



УДК 581.1.

ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН И СОСТОЯНИЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА НИХ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM*

ЕРОФЕЕВА

Елена Александровна

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, ННГУ, корп. 1, кафедра экологии, ele77785674@yandex.ru

РЕЧКИН

Александр Иванович

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, ННГУ, корп. 1, кафедра экологии, re-ka@mail

САВИНОВ

Александр Борисович

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, ННГУ, корп. 1, кафедра экологии, sabcor@mail.ru

Ключевые слова:

Azotobacter
Triticum aestivum
пигмент
липопероксидация
рост
всхожесть семян

Аннотация: В настоящее время способность различных штаммов *Azotobacter* вступать в симбиоз с пшеницей мягкой и влиять на развитие этого вида изучена недостаточно. В связи с этим нами была оценена способность штамма № 4 *A. chroococcum*, выделенного из почвы сельскохозяйственных угодий Нижегородской области (Россия), влиять на всхожесть семян и состояние проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при внесении в первый день эксперимента в питательный раствор различных количеств клеток (от 109 кл/мл (А) до А/256). Все концентрации клеток, кроме наименьшей, вызывали снижение всхожести семян. Низкие концентрации (А/256-А/64) не влияли на биомассу корня проростков, средние концентрации (А/32-А/16) ее увеличивали. При высокой концентрации (А/8) эффект исчезал, а наиболее высокие (А/4-А) вновь повышали этот показатель. В отношении биомассы побега стимулирующий эффект оказывали только концентрации А/2 и А/4. Содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также интенсивность липопероксидации при действии *A. chroococcum* не изменялись. Таким образом, изученный штамм способен регулировать прорастание семян и рост корневой системы и побега *T. aestivum*.

© Петрозаводский государственный университет

Получена: 07 ноября 2018 года

Подписана к печати: 17 июня 2019 года

Введение

Бактерии рода *Azotobacter* относятся к свободноживущим азотфиксаторам почвы (ризобактериям) и способны, как и клубеньковые бактерии растений (ризобии), с помощью нитрогеназного комплекса фиксировать молекулярный азот воздуха, превращая его в ион аммония (Howard, Rees, 2006; Wani et al., 2013; Феоктистова и др., 2016). Бактерии рода *Azotobacter* населяют экторизосферу (зона почвы с наружной стороны корня) и ризоплану (поверхность корневой системы) различных видов небобовых растений, используя экссудаты корневой системы для питания. В обмен растение получает азот в виде доступных для усвоения соединений, улучшается фосфорное питание растений благодаря растворению труднодоступных почвенных фосфатов в процессе жизнедеятельности ризобактерий, фитогормоны, вырабатываемые ризобактериями, стимулируют рост растений, бактерии рода *Azotobacter* подавляют развитие фитопатогенных грибов и бактерий (Феоктистова и др., 2016). Способность разных штаммов *Azotobacter chroococcum* Beijer. влиять на прорастание семян и развитие проростков различных видов растений изучена недостаточно (Кириченко и др., 2010). Хотя в настоящее время этому вопросу уделяется значительное внимание в связи с поиском эффективных штаммов этого вида с целью использования их для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур (Кириченко, Коць, 2011). Имеются сведения о том, что некоторые штаммы *A. chroococcum* способны вступать в симбиотические отношения с пшеницей мягкой (*Triticum aestivum* L.) (Кириченко, 2016). Однако подобные данные для штаммов *A. chroococcum* почв Нижегородской области являются фрагментарными, в том числе и для выделенного нами из почвы сельскохозяйственных угодий Нижегородского региона штамма № 4. Известно, что бактерии рода *Azotobacter* образуют ассоциации с пектинолитическими и целлюлозоразрушающими бактериями рода *Bacillus*, потребляя продукты разложения полимеров бациллами, снабжая их фиксированным азотом, что приводит к ускорению усвоения полимеров и стимуляции азотфиксации (Феоктистова и др., 2016). В связи с этим при изучении способности *A. chroococcum* непосредственно воздействовать на состояние растений более объективные данные можно получить в условиях эксперимента при

культивировании растений на питательном растворе, поскольку таким образом можно выделить взаимодействие в системе «растение – *A. chroococcum*» в чистом виде, т. е. без участия других видов почвенных бактерий.

В связи с этим нами впервые была оценена способность штамма № 4 *A. chroococcum*, выделенного из почвы сельскохозяйственных угодий Нижегородской области (Россия), влиять на всхожесть семян и состояние проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при внесении в первый день эксперимента в питательный раствор различных количеств клеток в широком диапазоне значений (от 10^9 кл/мл (А) до А/256).

