цитокинины являются действующим веществом в ростстимулирующем влиянии бактерий на растения;

2. Предпосевная обработка семян пшеницы препаратом цитокининпродуцирующих бактерий увеличивала урожай растений в полевых условиях в среднем на 70%.

Работа поддержана грантами РФФИ 10-04-97020-а, 08-04-00591-а, 09-04-00942-а.

Литература

1. *Arshad M., Frankenberger W.* Microbial production of plant hormones // *Plant and Soil.*— 1991.— Vol.133.— P. 1–8.

2. *Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Архипова Т.Н.* Исследование цитокининов, продуцируемых ризосферными микроорганизмами // *Прикл. биохим. и микробиология.*— 1998.— Т.34, №2.— С. 175–179.

3. *Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.Yu., Melentiev A.I., Kudoyarova G.* Cytokinin-producing bacteria modify resistance to water-deficiency stress in young lettuce plants // *Plant and Soil.*— 2007.— Vol.292.— P. 305–315.

4. *Веселов С.Ю.* Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений и их метаболитов. Уфа. Изд-е Башкирск. ун-та, 1998. 138 с.

5. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований).— 5-е изд., доп. и перераб.— М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

6. Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян с.-хозяйственных культур / под ред. К.В. Новожилова М., 1985. 130 с.

7. *Mok D.W.S., Mok M.C.* Cytokinin metabolism and action // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*— 2001.— Vol.52.— P. 89–118.

8. *Тупицын И.В.* Влияние экзогенных фитогормонов на развитие озимой пшеницы // *Физиология и биохимия культ. растений.*— 1986.— Т.19, №4.— С. 402–403.

9. *Лихолат Т.В., Ниловская Н.Т., Помелов А.В., Морозова Э.В.* Влияние обработки кинетином на продуктивность и некоторые физиологические показатели пшеницы при различных условиях облученности // *Физиология растений.*— 1984.— Т.31, вып.1.— С. 20–27.

10. *Dua J.S., Bhardwaj S.* Influence of growth regulating substances on grain growth in aestivum wheats // *Ind. J. Plant Physiol.*— 1979.— Vol.22.— P. 1.

11. *Ниловская Н.Т., Помелов А.В., Морозова Э.В., Лихолат Т.В.* Влияние кинетина на продуктивность пшеницы, выращиваемой при неблагоприятном температурном режиме // *Докл. АН СССР.*— 1984.— Т.274, №1.— С. 254–256.

12. *Ниловская Н.Т., Лихолат Т.В., Помелов А.В., Морозова Э.В.* Условия эффективного применения кинетина для повышения урожая пшеницы // *С.-х. биология.*— 1985.— №5.— С. 119–121.

13. Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress // *Plant. Growth Regul.*— 1997.— Vol.23.— P. 79–103.

14. Романов Г.А., Таран В.Я. Зеатинсвязывающие белки злаков: возрастные, органические, тканевые и субклеточные аспекты // *Физиол. растений.*— 1991.— Т.38, вып.6.— С. 1117–1123.

Резюме

Показано, что стимуляция роста растений пшеницы в результате инокуляции цитокининпродуцирующими микроорганизмами связана с накоплением цитокининов в растениях. Динамика и распределение гормонов между побегом и корнем указывает на их поступление извне, что может быть обусловлено жизнедеятельностью интродуцированных бактерий в ризосфере. Предпосевная обработка семян пшеницы значительно увеличивает продуктивность растений в полевых условиях.

Stimulation of wheat plant growth resulting from inoculation with cytokininproducing bacteria was shown to be coupled to accumulation of cytokinins in plants. Dynamics and distribution of cytokinins between roots and shoots indicates their delivery from outside, which may be due to vital functions of bacteria introduced into rhizosphere. Pre-sowing treatment of wheat seeds significantly increased plant productivity under field conditions.

БАЖИНА Е.В.

*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Россия,
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28, e-mail: genetics@ksc.krasn.ru*

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ С РАЗНОЙ СЕМЕННОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ

Генетическая гетерогенность популяций обуславливает их стабильность и оптимальную приспособленность к условиям окружающей среды [1]. В тоже время, с точки зрения популяционно-генетической концепции отбора приспособленность вида обусловлена его репродуктивным успехом [2]. Пихта сибирская (*Abies sibirica* Ledeb.) характеризуется невысоким уровнем гетерогенности как по морфологическим [3], так и по генетическим [4] признакам. Вместе с тем, для пихты сибирской, как и для многих видов древесных растений, характерна высокая индивидуальная изменчивость показателей половой репродукции: у разных деревьев в шишке может формироваться от 54 до 309 семенных чешуй и от 74 до 336 семян [5]. Гетерогенность растений по семенной продуктивности определяется уровнем их гетерозиготности [6–9].

В настоящей работе проведен анализ генетической обусловленности семенной продуктивности пихты сибирской Средней Сибири.

Материалы и методы

Исследования проводились в 7 разновысотных ценопопуляциях пихты сибирской, произрастающих в разнотравных и крупнотравных (высокогорье Западного Саяна) группах типов леса (табл. 1).