

2. Farré, J.-C. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast / J.-C. Farré, S. Subramani // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2016. – V. 17. – № 9. – P. 537-552.
3. Furukawa, K. Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast / K. Furukawa, A. Innokentev, T. Kanki // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – V. 10.
4. Kim, J. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 / J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.-L. Guan // *Nature Cell Biology*. – 2011. V. 13. – № 2. – P. 132-141.
5. Lindermayr, C. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis / C. Lindermayr, G. Saalbach, J. Durner // *Plant Physiology*. – 2005. – V. 137. – № 3. – P. 921-930.
6. Minibayeva, F. Nitric oxide induces autophagy in *Triticum aestivum* roots / F. Minibayeva, A. Mazina, N. Gazizova, S. Dmitrieva, A. Ponomareva, D. Rakhmatullina // *Antioxidants*. – 2023. – V. 12. – № 9.
7. Montagna, C. To eat, or NOt to eat: S-nitrosylation signaling in autophagy / C. Montagna, S. Rizza, E. Maiani, L. Piredda, G. Filomeni, F. Cecconi // *The FEBS Journal*. – 2016. – V. 283. – № 21. – P. 3857-3869.
8. Niu, L. Proteomic investigation of S-nitrosylated proteins during NO-induced adventitious rooting of cucumber / L. Niu, J. Yu, W. Liao, J. Xie, J. Yu, J. Lv, X. Xiao, L. Hu, Y. Wu // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – № 21.
9. Phillips, A.R. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana* / A.R. Phillips, A. Suttangkakul, R.D. Vierstra // *Genetics*. – 2008. – V. 178. – № 3. – P. 1339-1353.
10. Tang, H.-W. The TORC1-regulated CPA complex rewires an RNA processing network to drive autophagy and metabolic reprogramming / H.-W. Tang, Y. Hu, C.-L. Chen, B. Xia, J. Zirin, M. Yuan, J.M. Asara, L. Rabinow, N. Perrimon // *Cell Metabolism*. – 2018. – V. 27. – № 5. – P. 1040- 1054.e8.
11. Yang, Z. An overview of the molecular mechanism of autophagy / Z. Yang, D.J. Klionsky *Autophagy in Infection and Immunity* / Ed. B. Levine // Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, – 2009. – P. 1–32.
12. Wood, A.J. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses / A. J. Wood // *The Bryologist*. – 2007. – V. 110. – № 2. – P. 163-177.
13. Zhu, L. PTEN S-nitrosylation by NOS1 inhibits autophagy in NPC cells / L. Zhu, C. Zhang, Q. Liu // *Cell Death & Disease*. – 2019. – V. 10. – № 4. – P. 306.

**Влияние цинк-солюбилизующих PGP-ризобактерий и
опрыскивания йодом на редокс-реакции в листьях гороха (*Pisum
sativum* L. сорт Мадрас)**

Малева М. Г.^{A*}, Борисова Г. Г.^A, Ахамуэфуле К. Ч.^A, Дарказанли М.^A

^A *Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. *E-mail: maria.maleva@mail.ru*

Изучение растительно-микробных взаимодействий позволяет предложить цельную стратегию экологически устойчивого растениеводства,

основанную на использовании бактериальных препаратов, выступающих в качестве стимуляторов роста и дополнительного источника эссенциальных элементов у растений [1; 2]. В основе создания таких биоудобрений лежит использование ростстимулирующих бактерий (от англ. “Plant Growth Promoting”, PGP), среди которых особое место занимают ризосферные микроорганизмы (PGPR). Прямое действие PGPR на рост растительных организмов связывают с такими PGP-свойствами, как способность к фиксации молекулярного азота и производству аммиака, повышение доступности для растений элементов минерального питания (за счет солюбилизации нерастворимых соединений фосфора, калия, цинка и пр.), продукция сидерофоров и фитогормонов, а также повышение устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессорам [2; 3]. Принцип действия бактериальных препаратов отличается от классических химических средств защиты, так как их целью является не уничтожение, а регулирование численности патогенных микроорганизмов за счет конкурентных взаимоотношений, а также индуцирование системной устойчивости у растений [4; 5]. Многие бактерии являются катализаторами редокс-реакций в почве, что приводит к изменению подвижности отдельных элементов и их корневому поглощению растениями. Более того, PGPR могут становиться триггерами, запускаящими каскад защитных реакций у растительных организмов, производя метаболиты различной химической природы, в том числе и антиоксиданты [6].

