DOI 10.33952/2542-0720-2021-2-26-28-40
УДК 579.69:577.175.152

Ахтямова З. А.[1], Архипова Т. Н.[1], Мартыненко Е. В.[1], Нужная Т. В.[1,2], Иванов Р. С.[1], Кузьмина Л. Ю.[1]

ВЛИЯНИЕ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* НА СОДЕРЖАНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ У ДЕФИЦИТНОГО ПО ЭТОМУ ГОРМОНУ МУТАНТА ЯЧМЕНЯ И РАСТЕНИЙ ЕГО РОДИТЕЛЬСКОГО СОРТА

[1]ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»;
[2]ФГБНУ «Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»

Реферат. *Способность продуцировать фитогормоны и влиять на их метаболизм в растениях является важным свойством ризосферных бактерий, определяющим их влияние на рост растений. Поскольку абсцизовая кислота (АБК) снижает устьичную проводимость и повышает способность тканей проводить воду, поддержание водного баланса у растений салата на фоне активации их роста связывали, в том числе с накоплением АБК под влиянием бактерий. Цель исследования – проверка гипотезы о зависимости стимулирующего действия бактерий на рост растений от их способности синтезировать гормон АБК. Растения выращивали на светоплощадке. Проростки обрабатывали бактериальной суспензией одновременно с посадкой. Оценивали содержание АБК, относительное содержание воды, содержание хлорофилла и уровень нефотохимического тушения, площадь листьев и массу побегов. Уровень транскриптов генов HvNCED1, HvNCED2 и HvCYP707A1, ответственных за метаболизм АБК у ячменя, оценивали при помощи ПЦР. Сравнение дефицитного по АБК мутанта ячменя Az34 и растений его родительского генотипа Steptoe выявило стимуляцию роста растений обоих генотипов при бактериальной обработке. Масса побегов и площадь листьев необработанного бактериями мутанта была примерно на 30 % меньше по сравнению со Steptoe. Стимулирующий эффект бактерий проявлялся в увеличении площади листа на 15 % у Steptoe и на 35 % у Az34, а также массы побега на 18 % и 41 % соответственно. В результате уменьшалась разница между растениями двух генотипов по фенотипу. У дефицитного мутанта наблюдали повышение уровня АБК более, чем в два раза под влиянием Bacillus subtilis IB-22, что обусловлено способностью бактерий продуцировать АБК и снижать активность распада АБК в растениях ячменя. Результаты исследования свидетельствуют о том, что отдельные штаммы бактерий способны повышать уровень АБК в растениях, компенсируя генетически обусловленный дефицит этого гормона.*

Ключевые слова: *Hordeum vulgare L., абсцизовая кислота, АБК-дефицитный мутант Az 34, Bacillus subtilis.*

Для цитирования: *Ахтямова З. А., Архипова Т. Н., Мартыненко Е. В., Нужная Т. В., Иванов Р. С., Кузьмина Л. Ю. Влияние штамма Bacillus subtilis на содержание абсцизовой кислоты у дефицитного по этому гормону мутанта ячменя и растений его родительского сорта // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 2(26). С. 28–40. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-28-40.*

For citation: *Akhtyamova Z. A., Arkhipova T. N., Martynenko E. V., Nuzhnaya T. V., Ivanov R. S., Kuzmina L. Yu. Influence of Bacillus subtilis strain on abscisic acid content in ABA-deficient barley mutant and its wild type // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 2(26). P. 28–40. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-28-40.*

Введение

Способность многих ризосферных бактерий стимулировать рост растений, способствуя тем самым повышению их урожайности, привлекает к себе внимание исследователей, а бактериальные препараты находят все более широкое применение в растениеводстве [1, 2]. Однако не все ризосферные бактерии одинаково эффективны в плане активации роста растений [3]. Для того, чтобы отбирать потенциально более эффективные штаммы и оптимизировать биотехнологию их применения в сельском хозяйстве, необходимо ясно понимать механизм действия ризосферных бактерий на растения, в то время как сведений на этот счет недостаточно. Способность продуцировать фитогормоны и влиять на их метаболизм в растениях является важным свойством ризосферных бактерий, определяющим (наряду с другими) их влияние на рост растений [1, 4–7]. Вместе с тем, активация роста растений под влиянием бактерий неизбежно приводит к увеличению площади листьев, что, с одной стороны, повышает способность листьев к фотоассимиляции углекислого газа, а с другой стороны, увеличивает испарение воды листьями, что может привести к нарушению водного баланса. Тем не менее, бактерии, отобранные по способности активировать рост растений, не оказывали отрицательного влияния на их оводненность [8]. Ранее было показано накопление абсцизовой кислоты (АБК) у растений салата под влиянием штамма *Bacillus subtilis* IB-22 [9]. Поскольку АБК снижает устьичную проводимость и повышает способность тканей проводить воду [10], поддержание водного баланса у растений салата на фоне активации их роста, связывали с накоплением АБК под влиянием бактерий. В связи с предполагаемой ролью АБК, представляло интерес проверить, зависит ли отзывчивость растений на бактериальную обработку от их способности синтезировать АБК. До сих пор такое сравнение проводили лишь у дефицитного по АБК мутанта томата [11].

Цель исследований – проверка гипотезы о зависимости ростстимулирующего действия бактерий на рост растений от их способности синтезировать гормон АБК.