Материалы

Штамм № 4 *A. chroococcum* был выделен из почвы пахотных земель возле с. Оранки Богородского района Нижегородской области. *A. chroococcum* культивировали на жидкой питательной среде Эшби. В эксперименте использовали семена озимой пшеницы Московская 39.

Методы

Для исследования были выбраны 9 концентраций бактериальных клеток от 10^9 кл/мл (А) до значений, на несколько порядков меньших (А/256) (соседние концентрации различались в 2 раза), поскольку наибольшие исследованные нами концентрации клеток *A. chroococcum* используют для инокуляции семян пшеницы другими штаммами этого вида (Кириченко, 2016). Растения выращивали в течение 8 дней на питательном растворе Кнопа с разным содержанием клеток *A. chroococcum* (опытные группы) или растворе Кнопа (контрольная группа). В чашки опытных групп раствор Кнопа с добавлением *A. chroococcum* вносили только в первый день эксперимента. Далее каждый день добавляли раствор Кнопа во все чашки (контрольные и опытные) без клеток азотфиксатора. Семена пшеницы, раствор Кнопа и чашки Петри не стерилизовали, для того чтобы определить, оказывает ли данный штамм влияние на изучаемые показатели пшеницы в нестерильных условиях, т. к. на практике обработка семян сельскохозяйственных культур различными штаммами *A. chroococcum* проводится перед посевом в почву, что исключает условия стерильности. В каждой группе растения выращивали в 5 чашках Петри (50 семян в каждой чашке) на подложке из фильтровальной бумаги,

смоченной раствором, при 17 ч световом периоде и температуре 17–22 °С.

У семидневных проростков в первом листе определяли интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), уровень хлорофиллов и каротиноидов, а также сырую биомассу корневой системы и побега, всхожесть семян. При изучении биохимических показателей в каждой группе было 10 биологических повторностей (1 биологическая повторность – объединенные фрагменты первого листа 5–6 разных растений данной группы; брали по 2 биологические повторности из каждой чашки). Биомассу корневой системы и побега определяли у 30 растений каждой группы (брали по 6 растений из каждой чашки; 6 растений × 5 чашек = 30). Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов липопероксидации, среди которых наиболее массовым является малоновый диальдегид (МДА) (Камышников, 2002). Содержание хлорофиллов и каротиноидов в листе определяли согласно общепринятой методике, для экстрагирования пигментов использовали 80 % ацетон (Шлык, 1971).

Соответствие распределения в выборках изученных количественных признаков нормальному определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка (программа Statistica 10). Поскольку в некоторых выборках распределение отличалось от нормального ($p < 0.05$), то для проверки нулевой гипотезы были использованы непараметрические критерии Крускала – Уоллиса и Ньюмена – Кейлса (программа Биостатистика 4.03). Аналогичную процедуру для качественного признака (всхожесть семян) проводили с помощью критерия хи-квадрат (Биостатистика 4.03) с учетом поправки Бонферрони для множественных парных сравнений. На графиках представлены выборочные медианы и их ошибки (количественные признаки), а также доли и их ошибки (всхожесть семян).

Результаты

Все концентрации изученного штамма *A. chroococcum*, за исключением наименьшей, приводили к снижению всхожести семян *T. aestivum* на 14–30 % по сравнению с контролем ($p < 0.05$) (рис. 1).