Среди дефицитных эссенциальных элементов особое место занимают цинк и йод [7]. Цинк (Zn) является жизненно важным микроэлементом для растений из-за его роли в качестве структурного компонента и регуляторного кофактора большого количества ферментов, участвующих во многих биохимических путях. Дефицит Zn приводит к значительным потерям урожайности сельскохозяйственных культур с потенциальной опасностью для здоровья человека из-за снижения его поступления в рацион [8]. Проблемы, связанные с неполноценным питанием из-за дефицита Zn, уже имеют системный характер и вызывают серьезную озабоченность по всему миру [9]. Цинк-соллюбилизирующие PGPR могут помочь преодолеть нехватку этого микроэлемента, превращая нерастворимые соединения Zn в доступные для растений [10]. Йод (I) также принимает участие в важных процессах обмена веществ у растений. У человека дефицит I вызывает неадекватный синтез гормона щитовидной железы, который выполняет множество функций, таких как активизация синтеза белка, регулирование передачи энергии, ускорение роста и развития и поддержание центральной нервной системы [11]. Йод не является необходимым для растений, но может считаться полезным, поскольку благодаря своим ан-

тиоксидантным свойствам этот элемент способен защищать их от окислительного стресса и в определенных концентрациях может служить стимулятором роста [12]. Эксперименты по обогащению культурных растений разными формами йода проводились либо путем добавления их в почву, либо внекорневым опрыскиванием [13]. Однако, несмотря на свой потенциал, микробиологическая биофортификация не нашла широкого применения, а влияние комбинированного биообогащения на редокс-баланс у культурных растений остается недостаточно изученным, что определило цель нашего исследования. Цель работы – изучить влияние инокуляции Zn-солубилизирующими PGPR совместно с внекорневой обработкой одной из двух форм йода (KI или KIO₃) на редокс-реакции в листьях гороха (*Pisum sativum* L. сорт Мадрас).

Материалы и методы исследования. Сорт гороха «Мадрас» (происхождение: «TOFT PLANT BREEDING APS», Дания) относится к средне-поздним сортам усатой формы, устойчив к полеганию и растрескиванию бобов, включён в Госреестр по Центральному и Центрально-Чернозёмному регионам. Сорт является ценным по качеству семян, которые используются для получения продовольственного зерна. Широко выращивается в коммерческих целях в качестве микрозелени, что обусловило выбор этого сорта в качестве объекта исследования.

Бактериальные культуры были предварительно выделены из ризосферы *Tussilago farfara* L. (сем. Asteraceae), произрастающей на территории Сафьяновского медно-цинково-колчеданного месторождения (г. Реж, Свердловская область). В общей сложности было выделено около 150 изолятов, из которых было отобрано два штамма с высокой устойчивостью к цинку (до 2 г/л на агаризованной среде Лурия-Бертани, LB) и железу (до 9 г/л), а также наилучшими Zn-солубилизирующими и сидерофор продуцирующими способностями. Отобранные штаммы первоначально были идентифицированы как принадлежавшие родам *Pantoea* sp. STF1 и *Pseudomonas* sp. STF13 на основе морфологических, физиологических и биохимических тестов, а затем с помощью секвенирования генома 16S рРНК [14]. Далее было проведено их тестирование на дополнительные PGP-способности и устойчивость к йодиду (KI) и йодату (KIO₃) калия. Оба штамма обладали высокой способностью к солубилизации фосфатов (115,3 и 289,2 мг PO₄³⁻/л, соответственно для STF1 и STF13) и синтезу индолил-3-уксусной кислоты, ИУК (10,3 и 14,3 мг/л, соответственно). Йодный тест не выявил неблагоприятного влияния KI и KIO₃ на рост исследуемых культур даже при концентрации 0,1%. Отобранные штаммы использовали в дальнейших вегетационных опытах на *P. sativum*. Зрелые семена гороха подвергали поверхностной стерилизации (70% этанол в течение 30

