

## ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* НА РОСТ ПРОРОСТКОВ И ЛИГНИФИКАЦИЮ КОРНЕЙ *Pisum sativum* L. В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ НАТРИЙ-ХЛОРИДНОГО ЗАСОЛЕНИЯ

© 2023 г. О. В. Ласточкина<sup>а, \*</sup>, С. Р. Гарипова<sup>б, с</sup>, Л. И. Пусенкова<sup>б</sup>, Д. Ю. Гаршина<sup>б</sup>,  
Ан. Х. Баймиев<sup>а, с</sup>, И. С. Коряков<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

<sup>б</sup> Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение  
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

<sup>с</sup> Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

\*e-mail: oksana.lastochkina@ufaras.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 06.03.2023 г.

Исследовано влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* (штамм 10-4) на параметры роста и устойчивости, а также интенсивность отложения лигнина в корнях проростков *Pisum sativum* L. в условиях натрий-хлоридного засоления (1% NaCl). Установлено, что воздействие засоления снижало энергию прорастания, всхожесть, длину корней и побегов проростков, их сырую и сухую массу, а также увеличивало содержание пролина и уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ). Предобработка штаммом 10-4 оказывала стимулирующий в норме и защитный при засолении эффекты на проростки, что отразилось в улучшении энергии прорастания и всхожести семян, длины корней и накоплении их сухой массы в условиях засоления; однако по показателям роста побегов при стрессе существенной разницы от контрольных (небактеризованных) вариантов не наблюдалось. В то же время, штамм 10-4 способствовал более раннему формированию боковых корней, а также снижению стресс-индуцированного ПОЛ и содержания пролина в проростках, что свидетельствует о защищенности клеток от окислительных и осмотических повреждений в условиях засоления. Получены приоритетные данные о важной роли эндофитного штамма *B. subtilis* 10-4 в процессе лигнификации и укреплении барьерных свойств клеточных стенок корней, что вносит вклад в снижение токсического действия натрий-хлоридного засоления и реализацию протекторного действия этих бактерий на растения гороха.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, *Pisum sativum*, засоление, лигнин, рост, устойчивость

**DOI:** 10.31857/S0015330322600838, **EDN:** PBOYSX

### ВВЕДЕНИЕ

Засоление почв относится к числу наиболее распространенных абиотических стресс-факторов окружающей среды, приводящих к ингибированию роста и снижению урожайности культурных растений, что несет угрозу сельскохозяйственному производству и продовольственной безопасности в мире [1]. В связи с климатическими изменениями негативное воздействие засоления на пахотные земли усиливается. В растениях засоление вызывает окислительные и осмотические повреждения, дефицит воды, закрытие устьиц, снижение фотосинтетической активности и потерю урожайности [2].

Для преодоления стрессовых воздействий, включая засоление, интерес вызывает применение экологически ориентированных технологий при

выращивании растений [3]. Применение полезных рост-стимулирующих бактерий (PGPB, Plant Growth-Promoting Bacteria) может снизить вредное воздействие засоления на растения и улучшить их рост без побочных эффектов, как для самого растения, так и окружающей среды [3, 4]. К настоящему времени накоплен большой массив данных о способности PGPB прямо или опосредованно улучшать рост и развитие разных видов растений в норме и при воздействии различных стресс-факторов биотической и абиотической природы, тем самым повышая урожайность и качество продукции [3–5]. Физиологическое и антистрессовое действия PGPB на растения связывают с улучшением минерального питания [6], водного обмена, фотосинтеза [7], продукцией множества биологически активных соединений с

антибиотической [8, 9], фитогормоноподобной [10, 11], осморегуляторной и антиоксидантной [4, 5, 12] активностями, модуляцией эндогенных фитогормонов [13, 14] и запуском системной устойчивости растений [5, 7, 8]. Все вышеупомянутые эффекты регулируются сложным набором специфических, множественных и взаимосвязанных механизмов, которые еще нуждаются в раскрытии. Кроме того, эффективность конкретного штамма RGPB зависит от различных его характеристик, включая синтез соединений, ответственных за стимуляцию роста и индукцию устойчивости растений [8], а также способности колонизировать поверхность (эпифиты) или внутренние ткани (эндифиты) растений [4, 15, 16].