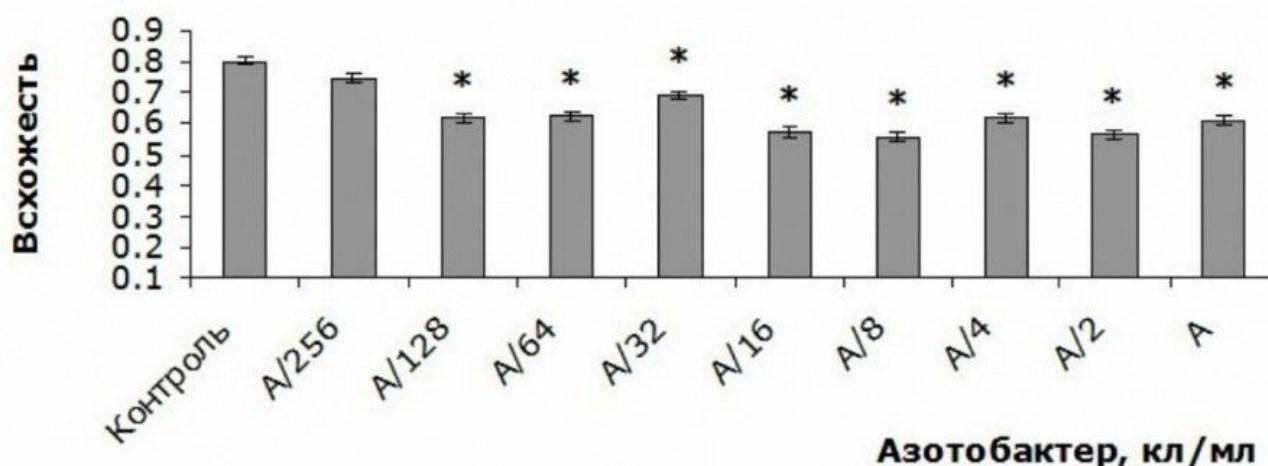


Рис. 1. Всхожесть семян *T. aestivum* при внесении различных количеств клеток *A. chroococcum* в питательный раствор в первый день эксперимента (доля ± ошибка доли): * – статистически значимые различия по сравнению с данным показателем в контрольной группе при $p < 0.05$; А – 10^9 кл/мл

Fig. 1. *T. aestivum* seed germination when adding different amounts of *A. chroococcum* cells to nutrient solution in the first day of the experiment (share ± share error): * – indicates statistically significant differences compared to this indicator in the control group at $p < 0.05$; А – 10^9 c/мл

При этом статистически значимые различия между эффектами разных концентраций не были выявлены ($p > 0.05$).

Низкие концентрации *A. chroococcum* (A/256–A/64) не влияли на массу корневой системы (рис. 2а). Концентрации A/16–A/32 увеличивали данный показатель на 34–38

% относительно контрольного уровня. Однако дальнейшее повышение концентрации до A/8 приводило к исчезновению эффекта. Наиболее высокие концентрации *A. chroococcum* A/4–A вновь увеличивали массу корня проростков *T. aestivum* (на 50–68 % относительно контроля) (см. рис. 2а).

Динамика изменения биомассы побега *T. aestivum* при уменьшении концентрации *A. chroococcum* была очень сходна с изменением данного показателя у корневой системы, о чем свидетельствует сильная положительная корреляция между этими параметрами (по Спирмену: $r = 0.86$; $p < 0.05$). Однако стимулирующий эффект был менее выражен, поэтому его удалось зафиксировать только для концентраций А/2 и А/4. Они приводили к увеличению биомассы побега на 21 и 30 % по сравнению с контролем соответственно. Более низкие концентрации и наиболее высокая из изученных концентраций не влияли на данный показатель (рис. 2б).

Интенсивность перекисного окисления липидов в листе проростков пшеницы при действии всех изученных концентраций *A. chroococcum* не отличалась от контрольного уровня ($p > 0.05$) (данные на рисунках не представлены). Содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений всех опытных групп соответствовало контрольному уровню ($p > 0.05$) (данные на рисунках не представлены).

Обсуждение

Ранее другими авторами показано, что бактерии рода *Azotobacter* способны стимулировать рост корневой системы и побега растений (Феоктистова и др., 2016). Полагают, что ризобактерии, в том числе рода *Azotobacter*, оказывают такой эффект путем синтеза фитогормонов, стимулирующих рост (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов) и улучшения азотного и фосфорного питания растений (Феоктистова и др., 2016). Возможно, данный механизм лежит и в основе обнаруженного нами стимулирующего эффекта бактерий в отношении роста пшеницы.

Известно, что в сухом семени в большом количестве находится фитогормон индолил-3-уксусная кислота, которая в высокой концентрации вместе с абсцизовой кислотой семян ингибирует прорастание (Нефедьев и др., 2013). Бактерии рода *Azotobacter* способны синтезировать ауксины, в том числе индолил-3-уксусную кислоту (Феоктистова и др., 2016). Скорее всего, выявленный нами ингибирующий эффект азотфиксирующих бактерий в отношении прорастания семян пшеницы обусловлен действием вырабатываемых ими ауксинов.