с, затем 2 мин 4% гипохлорит натрия), несколько раз промывали стерильной дистиллированной водой и оставляли на ночь для набухания. На следующий день семена инокулировали отобранными штаммами PGPR в течение 1–2 часов. Для этого отобранные культуры бактерий предварительно культивировали на LB-среде до концентрации не менее 10^8 КОЕ/мл, клетки бактерий отделяли от среды центрифугированием и разводили в стерильной дистиллированной воде. Контролем служили неинокулированные семена гороха, замоченные в стерильной дистиллированной воде. После этого семена высаживали на предварительно дважды автоклавированный (130°C) нейтрализованный торфяной субстрат (производитель ГК «Селигер-Агро», Тверь, Россия) в пластиковые контейнеры объемом 3 л (по 100 семян в каждый, 3 контейнера на один вариант). На 7-й день вегетации сеянцы опрыскивали 0,01% водным раствором KI или KIO_3 . Эту процедуру далее повторяли дважды на 9 и 11 день. Через 21 день вегетации композитные навески срединных листьев гороха из каждого варианта эксперимента использовали для спектрофотометрического (PD-303UV, «APEL», Япония) измерения содержания прооксидантов (пероксида водорода и малонового диальдегида, МДА), низкомолекулярных антиоксидантов (каротиноидов, свободного пролина, растворимых фенольных соединений, включая флавоноиды), а также активности гваякол-пероксидазы. Содержание пероксида водорода (H_2O_2) измеряли при 560 нм после реакции с ксиленоловым реактивом; количество МДА измеряли при 532 и 600 нм после реакции с тиобарбитуровой кислотой [15]. Содержание фотосинтетических пигментов определяли при 470, 647, 663 нм после экстракции в 80% ацетоне; содержание каротиноидов рассчитывали по Lichtenthaler [16]. Содержание пролина определяли по модифицированной методике [17] после экстракции в горячей воде (95°C) и дальнейшего кипячения на водяной бане в течение 20 мин. Для окрашивания использовали смесь нингидринового реактива с ледяной уксусной кислотой (1:1, v/v); оптическую плотность измеряли при длине волны 520 нм. В качестве стандарта использовали раствор пролина известной концентрации. Суммарное содержание растворимых фенольных соединений, в том числе флавоноидов, определяли в 80%-ном спиртовом экстракте. Содержание растворимых фенолов измеряли при 725 нм после реакции с 0,1 н реактивом Folin-Ciocalteu [15]. В качестве стандарта использовали галловую кислоту. Содержание флавоноидов определяли в том же экстракте при 420 нм после 15-мин реакции с 10%-м раствором AlCl_3 (1:1, v/v) [18]. В качестве стандарта использовали раствор рутина. Содержание низкомолекулярных про- и антиоксидантов пересчитывали на сухую биомассу листьев. Для определения активности гваякол-пероксидазы навески свежих листьев (0,2 г) растирали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0) и

центрифугировали 15 мин, 14000 g. Активность фермента оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола [15] и рассчитывали в ммоль окисленного гваякола на мг белка в мин. Количество растворимого белка определяли по Bradford [15]. Измерения проводили в 4-х биологических и 3-х аналитических повторностях. После оценки нормальности распределения, значимость различий между вариантами оценивали с использованием апостериорного критерия Дункана; корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Пирсона. Для определения отдельного и совместного влияния двух факторов (инокуляции бактериальными штаммами и опрыскивания йодом) был использован дисперсионный анализ (two-way ANOVA, Statistica 13.0). На рисунке представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки, разными латинскими буквами обозначены достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$.