Материалы и методы исследований

Для исследования использовали растения ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Steptoe и его дефицитного по АБК мутанта Az34. Семена ячменя стерилизовали замачиванием в растворе 96 % C_2H_5OH + 3 % H_2O_2 (соотношение объёмов 1:1) в течение пять минут и многократно промывали дистиллированной водой. Затем семена стратифицировали при 4 °С в течение 48 часов и выдерживали сутки в темноте при комнатной температуре для получения проростков. Растения (10 штук/сосуд) выращивались на светоплощадке при 14 ч фотопериоде, освещенности 400 мкмоль/м^2/с фотосинтетически активной радиации (ФАР) и температуре 25/20 °С (день/ночь) в сосудах объемом 500 см^3. Для обеспечения дренажа на дно сосудов помещали слой гравия. После установки стеклянной трубки для газообмена сосуды заполняли 0,45 кг сухой почвы (агрочернозем глинисто-иллювиальный, характеризующийся средней гумусированностью (6,3 %), слабокислой реакцией среды), с добавлением 10 % песка. Влажность почвы поддерживали на уровне 80 % от полной влагоемкости, поливая растения дистиллированной водой. Количество необходимой для полива воды рассчитывали, ежедневно взвешивая сосуды с растениями.

Для инокуляции растений использовали грамположительные аэробные спорообразующие цитокининпродуцирующие бактерии *Bacillus subtilis* IB-22 [9]. Бактериальные препараты получали культивированием *B. subtilis* IB-22 на среде К1 [12]. Среду (100 мл) засевали биомассой бактерий и культивировали в течение 72 ч в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на шейкере-инкубаторе «Innova 40R» («New Brunswick», США) при 160 об./мин и 37 °С. Суспензию бактериальных

клеток в расчете 1 мл (10^8 КОЕ/мл) на каждый проросток добавляли одновременно с посадкой путем нанесения на поверхность почвы вокруг корней каждого растения.

Для анализа гормонов отбирали образцы побегов и корней пяти растений из разных сосудов (n = 6). Гормоны экстрагировали в течение 16 часов 80 % этанолом в соотношении 1 г сырой массы к 10 мл этанола. Затем отделенный фильтрацией спиртовой экстракт упаривали до водного остатка и АБК экстрагировали диэтиловым эфиром [13]. Количественное определение гормона проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием специфических антител [14, 15]. Надежность метода была обусловлена специфичностью полученных антител против АБК и применением модифицированного метода экстракции АБК, основанного на уменьшении объема экстрагентов на каждой стадии экстракции и повторной экстракции, что позволяет эффективно извлекать АБК при одновременном снижении количества извлеченных примесей. Достаточность очистки АБК перед иммуноанализом была доказана путем изучения хроматографического распределения иммунореактивного материала, которое показало, что пик иммунореактивности совпадает только с положением внутреннего стандарта АБК [16].

Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных семисуточных растений ячменя проводили с использованием реагента «Trizol» согласно протоколу фирмы поставщика («Sigma», Германия). Масса пробы и для корней, и для первого листа побега составляла 100 мг. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли при A260/A280 на спектрофотометре «Smart Spec Plus» («Bio-Rad», США). Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы («Синтол», Россия).

Анализ экспрессии генов PR-белков проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе «CFX Connect real-time PCR Detection System» («BioRad Laboratories», США) с использованием набора заранее подготовленных реагентов «EVA Green I» («Синтол», Россия). Программа кПЦР была следующей: 95 °С в течение пяти минут; 40 циклов при 95 °С в течение 15 с, при 60 °С в течение 20 с и 72 °С в течение 30 с. После заключительного цикла ПЦР был проведен анализ кривой плавления для определения специфики реакции (при 95 °С в течение 15 секунд, 60 °С в течение одной минуты и 95 °С в течение 15 секунд).

Использованные в работе гены и праймеры приведены в таблице 1. Изменения в экспрессии интересующего гена определяли на основании вычисления уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения «CFX Connect real-time PCR Detection System» («BioRad Laboratories», США). В качестве внутреннего контроля использовали ген домашнего хозяйства ячменя *HvGADPH*. Измерения проводили в трех химических и биологических повторностях.

Таблица 1 – Последовательности праймеров, используемых для количественного ПЦР анализа в режиме реального времени

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность 5’-3’	Номер гена в базе данных
HvNCED1	Forward	CCCCTATGGCTTCCACGGCACATT	AB239297
	Reverse	GTGATGAGTAACCGCCGCTAACTG	
HvNCED2	Forward	CGGGTACATTCTCACCTTCGTGCA	AB239298
	Reverse	CTGGCAACTTCCTCTTTCCATGTCC	
HvCYP707A1	Forward	CCACCAAGTACAGATGGTCTAC	AB239299
	Reverse	TCCGAAGGAGGAAGACATAGA	
HvGADPH	Forward	GCCACTATTCTTCAGGGACTT	EF409626
	Reverse	CTTCTTGGCACCACCCTAATA	

Для измерения содержания хлорофилла в эпидерме листьев ячменя использовали прибор «DUALEX SCIENTIFIC+» («FORCE-A», Франция). Измерения проводили в средней части второго листа на 11-е сутки роста.

Флуоресценцию хлорофилла интактных листьев проводили на 11-е сутки роста растений с помощью флуориметра «Junior PAM» («Walz», Германия) с использованием программы WinControl 3. Перед измерениями растения выдерживали 30 мин в темноте. Коэффициент нефотохимического тушения вычисляли по формуле NPQ = (F'm/Fm)–1, где Fm – максимальная величина выхода флуоресценции хлорофилла в адаптированных к темноте листьях в ответ на вспышку насыщающего света, F'm – максимальная величина выхода флуоресценции во время насыщающей вспышки, созданной на фоне постоянно действующего света (относительные единицы).

Для определения относительного содержания воды (ОСВ) листья (брали первый лист четырёх растений) взвешивали, погружали основанием в дистиллированную воду, налитую в стеклянный сосуд, который затем закрывали для насыщения воздуха влагой и помещали в темноту на ночь. Через 24 часа листья взвешивали для определения тургорной массы, высушивали и рассчитывали относительное содержание воды по формуле: ОСВ = (сырая масса – сухая масса) / (тургорная масса – сухая масса).