Эндофитные RGPB являются наиболее привлекательными для практического применения с целью улучшения роста и развития растений в условиях длительных стрессов, так как благодаря стабильному рН, влажности, потоку питательных веществ, отсутствию конкуренции со стороны большого количества микроорганизмов они способны воздействовать на метаболизм растения изнутри вне зависимости от факторов окружающей среды [15, 16]. Экологическая роль эндофитного сообщества, тесно связанного с растением-хозяином, в настоящее время недостаточно изучена. Однако находится все больше подтверждений тому, что “спрятанный внутри растений мир” имеет непосредственное отношение к таким процессам в жизни растений, как регуляция роста и развития, фитоиммунитет и приспособление к меняющимся условиям существования [17]. Ассоциированные с растениями микроорганизмы представляют собой совокупный генетический ресурс, с которым они образуют единую информационную и функциональную сеть, особенно востребованную при воздействии неблагоприятных биотических и абиотических факторов [16]. Этот подход был сформулирован как “принцип дополнительности геномов” [18], позволяющий существенно расширить адаптивные возможности растений в преодолении стрессов.

Бобовые растения интересны тем, что в их физиологическое состояние вносят вклад как ризобийные, так и эндофитные неризобийные микроорганизмы [19]. В связи с этим представляет интерес изучение роли эндофитных бактерий в поддержании адаптивных возможностей бобовых растений [19, 20]. *Pisum sativum* L. – важная бобовая культура, чувствительная к солевому стрессу, четко определяемому как наличие избыточного количества солей (растворимых) в почве, препятствующих росту и функционированию растений [1]. Засоление вызывает у растений окислительный и осмотический стрессы, снижает способность корневой системы поглощать воду и, следовательно, увеличивается потеря воды листьями. Накопление большого количества солей растени-

ями влечет за собой различные физиологические изменения, в том числе дисбаланс питательных веществ, разрыв мембран, нарушение способности к детоксикации активных форм кислорода (АФК), колебания синтеза и активности антиоксидантных ферментов, уменьшение устьичного отверстия и минимизацию фотосинтетической активности [20]. В результате вызванных засолением окислительных повреждений в клетках накапливаются в большом количестве денатурированные белки, продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые могут быть не только первичными медиаторами стрессового воздействия, но и индукторами соответствующих защитных механизмов в растительных клетках, о развитии которых можно судить по степени накопления в них малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта ПОЛ [21, 22]. Для предотвращения повреждающего действия стресс-факторов и поддержания оптимального водного режима в растениях активно экспрессируются гены, кодирующие белки с функциями молекулярных шаперонов, протеаз и ингибиторов протеаз. При этом индуцируется образование ранее отсутствующих низкомолекулярных органических соединений (аминокислот, сахаров, бетаинов) с осмопротекторными свойствами [21, 22], к каковым относится пролин [23, 24], часто используемый в качестве биомаркера уровня осмотического стресса растений. Важную роль в защите растений от токсического действия засоления играет укрепление их барьерных свойств через усиление лигнификации [25], однако сведения о влиянии эндофитов на этот процесс практически отсутствуют. Понимание основных механизмов, лежащих в основе взаимодействия между эндофитными бактериями и растениями гороха в условиях стрессовых воздействий, включая засоление, имеет большое значение для раскрытия потенциала их применения.

Цель настоящей работы состояла в оценке влияния предпосевной обработки семян эндофитными бактериями *B. subtilis* (штамм 10-4) на параметры роста, уровень ПОЛ, пролина и лигнификацию клеточных стенок корней проростков гороха в норме и при натрий-хлоридном засолении.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал и бактериальный штамм.** Объектом исследования служили проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Памяти Хангильдина) [26]. Семена предоставлены Чишминским селекционным центром Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (г. Уфа). Штамм *Bacillus subtilis* 10-4 был ранее выделен из пахотных почв Республики Башкортостан (г. Уфа), идентифицирован с помощью анализа 16S РНК, детально охарактеризован [4, 14] и депонирован в Национальном биоресурс-

ном центре – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (№ В-12988 от 23.06.2019 г.).

