



ПРИМЕНЕНИЕ АССОЦИАТИВНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В АГРОТЕХНОЛОГИИ КАК СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА ПШЕНИЦЫ НА ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВАХ

Д. Ю. ШАРАВИН,

аспирант,

Н. П. КОВАЛЕВСКАЯ,

кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук

(614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13; тел.: 89024772024; e-mail: dima-sharavin@yandex.ru)

Ключевые слова: солеустойчивость яровой пшеницы, морфометрические параметры проростков, метиловобактерии, фитогормоны, пигменты.

Засоление почв представляет собой важную проблему в агропромышленном производстве. Одним из наиболее эффективных направлений защиты посевов от засухи является усиление естественной засухо- и солеустойчивости сельскохозяйственных растений за счет предпосевной обработки семян микробными биопрепаратами. Изучение фитосимбиотических отношений аэробных метилотрофных бактерий с растениями показало, что продукты метаболизма растений (метан, метанол, метиламины) используются бактериями для роста. У метилотрофных бактерий, выделенных с растений засоленных почв (г. Соликамск, Пермский край), *Methylophaga* sp. M1k и *Paracoccus* sp. M7 была обнаружена способность к синтезу фитогормона — ауксина при добавлении в культуральную среду L-триптофана (достигая значений 10 и 70 мкг/мл для M7 и M1k соответственно). Проведенные эксперименты показали, что при обработке семян препаратами галотолерантных метилотрофных бактерий, стимулируются ростовые процессы и синтез растительных пигментов. Было отмечено, что при 0,5–1,0 % NaCl увеличивается масса корней в 2–3 раза для *Paracoccus* sp. M7. Культуры *Methylophaga* sp. M1k и *Paracoccus* sp. M7 стимулировали синтез хлорофиллов, суммарное содержание пигментов по отношению к контрольным образцам увеличивалось до 1,9 и 1,5 раз соответственно. Бактериальный препарат *Paracoccus* sp. M7 частично снимает отрицательное действие повышенной концентрации соли на развитие проростков по отношению к массе корневой части и длине побега, которое наблюдается в контрольных вариантах. Развитие листовой части растений, вероятно, стимулируется бактериальным синтезом фитогормона ауксина, чей синтез исследуемыми культурами экспериментально подтвержден. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования данных культур для создания биопрепарата — стимулятора роста растений на засоленных почвах.

APPLICATION OF ASSOCIATIVE METHYLOTROPHIC BACTERIA IN AGROTECHNOLOGY AS A WHEAT GROWTH STIMULATOR IN SALT-AFFECTED SOILS

D. Y. SHARAVIN,

graduate student,

N. P. KOVALEVSKAYA,

candidate of biological sciences, junior researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

(13 Golev Str., 614081, Perm; tel: +7 (902) 477-20-24; e-mail: dima-sharavin@yandex.ru)

Keywords: spring wheat salt tolerance, morphometric parameters of seedlings, methylobacteria, phytohormones, pigments.

Soil salinization is one of the major issues in agricultural production. Enhancement of natural drought and salt resistance of crops due to microbial fertilizer presowing treatment is one of the most effective methods of crops protecting from drought and salinization. Study of phytosymbiotic interactions of aerobic methylotrophic bacteria and plants showed that the products of plant metabolism (methane, methanol, methylamines) are used for the growth of bacteria. *Methylophaga* sp. M1k and *Paracoccus* sp. M7 are methylotrophic bacteria isolated from plants of saline soils (Solikamsk city, Perm region), were able to synthesize phytohormone — auxin with the L-tryptophane in culture medium (reaching values of 10 and 70 µg/ml for M7 and M1k respectively). Experiments showed that seed treatment with halotolerant methylotrophic bacteria stimulates growth processes and synthesis of plant pigments. It was noted that at 0.5–1.0 % NaCl the weight of root increases of 2–3 fold *Paracoccus* sp. M7. *Methylophaga* sp. M1k and *Paracoccus* sp. M7 strain induced synthesis of chlorophylls, the total pigment content versus control samples increased up to 1.9 and 1.5 times respectively. Bacterial drug *Paracoccus* sp. M7 partly removes the negative effects of increased salt concentration on seedling development in relation to the weight of root and shoots length, which is observed in the control embodiments. The development of the plant leaf, probably stimulated by bacterial synthesis of the phytohormone auxin synthesis whose cultures studied experimentally confirmed. Received data suggest the possibility of using these bacterial strains for creation of biofertilizer — plant growth promoter in the saline soils.