Следует отметить, что изменение биомассы побега и корневой системы, выявленное нами у проростков *T. aestivum* при внесении

в питательный раствор различных концентраций клеток *A. chroococcum*, было немонотонным, поскольку наибольшая из исследованных концентраций не влияла на биомассу побега, затем данный эффект появлялся у концентраций А/2-А/4 и исчезал у более низких количеств бактериальных клеток. Биомасса корневой системы также претерпевала немонотонное изменение при снижении концентрации клеток *A. chroococcum*: концентрации А-А/4 увеличивали биомассу, А/8 не влияла, А/16-А/32 увеличивали, А/64-А/256 не влияли (см. рис. 2).

В последние годы широкое распространение получили взгляды о том, что у биосистем широко представлены немонотонные ответы при действии разных факторов среды (Calabrese, Blain, 2005). Так, например, ранее нами установлено, что различные химические загрязнители могут достаточно часто приводить к немонотонным изменениям морфологических и физиолого-биохимических показателей у разных видов растений (Ерофеева, 2014). Подобные данные имеются и для фитогормонов растений, в том числе ауксинов. Показано, что они могут вызывать разнонаправленный эффект либо не оказывать его, в результате чего зависимость «доза – эффект» является немонотонной (Weyers, Paterson, 2001; Calabrese, Blain, 2005).

Известно, что любые стрессовые факторы среды вызывают увеличение продукции активных форм кислорода, что приводит к усилению процесса перекисного окисления в мембранах клеток (Камышников, 2002). На основании наших данных можно сделать вывод, что использованные концентрации *A. chroococcum* не вызывали стрессового состояния у проростков пшеницы.

Заключение

На основе вышесказанного можно заключить, что изученный штамм *A. chroococcum* способен непосредственно влиять на всхожесть семян и состояние проростков *T. aestivum*. Однако его способность изменять изученные показатели *T. aestivum* зависит от количества клеток азотфиксатора, внесенных в питательный раствор, а также от вида показателя. Так, *A. chroococcum* во всех изученных концентрациях не влиял на биохимические параметры (интенсивность перекисного окисления липидов и содержание хлорофиллов и каротиноидов в листе), снижал всхожесть семян и приводил к увеличению биомассы