**Приготовление бактериальной суспензии (инокулюма).** Для получения инокулюма штамм 10-4 культивировали на среде Luria-Bertani (LB) при 37°C (180 об/мин, 24 ч) до достижения концентрации  $10^9$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл и разбавляли стерильной водой до концентрации  $10^5$  КОЕ/мл, отобранной ранее в качестве оптимальной в стимуляции роста и защите растений от стрессов [4, 14]. Концентрацию клеток определяли при 600 нм (Spectrophotometer SmartSpecTM Plus, “Bio-Rad”, США).

**Обработка семян, схема экспериментов и условия выращивания.** Семена стерилизовали в 96% этаноле (1 мин), промывали 3 раза стерильной водой и погружали в суспензию *B. subtilis* 10-4 ( $10^5$  КОЕ/мл) (опыт) или воду (контроль) на 1 ч. Далее семена выращивали: 1) на чашках Петри с фильтровальной бумагой с 10 мл дистиллированной воды (норма) или 1% NaCl (стресс) при 21–24°C в темноте в течение 8 сут (25 семян в каждой чашке Петри в 6-ти повторностях) и на 4 и 8 сут оценивали энергию прорастания (%) и всхожесть (%) соответственно; 2) на чашках Петри с фильтровальной бумагой с 10 мл дистиллированной воды при 21–24°C в темноте в течение 3 сут, после чего проростки переносили в стаканы с водой (норма) или 1% NaCl (стресс) и продолжали выращивать на светоплощадке при 21–24°C (16 ч день/8 ч ночь, 200 мкмоль / (м<sup>2</sup> с) ФАР). Далее через разные промежутки времени оценивали ростовые параметры (4, 5 и 8-суточные проростки); содержание пролина, ПОЛ определяли через 24 ч воздействия стресса (4-суточные проростки), лигнификацию корней – через 96 ч воздействия стресса (8-суточные проростки).

**Оценка уровня ПОЛ.** Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию в проростках конечного продукта ПОЛ, МДА, с помощью цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [27]. Проростки (0.5 г) растирали с 3 мл дистиллированной воды, добавляли 3 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и центрифугировали (10000 g, 10 мин). К 2 мл надосадочной жидкости добавляли 2 мл 0.5% ТБК в 20% ТХУ, инкубировали при 100°C (30 мин), далее раствор охлаждали и измеряли оптическую плотность при 532 нм и 590 нм (Spectrophotometer SmartSpecTM Plus, “Bio-Rad”, США). Концентрацию МДА вычисляли с использованием коэффициента молярной экстинкции 155000 л/(см моль).

**Определение содержания пролина.** Содержание пролина оценивали с помощью нингидринового реактива [28]. Проростки (0.5 г) заливали 5 мл кипящей дистиллированной воды, инкубировали при 100°C (30 мин) и охлаждали. Далее 1 мл экстракта смешивали с 1 мл нингидринового реакти-

ва и 1 мл ледяной уксусной кислоты, инкубировали при 100°C (1 ч) и охлаждали. Оптическую плотность растворов измеряли при 522 нм (Spectrophotometer SmartSpecTM Plus, “Bio-Rad”, США).

**Оценка отложения лигнина.** Интенсивность отложения лигнина в корнях определяли по способности флороглюцина избирательно окрашивать лигнин в красно-фиолетовый цвет согласно [29] с модификациями. Брали живые проростки, делали продольные и поперечные срезы в базальной зоне корней с использованием криостата Leica CM1520 (“Leica Biosystems”, Германия) при –30°C. Для заливки использовали жидкость для заморозки образцов Tissue Freezing Medium (“Leica Biosystems”, Германия). Толщина среза составляла 60 мкм. Свежие срезы сразу помещали на предметное стекло с 5% флороглюцином (“ЗАО Вектон”, Россия) на 3 мин. Предметные стекла со срезами обрабатывали 3–4 каплями 10% HCl и проводили визуализацию с помощью флуоресцентного сканирующего микроскопа Biozero BZ-8100E (“Keyence Co.”, Япония). Количественное определение содержания лигнина по степени окраски проводили с помощью программного обеспечения для обработки изображений ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). В каждом варианте опыта оценивалось по четыре среза в трехкратной повторности.