Положительная рецензия представлена О. З. Еремченко, доктором биологических наук, профессором Пермского государственного национального исследовательского университета.

Из 222 млн га сельскохозяйственных земель России площадь засоленных почв (солончаки, солончаковатые почвы и солонцы) составляет около 54 млн га [1]. Известно, что повышение минерализации почвы пагубно влияет на сельскохозяйственные растения, снижая урожайность или делая не пригодными к возделыванию засоленные участки почв. Повышение продуктивности среднесолеустойчивых злаковых культур, таких как рожь, пшеница, овес, рис, кукуруза связано с разработкой агротехнологий с использованием микробных биопрепаратов. Биопрепараты в последнее время приобретают все большую популярность в растениеводстве. Они увеличивают урожайность, сокращают сроки созревания, повышают питательную ценность зерна и устойчивость ко многим вредоносным заболеваниям, а также к заморозкам, засухе и другим неблагоприятным факторам внешней среды. К настоящему моменту выделено большое количество бактерий, которые обладают одним или несколькими свойствами, позволяющими в определенных условиях стимулировать рост и развитие растений. Некоторые из этих бактерий могут напрямую влиять на рост растений, например, продуцируя фитогормоны или потребляя питательные вещества из почвы. Другие бактерии могут косвенно влиять на рост растений путем подавления роста фитопатогенов [2]. В районе солончальных на территории Верхнекамского месторождения калийных солей (Пермский край) за последние десятилетия сформировались участки почвы с высоким содержанием солей. Ранее проведенные исследования выявили, что в зонах засоления произрастают представители различных семейств растений: *Asteraceae*, *Poaceae*, *Plantaginaceae*, *Fabaceae*, *Chenopodiaceae* и др., в том числе такие солеустойчивые виды как *Suaeda prostrata* Pall. (Сведа простертая), *Plantago maritima* L. (Подорожник морской) и др. [3]. Образование растениями большого количества C₁-соединений, прежде всего метанола, создает предпосылки постоянной метаболической взаимосвязи с ними метилобактерий.

Цель и методика исследований.

Целью эксперимента являлось изучение влияния штаммов галотолерантных метилотрофных бактерий, выделенных с растений засоленных почв, на прорастание семян и развитие проростков пшеницы в условиях засоления.

В качестве объекта исследования была взята яровая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта Горноуральская. Для получения накопительных культур метилотрофных бактерий были использованы образцы филло- и ризосферы, отобранные в районе техногенного засоления (Верхнекамское месторождение калийных солей, г. Соликамск, Пермский край). Культивирование метилотрофных бактерий проводили на жидкой среде Гальченко с добавлением 5 % NaCl и 1 % метанола [4]. Бактериальные препараты концентрировали центрифугированием, отмывали физиологическим раствором от метаболитов и доводили до оптической плотности 0,2 на спектрофотометре Cary 100 (Agilent Technologies, США) при 590 нм. Семена стерилизовали в 1 % растворе KMnO₄ в течение 5 минут и помещали в стерильные стеклянные стаканы с крышкой из фольги (по 10 шт./стакан) с 1,0 мл бактериальной суспензии в солевом растворе (0,5 или 1,0 % NaCl). Контрольные образцы

семян в солевом растворе не содержали микробных препаратов. После 6-ти дневной инкубации образцов при 25 °С оценивали морфометрические параметры проростков. Суммарное содержание хлорофиллов и каротиноидов в 6-ти дневных проростках измеряли спектрофотометрическим методом в 80 %-ных ацетоновых экстрактах по стандартной методике на спектрофотометре [5].