При выборе времени для взятия образцов мы исходили из того, что изменение экспрессии генов, контролирующих метаболизм АБК, должно предшествовать изменению концентрации гормона, что, в свою очередь, не сразу скажется на морфометрии и фотосинтезе.

Площадь листьев определяли с помощью программы Image J.

Статистическую обработку проводили при помощи стандартных программ MS Excel и Statistica 10. На рисунках данные представлены как средние и их стандартная ошибка. Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и тест Дункана.

Результаты и их обсуждение

Измерение содержания АБК в растениях показало ожидаемый пониженный уровень этого гормона у мутанта Az34 как в корнях (в 1,5 раза), так и в побегах (в 1,7 раза) по сравнению с растениями Steptoe (рисунок 1). Известно, что у этого мутанта пониженный уровень АБК объясняется низкой активностью фермента, катализирующего превращение в гормон альдегида АБК [17].

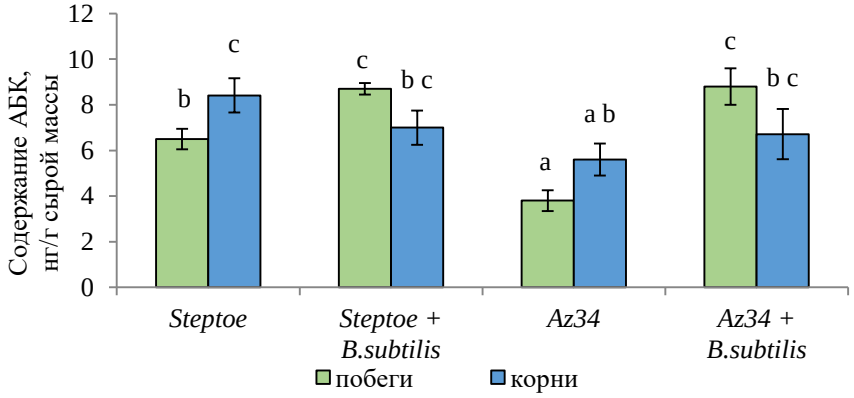


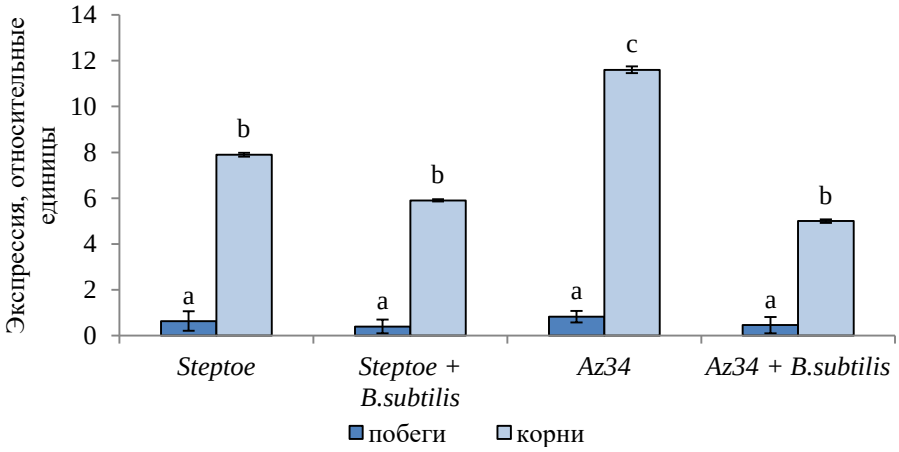
Рисунок 1 – Влияние инокуляции штаммом *B. subtilis* IB-22 на содержание АБК в побегах и корнях растений дефицитного по АБК мутанта ячменя Az34 и его родительского сорта Steptoe

Примечание. *Измерение проводили на восьмые сутки после обработки B. subtilis IB-22. Разные буквы означают достоверные отличия при $p \leq 0,05$, $n = 6$.*

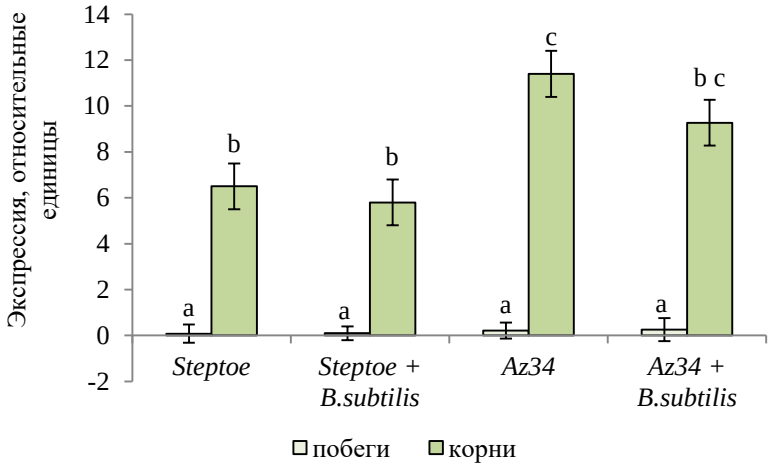
Бактеризация растений увеличивала содержание АБК в побегах, что более заметно проявлялось у растений Az34, у которых уровень этого гормона в побегах возрастал более чем в два раза по сравнению с вариантом без бактерий (рисунок 1). В корнях влияние бактерий на содержание АБК не проявлялось. Тем не менее, важно было понять, каким образом бактерии увеличивали содержание АБК в растениях.