**Оценка способности тестируемого штамма *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани растений (эндофитность).** Для определения эндофитности *B. subtilis* 10-4 семена гороха (выборка 10 семян) погружали на 15 мин в 0.2% диацид, затем пятикратно промывали стерильной водой. Для контроля поверхностной стерилизации последний смыв высевали на картофельно-декстрозный агар (PDA, Potato Dextrose Agar, “HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.”, Индия) и убеждались в отсутствии роста бактерий в течение 7 сут при 28°C. Простерилизованные семена инокулировали *B. subtilis* 10-4 ( $10^5$  КОЕ/мл) путем погружения на 30 мин, проращивали на влажных стерильных бумажных фильтрах в течение 5 сут при 28°C. Затем поверхность проростков стерилизовали путем погружения в 70% этанол на 5 мин, после чего этанол сливали и промывали стерильной водой. Асептически срезанные сегменты проростков обжигали в течение 2 с над пламенем, раскладывали в чашки Петри с питательной PDA средой и инкубировали в течение 76 ч при 28°C. Чистые культуры изолятов, выросших вокруг поверхности стерилизованных сегментов проростков, анализировали на идентичность исходному, использованному для инокуляции семян штамму *B. subtilis* 10-4, с помощью случайной амплификации полиморфной ДНК (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD-ПЦР) (выборка 8 культур с 4-ех проростков).

**Выделение ДНК из бактерий.** Бактериальную ДНК выделяли с использованием буфера для лизиса (1% триптон × 100, 1% твин-20, 1% хелекс 100, 0.005% крезол красный, вода). Генетический полиморфизм штаммов оценивали по результатам RAPD-ПЦР тотальной ДНК с использованием праймеров AFK (50-GCGTCCATTC-30). Амплификацию проводили на оборудовании Терцик (“ДНК-Технологии”, Россия). Анализ и визуализацию продуктов RAPD-анализа проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1.5% ПААГ в камере SE-2 (“Хеликон”, Россия) при 25 кВ (1 ч). Гель окрашивали бромистым этидием, результаты регистрировали с помощью Gel Doc XR (“Bio-Rad”, США).

**Оценка рост-стимулирующих (PGP) характеристик и физико-химических свойств тестируемого штамма *B. subtilis* 10-4.** Оценку способности штамма продуцировать ИУК, сидерофоры, солибилизовать фосфаты, фиксировать атмосферный азот проводили общепринятыми методами [14]. Основные физико-химические свойства (оксидазная, каталазная, β-галактозидазная, уреазная, фенилаланин-дезаминазная активности, реакция Фогеса-Проскауэра) определяли с помощью тест-систем (системы индикаторные бумажные (СИБ) для идентификации микроорганизмов, набор №2) (“МикроГен”, Россия). СИБ представляют собой диски или полоски хроматографической бумаги, содержащие определенные количества субстрата в сочетании с индикатором, стабилизированные пленкообразующим покрытием – поливиниловым спиртом. При положительной (“+”) реакции штамм изменял цвет субстрата в растворенном виде или цвет полоски в соответствии с таблицей учета результатов исследования, что свидетельствовало об активности фермента или метаболическом преобразовании/накоплении тестируемого субстрата; в противном случае констатировали отрицательную реакцию (“-”) ([https://rbpharm.ru/wp-content/uploads/2020/02/Instr\\_SIB-NAFOR-2-463-598836.pdf](https://rbpharm.ru/wp-content/uploads/2020/02/Instr_SIB-NAFOR-2-463-598836.pdf)).

**Статистический анализ.** Все опыты проводили в трех биологических и трех-четырёх аналитических повторах. Статистическую обработку выполняли с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0 (“StatSoft, Inc.”, США). Статистические сравнения выборочных средних проводили с использованием критерия Стьюдента. На рисунках и в таблицах представлены средние значения ( $M$ ) и их стандартные отклонения ( $\pm SD$ ) при  $P = 0.95$ .