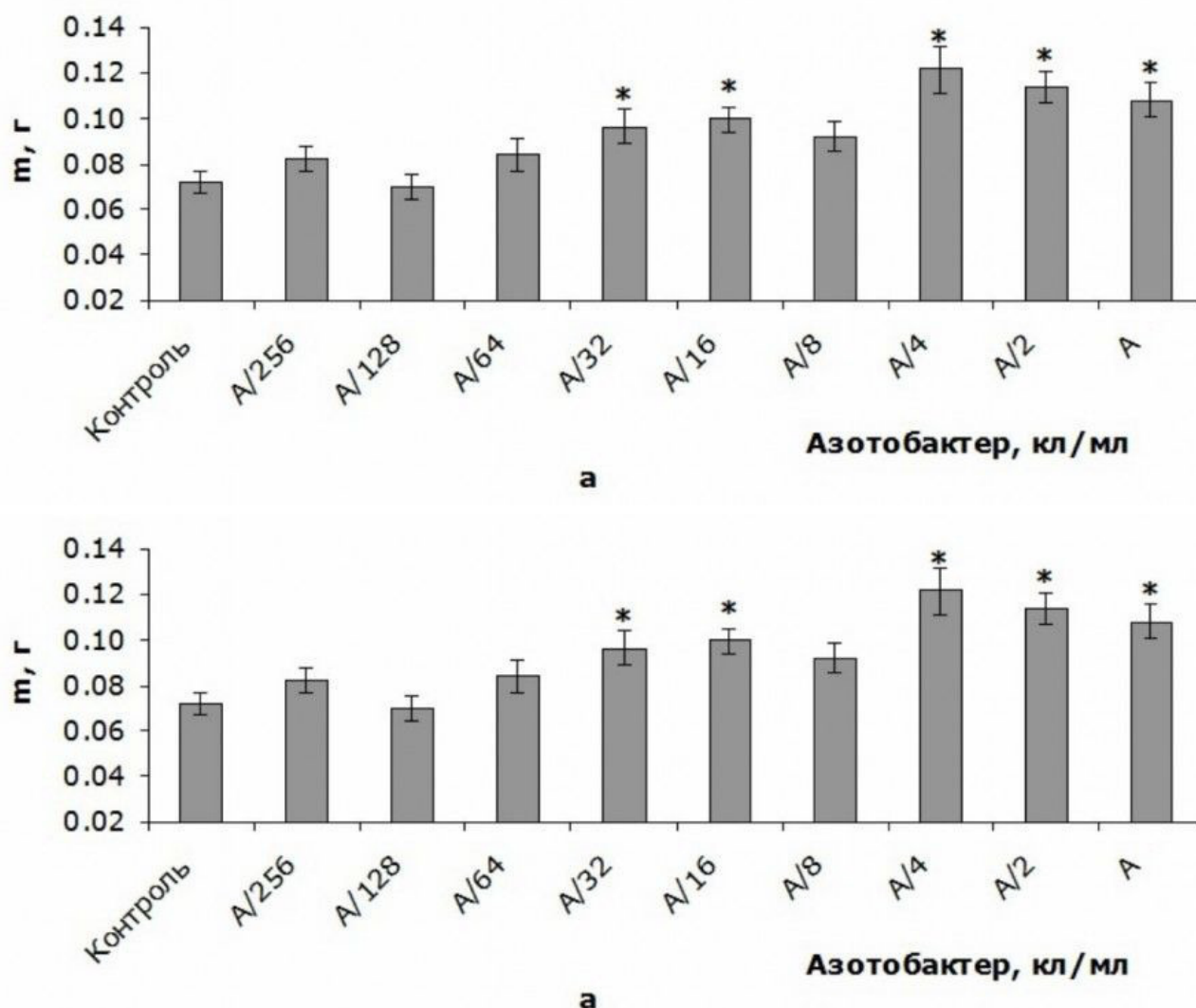


Рис. 2. Сырая биомасса корневой системы (а) и побега (б) *T. aestivum* при внесении различных количеств клеток *A. chroococcum* в питательный раствор в первый день эксперимента ($\text{Me} \pm \text{SMe}$): * – статистически значимые различия по сравнению с данным показателем в контрольной группе при $p < 0.05$; А – 109 кл/мл

Fig. 2. Raw biomass of root system (a) and shoot (b) of *T. aestivum* with adding of different amounts of *A. chroococcum* cells to nutrient solution in the first day of the experiment ($\text{Me} \pm \text{SMe}$): * – indicates statistically significant differences compared to this indicator in the control group at $p < 0.05$; A – 109 c/ml

проростков. При этом изменение концентрации клеток *A. chroococcum*, вносимых в питательный раствор, вызывало немонотонный ответ для сырой биомассы побега и корневой системы *T. aestivum*. По-видимому, эффекты в отношении всхожести и биомассы преимущественно связаны с воздействием ауксинов, синтезируемых азотфиксатором, поскольку данные фитогормоны способны

стимулировать рост и тормозить процесс прорастания. Кроме того, известно, что зависимость «доза – эффект» для ауксинов может быть немонотонной. Результаты исследования могут послужить основой для развития представлений о специфике биотических отношений между изученными видами, а также совершенствования методов предпосевной обработки семян *T. aestivum*.

Библиография

- Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике . Минск: Беларусь, 2002. Т. 2. 495 с.
- Кириченко Е. В. Биологическая активность ризосферной почвы пшеницы яровой в ассоциации с бактериями *Azotobacter chroococcum* T79, модифицированными N-ацетил-D-глюкозамином // Мікробіологія і біотехнологія. 2016. № 3. С. 30–42.
- Кириченко Е. В., Коць С. Я. Использование *Azotobacter chroococcum* для создания комплексных биологических препаратов // Биотехнологія. 2011. Т. 4. № 3. С. 74–81.
- Кириченко Е., Титова Л., Коць С. Эффективность бактеризации семян пшеницы яровой новым штаммом *Azotobacter chroococcum* T76 // **Stiinta Agricola**. 2010. **№ 1**. С. 21–24.
- Нефедьева Е. Э., Белопухов С. Л., Верхотуров В. В., Лысак В. И. Роль фитогормонов в регуляции прорастания семян // Известия вузов. Прикладная биохимия и биотехнология. 2013. № 1. С. 61–65.
- Феоктистова Н. В., Марданова А. М., Хадиева Г. Ф., Шарипова М. Р. Ризосферные бактерии // Ученые записки Казанского университета. Сер. Естественные науки. 2016. Т. 158. Кн. 2. С. 207–224.
- Шлык А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154–170.
- Calabrese E. J., Blain R. B. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview // Toxicology and Applied Pharmacology. 2005. Vol. 202. P. 1451–1474.
- Erofeeva E. A. Hormesis and paradoxical effects of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) parameters upon exposure to different pollutants in a wide range of doses // Dose Response. 2014. Vol. 12. No 1. P. 121–135.
- Howard J. B., Rees D. C. **How many metals does it take to fix N₂? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation** // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006. Vol. 103. No 46. P. 17088–17093.
- Wani S. A., Chand S., Ali T. Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production // Current Agriculture Research Journal. 2013. Vol. 1. No 1. P. 35–38.
- Weyers J. D., Paterson N. W. Plant hormones and the control of physiological processes // New Phytol. 2001. Vol. 152. P. 375–407.