Измерение концентрации АБК в культуральной жидкости *Bacillus subtilis* IB-22 выявило присутствие в ней около 20 нг/мл гормона. Концентрация АБК была примерно в 10 раз ниже, чем в бактериальной жидкости *Azospirillum brasilense* Sp 245 [18]. Тем не менее, в литературе обсуждается возможное влияние бактериальной АБК штамма *Bacillus aryabhattai* SRB02, концентрация которой была около 2 нг/мл [19] на содержание этого гормона у растений. Таким образом, продукция АБК *B. subtilis* IB-22 могла внести определенный вклад в повышение концентрации этого гормона у растений ячменя, обработанных бактериями (рисунок 1).

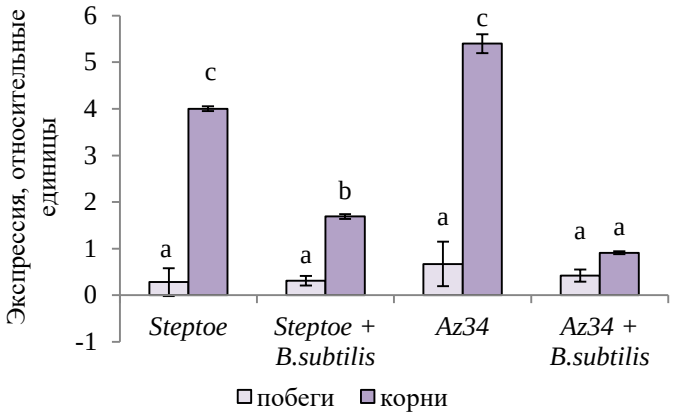
Из литературы известно, что бактерии могут изменить уровень АБК в растениях, влияя на метаболизм этого гормона *in planta* [11, 20]. Поэтому важно было изучить влияние *B. subtilis* IB-22 на уровень транскриптов генов, ответственных за метаболизм АБК. На рисунке 2 представлены результаты оценки уровня трансприптов генов *HvNCED1, HvNCED2* и *HvCYP*, кодирующих ферменты, катализирующие лимитирующее звено синтеза альдегида АБК и оксидативный распад АБК соответственно.



А



Б



В

Рисунок 2 – Влияние инокуляции штаммом *B. subtilis* IB-22 на содержание транскриптов генов *HvNCED1* (А), *HvNCED2* (Б) и *HvCYP707A1* (В) в побегах и корнях растений дефицитного по АБК мутанта ячменя Az34 и его родительского сорта Steptoe

Примечание. *Значения экспрессии генов, ответственных за метаболизм АБК у ячменя, нормированы относительно гена ячменя HvGADPH, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Разные буквы означают достоверные отличия при* $p \leq 0,05$.

Экспрессия генов, ответственных за метаболизм АБК, была на порядок выше в корнях, чем в побегах растений. Очевидно, у растений этого вида и возраста АБК синтезируется, главным образом, в корнях, которые снабжают побег этим гормоном, транспортируя его по ксилеме [21]. Уровень транскрипта генов *HvNCED1* и *HvNCED2* был выше у растений Az34 (на 29 % у *HvNCED1* и в 1,75 раза у *HvNCED2*), что могло в какой-то мере компенсировать низкую активность превращения альдегида АБК в сам гормон. Этим можно объяснить тот факт, что у мутанта ячменя пониженный уровень АБК был выражен менее ярко, чем у дефицитного по АБК мутанта томата [11, 22]. Введение бактерий не увеличивало уровень экспрессии этих генов, но зато приводило к резкому снижению экспрессии *HvCYP* (в 6,0 раз у Az34 и в 1,3 раза у Steptoe), что очевидно могло способствовать накоплению АБК за счет снижения активности оксидативного катаболизма этого гормона. Таким образом, повышение уровня АБК под влиянием бактерий могло быть связано как с поглощением гормона, продуцируемого бактериями, так и со снижением под влиянием бактерий распада АБК.

Масса побегов и площадь листьев растений дефицитного по АБК мутанта ячменя Az34 были меньше по сравнению с растениями родительского сорта Steptoe на 31 % и 33 % соответственно (таблица 2). Это противоречит исторически сложившемуся мнению о том, что этот гормон является ингибитором роста [22]. Тем не менее, полученные нами результаты соответствуют сведениям о том, что дефицитные по АБК мутанты кукурузы и томатов уступали растениям исходного генотипа по размерам [11, 23], что свидетельствует о необходимости поддержания оптимального уровня этого гормона для нормального роста растений. Под влиянием бактериальной обработки происходило увеличение массы побега на 18 % у Steptoe и на 41 % у Az34.

Площадь листьев растений возрастала под влиянием бактерий (на 15 % у Steptoe и на 35 % у Az34), что могло отрицательно сказаться на водном балансе растений. Тем не менее, ОСВ растений не изменялось под влиянием бактерий

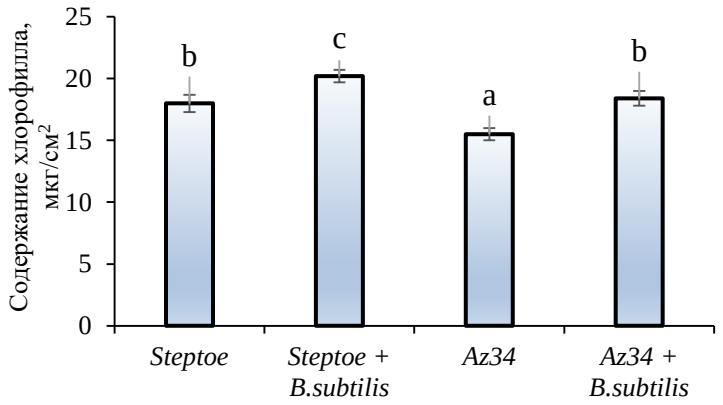
(таблица 2). Очевидно, повышение уровня АБК под влиянием бактеризации до уровня, характерного для растений исходного генотипа, способствовало нормализации водных отношений.