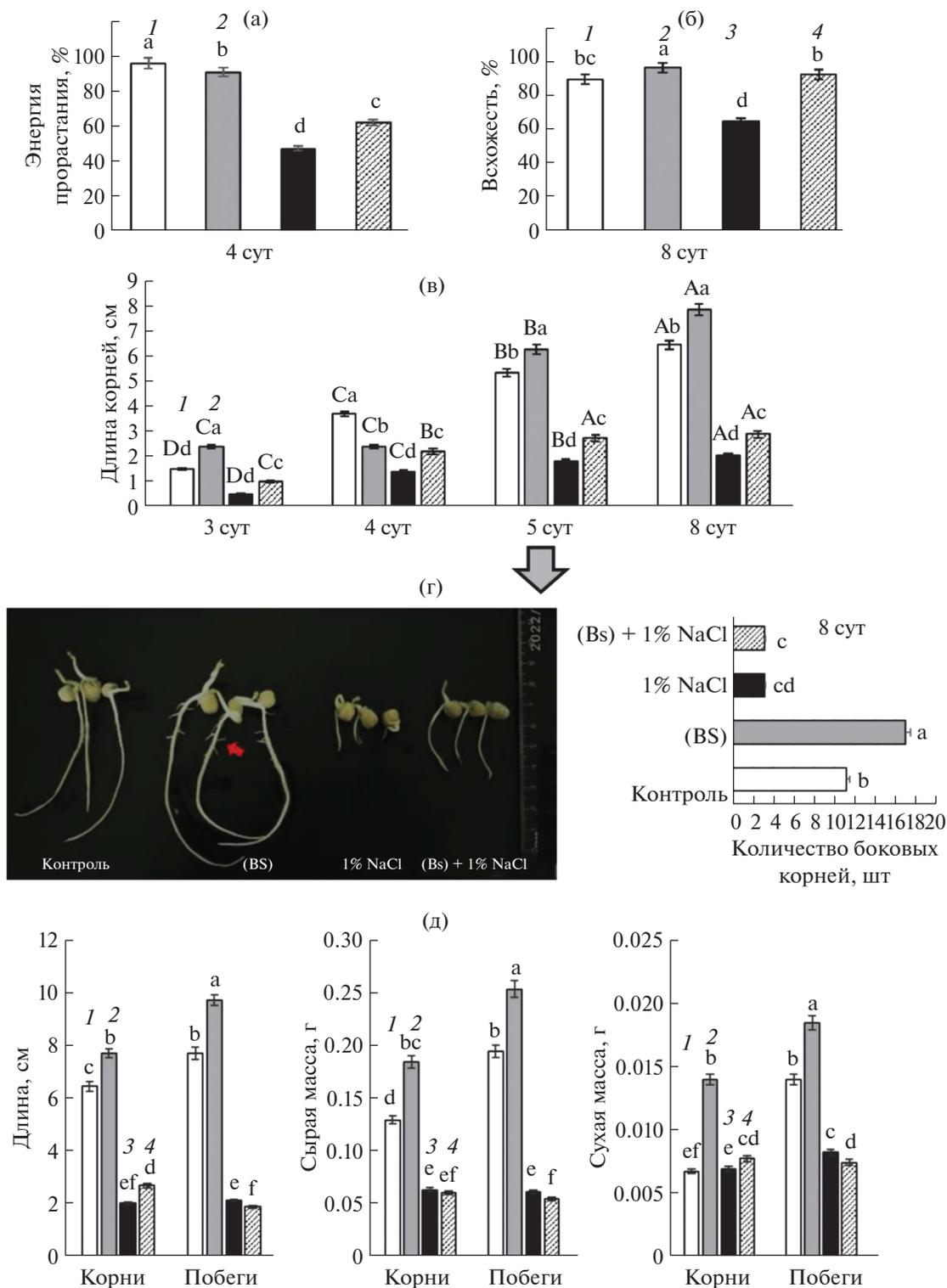
## РЕЗУЛЬТАТЫ

В нормальных условиях произрастания была выявлена четкая тенденция к увеличению под влиянием предобработки *B. subtilis* 10-4 длины корней, побегов, а также сырой и сухой массы