Содержание микробной индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) определяли методом Сальковского (0,05M FeCl₃ в 35 % HClO₄ при 540 нм) при добавлении в культуральную среду L-триптофана по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов ИУК [6, 7].

Результаты исследований.

Из образцов филло- и ризосферы растений, произрастающих в зоне техногенного засоления почвы около солончальных, были выделены солеустойчивые метилотрофные бактерии. Ранее было показано, что культуры галотолерантных метилобактерий, ассоциированные с солеустойчивыми растениями, положительно влияют на динамику синтеза фотосинтетических пигментов, ускоряя адаптацию злаков в условиях солевого стресса [3]. Изучение физико-химических характеристик выделенных метилобактерий классическими микробиологическими методами и генотипирование штаммов позволили классифицировать новых солеустойчивых представителей родов *Methylophaga* sp. штамм M1к (оптимум роста 3 % NaCl) и *Paracoccus* sp. штамм M7 (оптимум 2 % NaCl). В растущей культуре метилотрофов при начальной численности клеток 1×10^7 мл⁻¹ синтез ИУК начинался спустя двое суток с момента добавления в среду L-триптофана. Наибольшая интенсивность синтеза ИУК у исследуемых бактерий наблюдалась в логарифмической фазе роста и составляла 10 и 70 мкг/мл для бактерий *Paracoccus* sp. M7 и *Methylophaga* sp. M1к, соответственно.

Результаты эксперимента по обработке семян бактериальными препаратами показали, что штамм *Paracoccus* sp. M7 оказывает устойчивое стимулирующее действие на ростовые процессы пшеницы сорта Горноуральская в раннем онтогенезе при 0,5 % NaCl, о чем свидетельствуют достоверные различия между опытным вариантом и контролем по таким морфометрическим параметрам как длина и масса побега и корня (рис. 1–2). При обработке семян бактериальным препаратом *Paracoccus* sp. M7 было отмечено увеличение длины побегов и корней соответственно в 1,5 и 5,4 раза для 0,5 % NaCl, а для 1,0 % NaCl в 1,2 и 1,5 раза. В то время как для препарата *Methylophaga* sp. M1к установлено превышение контрольных значений в 2,8 раза только для корневой системы растений при 0,5 % NaCl. В структуре биомассы проростков, выращенных из семян, обработанных препаратами солеустойчивых бактерий, соотношение массы побегов и корней составляло 50/50 как для 0,5 %, так и 1,0 % у *Methylophaga* sp. M1к, а для *Paracoccus* sp. M7 33/66 для 0,5 % и 26/74 для 1,0 %. В контрольном варианте это соотношение составляло 47/53 и 57/43 для 0,5 % и 1,0 % NaCl соответственно. Примечательно, что в обработанных препаратом *Paracoccus* sp. M7, проростках масса корней больше чем в контрольных вариантах в 2–3 раза (в зависимости от концентрации соли), однако, отличия по массе проростков — менее значительны (до

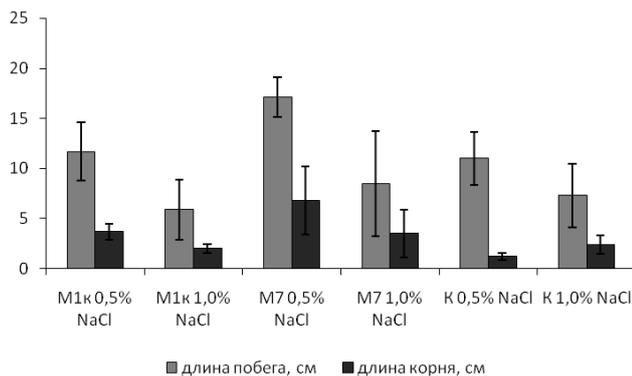


Рисунок 1
Влияние бактериальных препаратов *Methylophaga* sp. М1к и *Paracoccus* sp. М7 на длину побегов и корней проростков пшеницы сорта Горноуральская. Различия по сравнению с контролем значимы при $p < 0,05$