Таблица 2 – Влияние *B. subtilis* IB-22 на площадь листьев, сырую массу побега и ОСВ растений ячменя дефицитного по АБК мутанта Az34 и его родительского сорта Steptoe

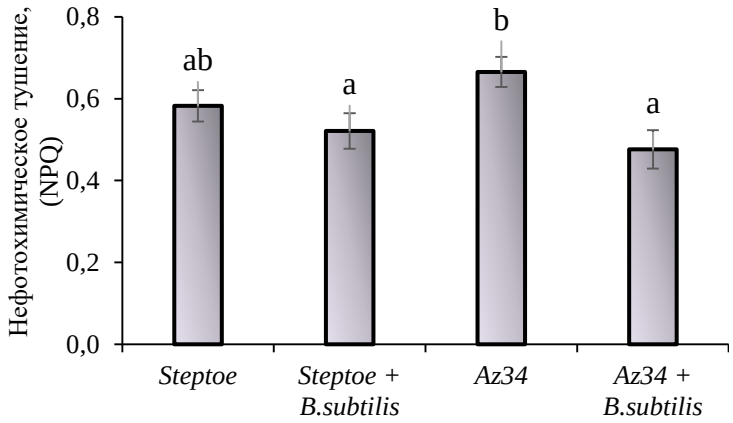
Параметр / Вариант опыта	Steptoe	Steptoe + *B. subtilis* IB-22	Az34	Az34+ *B. subtilis* IB-22
Площадь всех листьев, см^2/растение	26,8 ± 0,6^b	31,0 ± 0,9^c	20,1 ± 0,9^a	27,1 ± 1,0^b
Сырая масса побега, мг/растение	537 ± 18^b	636 ± 16^c	409 ± 15^a	579 ± 22^b
Относительное содержание воды (ОСВ), %	94,65 ± 0,64^a	95,20 ± 0,50^a	94,20 ± 0,96^a	93,98 ± 0,33^a

Примечание. *Внутри группы достоверно отличающиеся значения помечены разными буквами (для площади листьев и сырой массы побега n = 30, для ОСВ n = 6, p ≤ 0,05).*

Мутантные растения отличались пониженным содержанием хлорофилла – 15,5 мкг/см^2, в то время как бактеризация приводила к повышению данного показателя до уровня растений Steptoe – 18 мкг/см^2 (рисунок 3А).



А



Б

Рисунок 3 – Влияние *B. subtilis* IB-22 на содержание хлорофилла (А) и нефотохимическое тушение (Б) растений ячменя дефицитного по АБК мутанта Az34 и его родительского сорта Steptoe

Примечание. *Разные буквы означают достоверные отличия при p ≤ 0,05, n = 20.*

Оценка нефотохимического тушения у растений арабидопсиса выявила его более высокий уровень у дефицитного по АБК мутанта [24], что сопровождалось более низким уровнем ассимиляции углекислого газа. У дефицитного по АБК мутанта ячменя также проявлялась тенденция более высокого уровня нефотофихимического тушения (рисунок 3Б). Хотя нефотохимическое тушение считается механизмом защиты фотосинтетического аппарата от оксидативного стресса [25], в отсутствие стресса этот процесс может снижать эффективность фотосинтеза. Следовательно, снижение уровня нефотохимического тушения у дефицитного по АБК мутанта ячменя на 29 %, которое наблюдали под влиянием бактерий (рисунок 3Б), могло способствовать большему накоплению биомассы (таблица 2).

Резкое повышение уровня АБК при сильных стрессах сопровождается снижением уровня хлорофилла [26]. Однако действие этого гормона зависит от его концентрации. Ранее нами была показана способность бактерий *B. subtilis* IB-22 продуцировать цитокинины и повышать их концентрацию в растениях салата и пшеницы [9, 27]. Так как хорошо известно положительное влияние цитокининов на фотосинтез растений [26], обнаруженное в данных экспериментах влияние бактеризации на показатели фотосинтеза может быть связано именно со способностью бактерий продуцировать цитокинины. Тем не менее, обнаруженное в экспериментах с ячменем повышение концентрации АБК в побегах под влиянием бактерий не мешало, но, вероятно, способствовало положительному влиянию бактерий на показатели фотосинтеза растений обоих генотипов.

В экспериментах с растениями томатов было показано, что в отличие от растений дикого типа, у которых бактерии *Bacillus megaterium* стимулировали рост, у дефицитного по АБК мутанта бактерии ингибировали этот процесс [11]. Сравнение дефицитного по АБК мутанта ячменя и растений его родительского генотипа выявило иную картину: стимуляцию роста растений обоих генотипов под влиянием бактерий. Эти особенности результатов, полученных на растениях ячменя, обусловлены тем, что у них, в отличие от растений томатов, наблюдали повышение уровня АБК под влиянием *B. subtilis* IB-22, что обусловлено способностью бактерий этого штамма не только продуцировать АБК, но и снижать активность распада АБК в растениях ячменя.

Таким образом, в данной работе были получены неожиданные результаты. На основе предшествующих данных [15] предполагалось, что способность растений синтезировать АБК необходима для проявления стимулирующего действия бактерий на рост растений. В отличие от них, результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что отдельные штаммы бактерий способны повышать уровень АБК в растениях, компенсируя генетически обусловленный дефицит этого гормона.