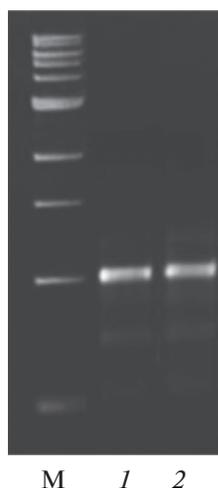
проростков гороха (рис. 1). Интересно, что в норме при инокуляции *B. subtilis* 10-4 у проростков гороха на 3-и сутки длина корня превышала на 60% длину корней контрольных небактеризованных проростков. Но затем, к 4-ым суткам, темп роста корня бактеризованных проростков замедлился по сравнению с ростом корня контрольных проростков (рис. 1в). Однако, начиная с 5-ых суток и далее, вновь наблюдалось увеличение длины корней и побегов по сравнению с контролем. Причем, на 5-е сутки у бактеризованных вариантов отмечено появление боковых корней (тогда как в контроле их еще не наблюдалось) и возобновлялся рост в длину (рис. 1в).

Обнаружено, что присутствие в среде выращивания гороха 1% хлорида натрия (засоление) приводило к снижению энергии прорастания (на 50%) (рис. 1а), всхожести (на 40%) (рис. 1б), линейных размеров корней (на 68%) и побегов (на 72%), а также снижению накопления их сырой и сухой массы (рис. 1в–д) в сравнении с контрольными вариантами. В то же время предобработка *B. subtilis* 10-4 способствовала снижению повреждающего действия засоления на энергию прорастания (рис. 1а), всхожесть (рис. 1б) и рост корней проростков гороха (рис. 1в). В частности, по сравнению с контрольными (небактеризованными) проростками в условиях засоления в предобработанных *B. subtilis* 10-4 вариантах энергия прорастания и всхожесть семян при стрессе увеличивались до 59–63% (при контроле 48%) (рис. 1а) и до 94% (при контроле 66%) (рис. 1б), длина корней бактеризованных проростков к 8-ым суткам составляла 2.8 см (на 40% больше, чем в контроле) (рис. 1в, г). Кроме того, было выявлено увеличение (на 14%) сухой массы корней у предобработанных *B. subtilis* 10-4 и выращенных в присутствии засоления проростков гороха (рис. 1д). Вместе с тем несмотря на то, что в условиях засоления бактеризованные проростки гороха характеризовались более длинными корнями и сухой массой по сравнению с небактеризованными, в длине побегов существенной разницы от контроля не было выявлено (рис. 1д). На протяжении всего эксперимента также не наблюдалось и существенного влияния бактерий *B. subtilis* 10-4 на сырую массу корней, побегов и сухую массу побегов при засолении.

Далее была проведена работа по подтверждению эндофитности бактерий *B. subtilis* 10-4, то есть их способности населять внутренние ткани проростков гороха. Так, из поверхностно стерилизованных корней проростков гороха, предобработанных штаммом *B. subtilis* 10-4, были получены чистые культуры бактерий, которые идентифицировали с помощью RAPD-ПЦР анализа. На основе сравнения полученных электрофореграмм с RAPD-профилем исходного штамма *B. subtilis* 10-4 была установлена идентичность выделенных из



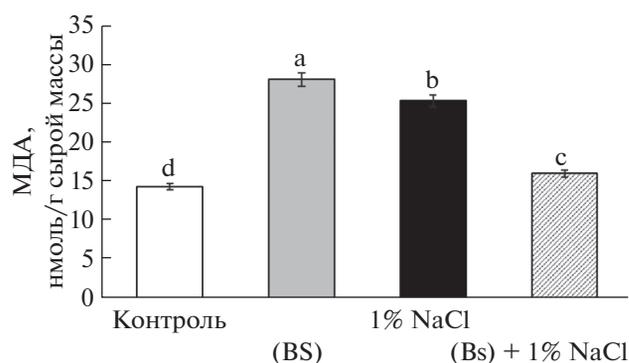
**Рис. 1.** Влияние *B. subtilis* 10-4 (BS) на энергию прорастания (а), всхожесть (б), длину корней (в), количество боковых корней (г), а также длину побегов и накопление сырой и сухой массы корней и побегов (д) проростков гороха, произраставших в норме и при натрий-хлоридном засолении (1% NaCl). 1 – контроль, 2 – (BS), 3 – 1% NaCl, 4 – (BS) + 1% NaCl. Красной стрелкой указано начало формирования боковых корней у проростков гороха на 5-е сутки выращивания. Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов в один и тот же момент времени различаются при  $P < 0.05$ . Различные заглавные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для каждого варианта обработки в разные моменты времени различаются при  $P < 0.05$ .