Основные результаты и их обсуждение. Измерение содержания МДА уже давно используется в качестве маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ) в исследованиях, связанных с окислительным стрессом и редокс-сигналингом, особенно в тех исследованиях, которые направлены на изучение реакций растений на абиотические и биотические воздействия [19]. Известно, что в результате неблагоприятного действия факторов внешней среды, в клетках растений могут активизироваться прооксидантные процессы, что приводит к значительному увеличению активных форм кислорода (АФК) и накоплению МДА. В нашем эксперименте инокуляция гороха отобранными штаммами PPGR не оказывала влияния на содержание МДА (рис. 1а), однако приводила к небольшому (в среднем на 18%), но достоверному возрастанию количества пероксида водорода (рис. 1б).

Известно, что H_2O_2 является не только высокореакционной АФК, вызывающей окислительный стресс у растений, но может выступать как вторичный мессенджер, участвующий в регуляции сигнальных путей и транскрипционных факторов [5; 20; 21]. Пероксиды играют важную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке и клеточном апоптозе [20; 21]. Дополнительное опрыскивание йодом, особенно в форме KI, приводило к достоверному снижению содержания МДА. Это проявлялось в большей степени у неинокулированных растений (в 1,3 раза), чем у инокулированных (в среднем в 1,2 раза). Что касается H_2O_2 , то опрыскивание гороха одной из форм йода также приводило к снижению его количества до контрольных значений (рис. 1б).

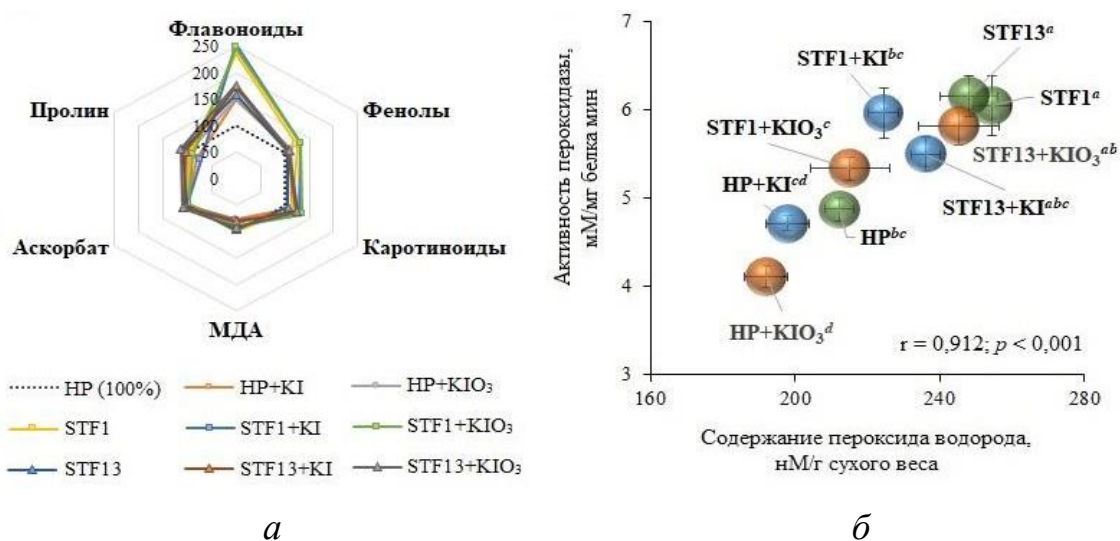


Рис. 1. Влияние двух штаммов PGPR (*Pantoea* sp. STF1 и *Pseudomonas* sp. STF13) и опрыскивания 0,01% KI или KIO₃ на относительное содержание (в процентах от контроля) низкомолекулярных про- и антиоксидантов (а) и активность гваякол-пероксидазы в зависимости от содержания H₂O₂ (б) в листьях гороха. НР – неинокулированные растения. Разными буквами отмечены достоверные различия при $p < 0.05$