Выводы

Сравнение дефицитного по АБК мутанта ячменя и растений его родительского генотипа выявило стимуляцию роста растений обоих генотипов под влиянием бактерий. Стимулирующий эффект бактерий проявлялся в увеличении площади листа на 15 % у Steptoe и на 35 % у Az34 и массы побега на 18 % и 41 % соответственно. Под влиянием штамма *Bacillus subtilis* IB-22 наблюдали повышение уровня АБК в побегах, что более заметно проявлялось у растений Az34, у которых уровень этого гормона в побегах возрастал более чем в два раза, что было обусловлено, как способностью бактерий продуцировать АБК, так и снижать активности распада АБК в растениях ячменя. Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что отдельные штаммы бактерий способны повышать уровень АБК в растениях, компенсируя генетически обусловленный дефицит этого гормона.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ № 20-34-90007, ГЗ Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме АААА-А18-118022190099-6 с использованием оборудования ЦКП УФИЦ РАН «Агидель».

Литература

1. Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I. C. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses // Frontiers in Plant Science. 2019. Vol. 10. P. 1368. DOI: 10.3389/fpls.2019.01368.
2. Ahemad M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective // Journal of King Saud University – Science. 2014. Vol. 26. No. 1. P. 1–20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
3. De Souza R., Ambrosini A., Passaglia L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils // Genetics and Molecular Biology. 2015. Vol. 38. No. 4. P. 401–419. DOI: 10.1590/S1415-475738420150053.
4. Ruzzi M., Aroca R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture // Scientia Horticulturae. 2015. Vol. 196. P. 124–134. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.08.042.
5. Shi T.-Q., Peng H., Zeng S.-Y., Ji R.-Y., Shi K., Huang H., Ji X.-J. Microbial production of plant hormones: opportunities and challenges // Bioengineered. 2017. Vol. 8. P. 124–128. DOI: 10.1080/21655979.2016.1212138.
6. Backer R., Rokem J. S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D. L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1473. DOI: 10.3389/fpls.2018.01473.
7. Duca D. R., Glick B. R. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria // Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. Vol. 104. P. 8607–8619. DOI: 10.1007/s00253-020-10869-5.
8. Khan N., Bano A., Rahman M. A., Guo J., Kang Zh., Ali Babar Md. Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. P. 2097. DOI: 10.1038/s41598-019-38702-8.
9. Arkhipova T. N., Prinsen E., Veselov S. U., Martinenko E. V., Melentiev A. I., Kudoyarova G. R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // Plant and Soil. 2007. Vol. 292. P. 305–315. DOI: 10.1007/s11104-007-9233-5.
10. Veselov D. S., Sharipova G. V., Veselov S. Yu., Dodd I. C., Ivanov I., Kudoyarova G. R. Rapid changes in root HvPIP2; 2 aquaporins abundance and ABA concentration are required to enhance root hydraulic conductivity and maintain leaf water potential in response to increased evaporative demand // Functional Plant Biology. 2018. Vol. 45. P. 143–149. DOI: 10.1071/FP16242.
11. Porcel R., Zamarreno A. M., Garcia-Mina J. M., Aroca R. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants // BMC Plant Biology. 2014. Vol. 14. P. 36. DOI: 10.1186/1471-2229-14-36.
12. Кузьмина Л. Ю., Высоцкая Л. Б., Галимзянова Н. Ф. Гильванова Е. А., Рябова А. С., Мелентьев А. И. Новые штаммы фосфатмобилизующих бактерий, продуцирующих ауксин, перспективные для сельскохозяйственной биотехнологии // Известия УНЦ РАН. 2015. № 1. С. 40–46.
13. Veselov S. Yu., Kudoyarova G. R., Egutkin N. L., Gyuli-Zade V. G., Mustafina A. R., Kof E. K. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // Physiologia Plantarum. 1992. Vol. 86. P. 93–96. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x.
14. Sharipova G., Veselov D., Kudoyarova G., Fricke W., Dodd I., Katsuhara M., Furuichi T., Ivanov I., Veselov S. Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA deficient barley mutant Az34 // Annals of Botany. 2016. Vol. 118. P. 777–785. DOI: 10.1093/aob/mcw117.
15. Arkhipova T. N., Evseeva N. V., Tkachenko O. V., Burygin G. L., Vysotskaya L. B., Akhtyamova Z. A., Kudoyarova G. R. Effect of rhizobacteria on phytohormone status of potato microclones under osmotic stress *in vitro* // Biomolecules. 2020. Vol. 10. P. 1231.
16. Веселов С. Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста. Уфа: БашГУ, 1998. 138 с.
17. Walker-Simmons M., Kudrna D. A., Warner R. L. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley // Plant Physiology. 1989. Vol. 90. P. 728–33. DOI: 10.1104/pp.90.2.728.
18. Cohen A. C., Bottini R., Piccoli P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants // Plant Growth Regulation. 2008. Vol. 54. P. 97–103. DOI: 10.1007/s10725-007-9232-9.
19. Park Y.-G., Mun B.-G., Kang S.-M., Hussain A., Shahzad R., Seo C.-W., Kim A.-Y., Lee S.-U., Oh K. Y., Lee D. Y., Lee I.-J., Yun B. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones // PLoS One. 2017. Vol. 12. No. 3. Art. No. e0173203. DOI: 10.1371/journal.pone.0173203.

20. Bharti N., Pandey S. S., Barnawal D., Patel V. K., Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. P. 34768. DOI: 10.1038/srep34768.

21. Davies W. J., Kudoyarova G., Hartung W. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought // Journal of Plant Growth Regulation. 2005. Vol. 24. No. 4. P. 285–295. DOI: 10.1007/s00344-005-0103-1.

22. Finkelstein R. Abscisic acid synthesis and response // Arabidopsis Book. 2013. Vol. 11. Art. No. e0166. DOI: 10.1199/tab.0166.

23. Tan B. C., Schwartz S. H., Zeevaart J. A., McCarty D. R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize // Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. 1997. Vol. 94. P. 12235–12240. DOI: 10.1073/pnas.94.22.12235.