SEED GERMINATION AND SEEDLING STATE OF WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* WHEN EXPOSED TO *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* CELL SUSPENSION

EROFEEVA
Elena Alexandrovna

Lobachevski State University of Nizhny Novgorod,
ele77785674@yandex.ru

RECHKIN
Alexander Ivanovich

Lobachevski State University of Nizhny Novgorod, re-ka@mail

SAVINOV
Alexander Borisovich

Lobachevski State University of Nizhny Novgorod, sabcor@mail.ru

Key words:

Azotobacter
Triticum aestivum
pigment
lipid peroxidation
growth
seed germination

Summary: To date, the ability of various *Azotobacter* strains to enter into symbiosis with the wheat and regulate its development has not been studied enough. In this regard, we assessed the capacity of strain No. 4 of *Azotobacter chroococcum* isolated from the soil of agricultural land in Nizhny Novgorod region (Russia) to influence the seed germination and the state of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) when various quantities of cells were introduced into the nutrient solution (from 109 cells/ml (A) to A/256) in the first day of the experiment. It was stated that all cell concentrations except for the smallest one caused reduced seed germination. Low concentrations (A/256-A/64) did not affect the wet biomass of seedlings root; medium ones A/32-A/16 increased it. At high concentrations A/8 the effect disappeared, and the highest concentrations A/4-A again increased this parameter. As for the wet shoot biomass, a stimulating effect was caused only by the concentrations A/2 and A/4. Chlorophyll and carotenoids content, as well as the intensity of lipid peroxidation did not change under the action of *A. chroococcum*. Thus, the studied strain of *A. chroococcum* is capable of regulating the germination of seeds and the growth of the root system and shoots of *T. aestivum*.

Received on: 07 November 2018

Published on: 17 June 2019

References

- Erofeeva E. A. Hormesis and paradoxical effects of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) parameters upon exposure to different pollutants in a wide range of doses, Dose Response. 2014. Vol. 12. No 1. P. 121–135.
- Feoktistova N. V. Mardanov A. M. Hadieva G. F. Sharipova M. R. Rhizosphere bacteria, Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Ser. Estestvennye nauki. 2016. T. 158. Kn. 2. P. 207–224.
- Howard J. B., Rees D. C. [How many metals does it take to fix N₂? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation](#), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006. Vol. 103. No 46. P. 17088–17093.
- Kamyshnikov V. S. Reference book on clinical and biochemical laboratory diagnostics. Minsk: Belarus', 2002. T. 2. 495 p.
- Kirichenko E. Titova L. Koc' S. The bacterization effectiveness of spring wheat seeds with a new strain of *Azotobacter chroococcum* T76, [Stiinta Agricola](#). 2010. No. 1. P. 21–24.
- Kirichenko E. V. Koc' S. Ya. The use of *Azotobacter chroococcum* to create complex biological preparations, Biotehnologiya. 2011. T. 4. No. 3. P. 74–81.
- Kirichenko E. V. Biological activity of spring wheat rhizosphere soil in association with *Azotobacter chroococcum* T79 bacteria modified with N-acetyl-D-glucosamine, Mikrobiologiya i biotehnologiya. 2016. No. 3. P. 30–42.
- Nefed'eva E. E. Belopuhov S. L. Verhoturov V. V. Lysak V. I. The role of phytohormones in the regulation of seed germination, Izvestiya vuzov. Prikladnaya biokhimiya i biotehnologiya. 2013. No. 1. P. 61–65.
- Salabrese E. J., Blain R. B. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the

- hormesis database: an overview, Toxicology and Applied Pharmacology. 2005. Vol. 202. P. 1451–1474.
- Shlyk A. A. Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaf extracts, Biohimicheskie metody v fiziologii rasteniy. M.: Nauka, 1971. P. 154–170.
- Wani S. A., Chand S., Ali T. Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production, Current Agriculture Research Journal. 2013. Vol. 1. No 1. P. 35–38.
- Weyers J. D., Paterson N. W. Plant hormones and the control of physiological processes, New Phytol. 2001. Vol. 152. P. 375–407.