Накопление МДА и других продуктов ПОЛ может служить, с одной стороны, индикаторной реакцией, отражающей степень стрессового воздействия, с другой – сигналом для экспрессии генов ряда антиоксидантных ферментов и неэнзиматических антиокислителей [21]. Одним из основных неспецифических путей формирования устойчивости растений является активизация системы антиоксидантной защиты. Важными компонентами этой системы являются низкомолекулярные антиоксиданты (например, пролин и фенольные соединения), а также ферменты-антиоксиданты, к которым относятся растительные пероксидазы [21].

Пролин, играет очень важную роль у растений, подверженных различным стрессовым воздействиям. Помимо того, что пролин действует как отличный осмолит, он может выступать хелатором металлов, участвовать в антиоксидантной защите и играть роль сигнальной молекулы [21]. Обнаружено, что только инокуляция гороха *Pseudomonas* sp. STF13 приводила к небольшому (на 11%), но достоверному увеличению содержания пролина в листьях (рис. 1а). Обработка йодом, особенно в форме KI, у инокулированных этим штаммом растений не оказывала существенного влияния на его содержание, тогда как в случае неинокулированных и инокулированных *Pantoea* sp. STF1, приводила к достоверному снижению (в среднем на 24%). Содержание фенолов и флавоноидов в листьях гороха также зависело от обоих факторов (рис. 1а). Количество растворимых фенолов достоверно увеличивалось лишь у растений, инокулированных

штаммом STF1 (на 25%). Опрыскивание йодом также стимулировало синтез фенолов, однако достоверный эффект был обнаружен лишь у инокулированных растений (на 11%) и инокулированных STF1 (в 1,3 раза). Содержание флавоноидов оказалось более чувствительным к действию обоих факторов (рис. 1а). У инокулированных растений гороха количество флавоноидов значительно увеличивалось – в 2,4 раза в случае STF1 и в 1,6 раз при действии STF13. При этом доля флавоноидов от общего содержания растворимых фенольных соединений возрастала от 50% у контрольных сеянцев, до 94% – в случае STF1 и 76% – в случае STF13. Внекорневая обработка йодом также оказывала положительное влияние на накопление этих низкомолекулярных антиоксидантов, особенно у неинокулированных растений (в среднем в 1,5 раза). Исследование активности растительной пероксидазы в листьях гороха (рис. 1б) показало ее прямую зависимость от содержания пероксида водорода ($r = 0,912$ при $p < 0,001$). Инокуляция гороха Zn-солубилизирующими PGPR достоверно повышала активность гваякол-пероксидазы (в среднем на 25%). Обработка йодом при этом не оказывала существенного воздействия. Результаты дисперсионного анализа подтвердили высокую значимость как влияния PGPR, так и внекорневой обработки одной из форм йода на большинство редокс-реакций у гороха ($p < 0,001$). Однако совместное действие факторов было значимым только для содержания флавоноидов ($p = 0,003$).

Таким образом, инокуляция гороха Zn-солубилизирующими PGPR (*Pantoea* sp. STF1 и *Pseudomonas* sp. STF13), особенно при опрыскивании одной из форм йода (KI или KIO₃), снижала количество продуктов ПОЛ (малонового диальдегида), стимулировала синтез низкомолекулярных антиоксидантов (фенолов и флавоноидов) и активировала растительную пероксидазу. Возрастание количества пероксида водорода в листьях инокулированных сеянцев гороха свидетельствует о важной роли этой молекулы в индуцировании системной устойчивости у растений. Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 23-26-00292, <https://rscf.ru/project/23-26-00292/>.