24. Hurry V., Anderson J. M., Chow W. S., Osmond C. B. Accumulation of zeaxanthin in abscisic acid-deficient mutants of Arabidopsis does not affect chlorophyll fluorescence quenching or sensitivity to photoinhibition *in vivo* // Plant Physiology. 1997. Vol. 113. No. 2. P. 639–648. DOI: 10.1104/pp.113.2.639.

25. Murchie E. H., Ruban A. V. Dynamic non-photochemical quenching in plants: from molecular mechanism to productivity // The Plant Journal. 2020. Vol. 101. P. 885–896. DOI: 10.1111/tpj.14601.

26. Müller M., Munné-Bosch S. Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants // Plant Physiology. 2021. Vol. 185. P. 1500–1522. DOI: 10.1093/plphys/kiaa119.

27. Мартыненко Е. В., Архипова Т. Н. Роль цитокининов в восстановлении роста растении пшеницы при нормализации водообеспечения // Агрохимия. 2010. № 8. С. 35–42.

References

1. Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I. C. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses // Frontiers in Plant Science. 2019. Vol. 10. P. 1368. DOI: 10.3389/fpls.2019.01368.

2. Ahemad M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective // Journal of King Saud University – Science. 2014. Vol. 26. No. 1. P. 1–20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.

3. De Souza R., Ambrosini A., Passaglia L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils // Genetics and Molecular Biology. 2015. Vol. 38. No. 4. P. 401–419. DOI: 10.1590/S1415-475738420150053.

4. Ruzzi M., Aroca R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture // Scientia Horticulturae. 2015. Vol. 196. P. 124–134. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.08.042.

5. Shi T.-Q., Peng H., Zeng S.-Y., Ji R.-Y., Shi K., Huang H., Ji X.-J. Microbial production of plant hormones: opportunities and challenges // Bioengineered. 2017. Vol. 8. P. 124–128. DOI: 10.1080/21655979.2016.1212138.

6. Backer R., Rokem J. S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D. L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1473. DOI: 10.3389/fpls.2018.01473.

7. Duca D. R., Glick B. R. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria // Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. Vol. 104. P. 8607–8619. DOI: 10.1007/s00253-020-10869-5.

8. Khan N., Bano A., Rahman M. A., Guo J., Kang Zh., Ali Babar Md. Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. P. 2097. DOI: 10.1038/s41598-019-38702-8.

9. Arkhipova T. N., Prinsen E., Veselov S. U., Martinenko E. V., Melentiev A. I., Kudoyarova G. R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // Plant and Soil. 2007. Vol. 292. P. 305–315. DOI: 10.1007/s11104-007-9233-5.

10. Veselov D. S., Sharipova G. V., Veselov S. Yu., Dodd I. C., Ivanov I., Kudoyarova G. R. Rapid changes in root HvPIP2; 2 aquaporins abundance and ABA concentration are required to enhance root hydraulic conductivity and maintain leaf water potential in response to increased evaporative demand // Functional Plant Biology. 2018. Vol. 45. P. 143–149. DOI: 10.1071/FP16242.

11. Porcel R., Zamarreno A. M., Garcia-Mina J. M., Aroca R. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants // BMC Plant Biology. 2014. Vol. 14. P. 36. DOI: 10.1186/1471-2229-14-36.

12. Kuzmina L. Yu., Vysotskaya L. B., Galimzyanova N. F., Gilvanova E. A., Ryabova A. S., Melentyev A. I. New strains of phospate mobilizing auxin producing bacteria as promising microorganisms for agricultural biotechnology // Izvestiya Ufimskogo Nauchnogo Tsentra RAN. 2015. Vol. 1. P. 40–46.

13. Veselov S. Yu., Kudoyarova G. R., Egutkin N. L., Gyuli-Zade V. G., Mustafina A. R., Kof E. K. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay

for indole 3-acetic acid // Physiologia Plantarum. 1992. Vol. 86. P. 93–96. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x.

14. Sharipova G., Veselov D., Kudoyarova G., Fricke W., Dodd I., Katsuhara M., Furuichi T., Ivanov I., Veselov S. Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA deficient barley mutant Az34 // Annals of Botany. 2016. Vol. 118. P. 777–785. DOI: 10.1093/aob/mcw117.

15. Arkhipova T. N., Evseeva N. V., Tkachenko O. V., Burygin G. L., Vysotskaya L. B., Akhtyamova Z. A., Kudoyarova G. R. Effect of rhizobacteria on phytohormone status of potato microclones under osmotic stress *in vitro* // Biomolecules. 2020. Vol. 10. P. 1231.

16. Veselov S. Yu. Use of antibodies to quantify, purify, and localize growth regulators. Ufa: Bashkir State University, 1998. 138 p.

17. Walker-Simmons M., Kudrna D. A., Warner R. L. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley // Plant Physiology. 1989. Vol. 90. P. 728–33. DOI: 10.1104/pp.90.2.728.

18. Cohen A. C., Bottini R., Piccoli P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants // Plant Growth Regulation. 2008. Vol. 54. P. 97–103. DOI: 10.1007/s10725-007-9232-9.

19. Park Y.-G., Mun B.-G., Kang S.-M., Hussain A., Shahzad R., Seo C.-W., Kim A.-Y., Lee S.-U., Oh K. Y., Lee D. Y., Lee I.-J., Yun B. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones // PLoS One. 2017. Vol. 12. No. 3. Art. No. e0173203. DOI: 10.1371/journal.pone.0173203.

20. Bharti N., Pandey S. S., Barnawal D., Patel V. K., Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. P. 34768. DOI: 10.1038/srep34768.