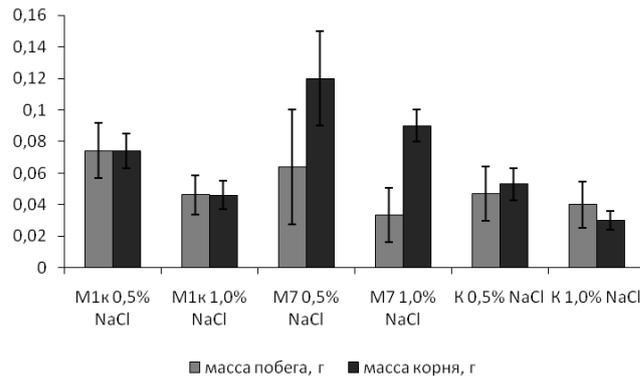


Рисунок 2
Влияние бактериальных препаратов *Methylophaga* sp. М1к и *Paracoccus* sp. М7 на массу побегов и корней проростков пшеницы сорта Горноуральская. Различия по сравнению с контролем значимы при $p < 0,05$

Таблица 1

Влияние бактериальных препаратов *Methylophaga* sp. М1к и *Paracoccus* sp. на концентрацию хлорофиллов и каротиноидов в проростках пшеницы (в мг/г сырой массы). Различия по сравнению с контролем значимы при $p < 0,05$

Штамм	NaCl, %	ХЛ	КАР	ХЛ и КАР	О/К, %
<i>Methylophaga</i> sp. М1к	0,5	0,087 ± 0,016	0,020 ± 0,002	0,107	124
	1,0	0,079 ± 0,030	0,020 ± 0,006	0,099	194
<i>Paracoccus</i> sp. М7	0,5	0,103 ± 0,024	0,024 ± 0,006	0,125	145
	1,0	0,046 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,058	113
Контроль	0,5	0,064 ± 0,047	0,022 ± 0,017	0,086	—
	1,0	0,038 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,051	—

Примечание: ХЛ и КАР, суммарная концентрация хлорофиллов и каротиноидов, соответственно; О/К — % содержание пигментов в опыте от контроля.

1,4 раза). Данная тенденция, хоть и менее выражено, прослеживается также для растений, обработанных культурой *Methylophaga* sp. М1к (до 1,5 раз для массы корневой системы), тем не менее, было отмечено превышение контрольных значений массы листовой части в 1,6 раза при 0,5 % NaCl. Данное увеличение массы побегов, возможно, было вызвано бактериальным синтезом фитогормона ауксина, который стимулирует развитие растений.

Анализ суммарных концентраций пигментов в проростках пшеницы показал, что адаптация растений к определенному солевому режиму отражается в их пигментном содержании (табл. 1). Количество хлорофиллов в листьях проростков, во всех исследуемых образцах значительно превышало содержание каротиноидов. В проростках пшеницы, обработанных исследуемыми культурами *Methylophaga* sp. М1к и *Paracoccus* sp. М7 при 0,5 % NaCl выявлено увеличение количества хлорофиллов по отношению к контролю в 1,35 и 1,6 раза, соответственно. Обработка проростков микробными препаратами М1к и М7 при 1,0 % NaCl также выявила отличия по содержанию пигментов от контрольных образцов в 2,0 и 1,2 раза, соответственно. Содержание каротиноидов в исследуемых и контрольных образцах при повышении концентрации NaCl практически не изменялось. Наибольшее суммарное содержание пигментов было обнаружено при обработке проростков *Methylophaga* sp. М1к, 194 % по отношению к контролю.

Выводы. Рекомендации.