Библиографические ссылки

1. García-Fraile, P. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry / P. García-Fraile, E. Menéndez, R. Rivas // AIMS Bioengineering. – 2015. – Vol. 2. – P. 183–205.
2. Dhuldhaj, U. Implementation of biofortification technology by using PGPR for sustainable agricultural production / U. Dhuldhaj, U. Pandya / Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture // Ed. V. Meena, P. Mishra, J. Bisht, A. Pattanayak. Singapore, Springer. – 2017.
3. Rana, A. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria / A. Rana [et al.] // Europ. J. Soil Biol. – 2012. – Vol. 50. – P. 118–126.

4. Bhattacharyya, P.N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture / P.N. Bhattacharyya, D.K. Jha // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 28, № 4. – P. 1327–1350.
5. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И.В. Максимов [и др.] // *Физиология растений.* – 2015. – Т. 62, № 6. – С. 763–775.
6. Gray, E.J. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes / E.J. Gray, D.L. Smith // *Soil Biol. Biochem.* – 2005. – Vol. 37, № 3. – P. 395–412.
7. White, P.J. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine / P.J. White, M.R. Broadley // *New Phytol.* – 2009. – Vol. 182. – P. 49–84.
8. Cakmak, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification / I. Cakmak // *Plant Soil.* – 2008. – Vol. 302. – P. 1–17.
9. Godfray, J. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People / J. Godfray // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P. 812–818.
10. Sunithakumari, K. Zinc solubilizing bacterial isolates from the agricultural fields of Coimbatore / K. Sunithakumari, S.N. Padma Devi, S. Vasandha // *Curr. Sci.* – 2016. – Vol. 110, № 2. – P. 196–205.
11. Medrano-Macías, J. Use of iodine to biofortify and promote growth and stress tolerance in crops / J. Medrano-Macías [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7. – 1146.
12. Golubkina, N. Joint biofortification of plants with selenium and iodine. New field of discoveries / N. Golubkina [et al.] // *Plants.* – 2021. – Vol. 10. – 1352.
13. Melse-Boonstra, A. Iodine deficiency in pregnancy, infancy and childhood and its consequences for brain development / A. Melse-Boonstra, N. Jaiswal // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 29–38.
14. Voropaeva, O.V. Plant growth promoting activity and metal tolerance of bacteria isolated from rhizosphere of the orchid *Epipactis atrorubens* growing on serpentine substrates of the Middle Urals / O.V. Voropaeva [et al.] // *J. Sib. Fed. Univ. Biology.* – 2022. – Vol. 15, № 3. – P. 297–313.
15. Методы оценки антиоксидантного статуса растений : учеб.-метод. пособие / Г.Г. Борисова и др.; отв. ред. Н. В. Чукина. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. – 2012. – 72 с.
16. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes / H.K. Lichtenthaler // *Method. Enzymol.* – 1987. – Vol. 148. – P. 350–382.
17. Калинкина, Л.Г. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот и их определение на аминокислотном анализаторе / Л.Г. Калинкина, Л.В. Назаренко, Е.Е. Гордеева // *Физиология растений.* – 1990. – Т. 37, № 3. – С. 617–621.
18. Chang, C.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods / C.C. Chang // *J. Food Drug Anal.* – 2002. – Vol. 10. – P. 178–182.
19. Melanie, M. Malondialdehyde: Facts and Artifacts / M. Melanie, S. Munné-Bosch // *Plant Physiol.* – 2019. – Vol. 180, № 3. – P. 1246–1250.
20. Ткачук, А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / А. Ткачук [и др.] // *Биологические мембраны.* – 2012. – Т. 29, № 1–2. – С. 21–37.
21. Креславский, В.Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В.Д. Креславский [и др.] // *Физиология растений.* – Т. 59, № 2. – С. 163–163.