21. Davies W. J., Kudoyarova G., Hartung W. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought // Journal of Plant Growth Regulation. 2005. Vol. 24. No. 4. P. 285–295. DOI: 10.1007/s00344-005-0103-1.

22. Finkelstein R. Abscisic acid synthesis and response // Arabidopsis Book. 2013. Vol. 11. Art. No. e0166. DOI: 10.1199/tab.0166.

23. Tan B. C., Schwartz S. H., Zeevaart J. A., McCarty D. R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize // Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. 1997. Vol. 94. P. 12235–12240. DOI: 10.1073/pnas.94.22.12235.

24. Hurry V., Anderson J. M., Chow W. S., Osmond C. B. Accumulation of zeaxanthin in abscisic acid-deficient mutants of Arabidopsis does not affect chlorophyll fluorescence quenching or sensitivity to photoinhibition *in vivo* // Plant Physiology. 1997. Vol. 113. No. 2. P. 639–648. DOI: 10.1104/pp.113.2.639.

25. Murchie E. H., Ruban A. V. Dynamic non-photochemical quenching in plants: from molecular mechanism to productivity // The Plant Journal. 2020. Vol. 101. P. 885–896. DOI: 10.1111/tpj.14601.

26. Müller M., Munné-Bosch S. Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants // Plant Physiology. 2021. Vol. 185. P. 1500–1522. DOI: 10.1093/plphys/kiaa119.

27. Martynenko E. V., Arkhipova T. N. Role of cytokinins in the restoration of wheat plant growth after restoring the water supply // Agrohimia. 2010. No. 8. P. 35–42.

UDC 579.69: 577.175.152

Akhtyamova Z. A., Arkhipova T. N., Martynenko E. V., Nuzhnaya T. V., Ivanov R. S., Kuzmina L. Yu.

INFLUENCE OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN ON ABSCISIC ACID CONTENT IN ABA-DEFICIENT BARLEY MUTANT AND ITS WILD TYPE

Summary. *The ability to produce phytohormones and influence their metabolism in plants is an important property of rhizosphere bacteria that determines their plant growth promoting effect. Since abscisic acid (ABA) reduces stomatal conductance and increases the ability of tissues to conduct water, maintenance of water balance in lettuce plants on the background of activation of their growth was associated with the accumulation of ABA under the influence of bacteria. The aim of the study is to test the hypothesis that the growth-stimulating effect of bacteria on plants depends on their ability to synthesize the hormone ABA. The plants were grown on a light platform; seedlings were treated with a bacterial suspension simultaneously with planting. The ABA content, the relative water content, the chlorophyll content, the level of non-*

photochemical quenching, the leaf area and the weight of the shoots were measured. The level of transcripts of the HvNCED1, HvNCED2, and HvCYP707A1 genes responsible for ABA metabolism in barley was assessed using real-time PCR. Comparison of the ABA-deficient mutant of barley and plants of its wild type revealed the stimulation of the growth of plants of both genotypes upon bacterial treatment. The shoot mass and leaf area of the untreated mutant with bacteria were about 30 % less compared to Steptoe. The stimulating effect of bacteria was manifested in an increase in leaf area by 15 % in Steptoe and by 35 % in Az 34; shoot mass – by 18 % and 41 %, respectively. As a result, the phenotype difference between plants of two genotypes decreased. In the deficient mutant, the ABA level increased under the influence of Bacillus subtilis IB-22 more than twice. It was due to the ability of bacteria to produce ABA and reduce the activity of ABA degradation in barley plants. The results obtained in this study indicate that certain bacterial strains are able to increase the level of ABA in plants, compensating for the genetically determined deficiency of this hormone.

Keywords: *Hordeum vulgare L., abscisic acid, ABA-deficient mutant Az 34, Bacillus subtilis.*

Ахтямова Зарина Асхатовна, младший научный сотрудник лаборатории физиологии растений ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября 69; e-mail: akhtyamovazarina@gmail.com.

Архипова Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии растений, ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября 69; e-mail: TNarkhipova@mail.ru.

Мартыненко Елена Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии растений, ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября 69; e-mail: evmart08@mail.ru.

Нужная Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии растений, ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября 69; научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений, ФГБНУ «Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября 71; e-mail: tanyawww89@mail.ru.

Иванов Руслан Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии растений, ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября 69; e-mail: ivanovirs@mail.ru.

Кузьмина Людмила Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии, ФГБНУ «Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября 69; e-mail: ljkuz@anrb.ru.

Akhtyamova Zarina Askhatovna, junior researcher at the Laboratory of plant physiology, Ufa Institute of Biology – subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 69, Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia; e-mail: akhtyamovazarina@gmail.com.

Arkhipova Tatiana Nikolaevna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of plant physiology, Ufa Institute of Biology – subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 69, Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia; e-mail: TNarkhipova@mail.ru.

Martynenko Elena Viktorovna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of plant physiology, Ufa Institute of Biology – subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 69, Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia; e-mail: evmart08@mail.ru.

Nuzhnaya Tatyana Vladimirovna, Cand. Sc. (Biol.), researcher at the Laboratory of plant physiology, Ufa Institute of Biology – subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian

Academy of Sciences; researcher at the Laboratory of biochemistry of plant immunity; 69, Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia; Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 71, Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia; e-mail: tanyawww89@mail.ru.

Ivanov Ruslan Sergeevich, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of plant physiology, Ufa Institute of Biology – subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 69, Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia; e-mail: ivanovirs@mail.ru.

Kuzmina Ludmila Yurievna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of plant physiology, Ufa Institute of Biology – subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 69, Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia; e-mail: ljkuz@anrb.ru.

Дата поступления в редакцию – 25.05.2021.
Дата принятия к печати – 25.06.2021.