1. Предобработка семян бактериальным препаратом *Paracoccus* sp. М7 является перспективным приемом для стимуляции роста пшеницы в условиях засоления.

2. Бактериальный препарат *Paracoccus* sp. М7 частично снимает отрицательное действие повышенной концентрации соли на развитие проростков по отношению к массе корневой части, и длине побега, которое наблюдается в контрольных вариантах. Развитие листовой части растений, вероятно, стимулируется бактериальным синтезом фитогормона ауксина, чей синтез исследуемыми культурами экспериментально подтвержден.

3. Обработка семян пшеницы бактериальными препаратами галотолерантных метилотрофных бактерий в условиях засоления увеличивает синтез хлорофиллов в листовой части растений. При концентрации соли 0,5 % наибольший синтез наблюдался при использовании штамма *Paracoccus* sp. М7 (145 % от контроля), а при 1,0 % — *Methylophaga* sp. М1к (194 % от контроля).

4. Бактериальный препарат *Paracoccus* sp. М7 показал более стабильные показатели по стимулирующему действию на ростовые процессы пшеницы в раннем онтогенезе при солевом стрессе, чем бактериальный препарат *Methylophaga* sp. М1к.

Работа выполнена при поддержке программы «УМНИК».



Литература

1. Лопатовская О. Г. Мелиорация почв. Засоленные почвы : учеб. пособие. Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. 101 с.
2. Троценко Ю. А., Доронина Н. В., Торгонская М. Л. Аэробные метиловобактерии. Пущино : ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
3. Шаравин Д. Ю., Ковалевская Н. П. Взаимодействие галотолерантных метилотрофных бактерий с растениями в условиях солевого стресса // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. № 4/1 (38). С. 119–120.
4. Гальченко В. Ф. Метанотрофные бактерии. М. : ГЕОС. 2001. 500 с.
5. Sohrabi Y., Heidari G., Weisany W., Golezani K. G., Mohammadi K. Changes of antioxidative enzymes, lipid peroxidation and chlorophyll content in chickpea types colonized by different *Glomus* species under drought stress // Symbiosis. 2012. № 56. P. 5–18.
6. Gordon S. A., Weber R. P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid // Plant Physiol. 1951. № 26. P. 192–195.
7. Gogleva A. A., Kaparullina E. N., Doronina N. V., Trotsenko Y. A. *Methylobacillus arboreus* sp. nov., and *Methylobacillus gramineus* sp. nov., novel non-pigmented obligate methylotrophic bacteria associated with plants // Syst. and Appl. Microbiol. 2011. № 34. P. 477–481.

References

1. Lopatovskaya O. G. Soil melioration. Saline soils : study guide Irkutsk : Irkutsk SU, 2010. 101 p.
2. Trotsenko Y. A., Doronina N. V., Torgonskaya M. L. Aerobic methylobacteria. Pushchino : ONTI PSC RAS, 2010. 325 p.
3. Sharavin D. Y., Kovalevskaya N. P. Methylotrophic bacteria interaction with plants under salt stress // Bulletin of Ural medical academic science. 2011. № 4/1 (38). P. 119–120.
4. Galchenko V. F. Methanotrophic bacteria. M. : GEOS. 2001. 500 p.
5. Sohrabi Y., Heidari G., Weisany W., Golezani K. G., Mohammadi K. Changes of antioxidative enzymes, lipid peroxidation and chlorophyll content in chickpea types colonized by different *Glomus* species under drought stress // Symbiosis. 2012. № 56. P. 5–18.
6. Gordon S. A., Weber R. P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid // Plant Physiol. 1951. № 26. P. 192–195.
7. Gogleva A. A., Kaparullina E. N., Doronina N. V., Trotsenko Y. A. *Methylobacillus arboreus* sp. nov., and *Methylobacillus gramineus* sp. nov., novel non-pigmented obligate methylotrophic bacteria associated with plants // Syst. and Appl. Microbiol. 2011. № 34. P. 477–481.