**Рис. 2.** Сравнительный анализ ДНК чистых культур бактерий, полученных из внутренних тканей корня проростков гороха, семена которых были обработаны штаммом *B. subtilis* 10-4, и исходного штамма. Электрофореграмма ПААГ после RAPD-ПЦР анализа: М – ДНК маркер; 1 – ДНК исходного штамма *B. subtilis* 10-4; 2 – ДНК бактерии, выросшей вокруг поверхностно стерилизованных инокулированных *B. subtilis* 10-4 сегментов гороха.

внутренних тканей предобработанных проростков бактерий с исходным штаммом *B. subtilis* 10-4 (рис. 2). Кроме того, получены данные о способности штамма 10-4 продуцировать ИУК, сидерофоры, фиксировать атмосферный азот (табл. 1), вносящих важный вклад в стимуляцию ростовых процессов растений этими бактериями (рис. 1).

Обнаружено почти двукратное повышение уровня ПОЛ (о чем судили по содержанию МДА) в 4-суточных проростках гороха в условиях засоления (рис. 3). Предобработка *B. subtilis* 10-4 существенно снижала уровень стресс-индуциро-



**Рис. 3.** Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 (BS) на содержание МДА в 4-суточных проростках гороха в норме и при засолении. Время воздействия стресса (1% NaCl – 24 ч). Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов различаются при  $P < 0.05$ .

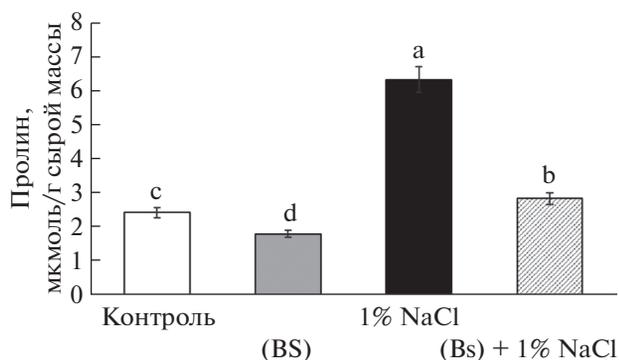
ванного накопления МДА, что свидетельствует об ослаблении окислительных повреждений клеток у этих проростков. Однако интересно, что в нормальных условиях произрастания повышенный уровень МДА наблюдался в предобработанных штаммом 10-4 проростках по сравнению с контролем (рис. 3), но при этом сопровождался усиленным ростом корней в длину (рис. 1в–д), увеличением как сырой, так и сухой массы корней, и что важно – усилением развития боковых корней (рис. 1г, д).

Установлено, что в корнях стрессированных проростков гороха без бактериальной обработки содержание осмопротектанта пролина было почти в 3 раза выше, чем в контроле без стресса (рис. 4). В то же время, как в нормальных условиях произрастания, так и в условиях засоления предобра-

**Таблица 1.** Некоторые рост-стимулирующие (PGP) характеристики и физико-химические свойства штамма *Bacillus subtilis* 10-4

Параметры	штамм <i>Bacillus subtilis</i> 10-4
ИУК, мг/л	$5.80 \pm 0.2$
Продукция сидерофоров, см	$1.20 \pm 0.1$
Солюбилизация фосфатов, мг/л	–
Фиксация атмосферного азота, мкг $N_2$ /(мл ч)	$0.08 \pm 0.02$
Оксидазная активность	–
Каталазная активность	+
$\beta$ -галактозидазная активность	–
Уреазная активность	+
Фенилаланин-дезаминазная активность	–
Реакция Фогеса-Проскауэра	+

Примечание: “+” положительная реакция (активность детектируется тестом); “–” отрицательная реакция (активность отсутствует).



**Рис. 4.** Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 на содержание пролина в 4-суточных растениях гороха в норме и при засолении. Время воздействия стресса (1% NaCl – 24 ч). Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов различаются при  $P < 0.05$ .

ботка *B. subtilis* 10-4 способствовала снижению содержания пролина на 26% и 47% соответственно, в сравнении с небактеризованными вариантами (рис. 4).

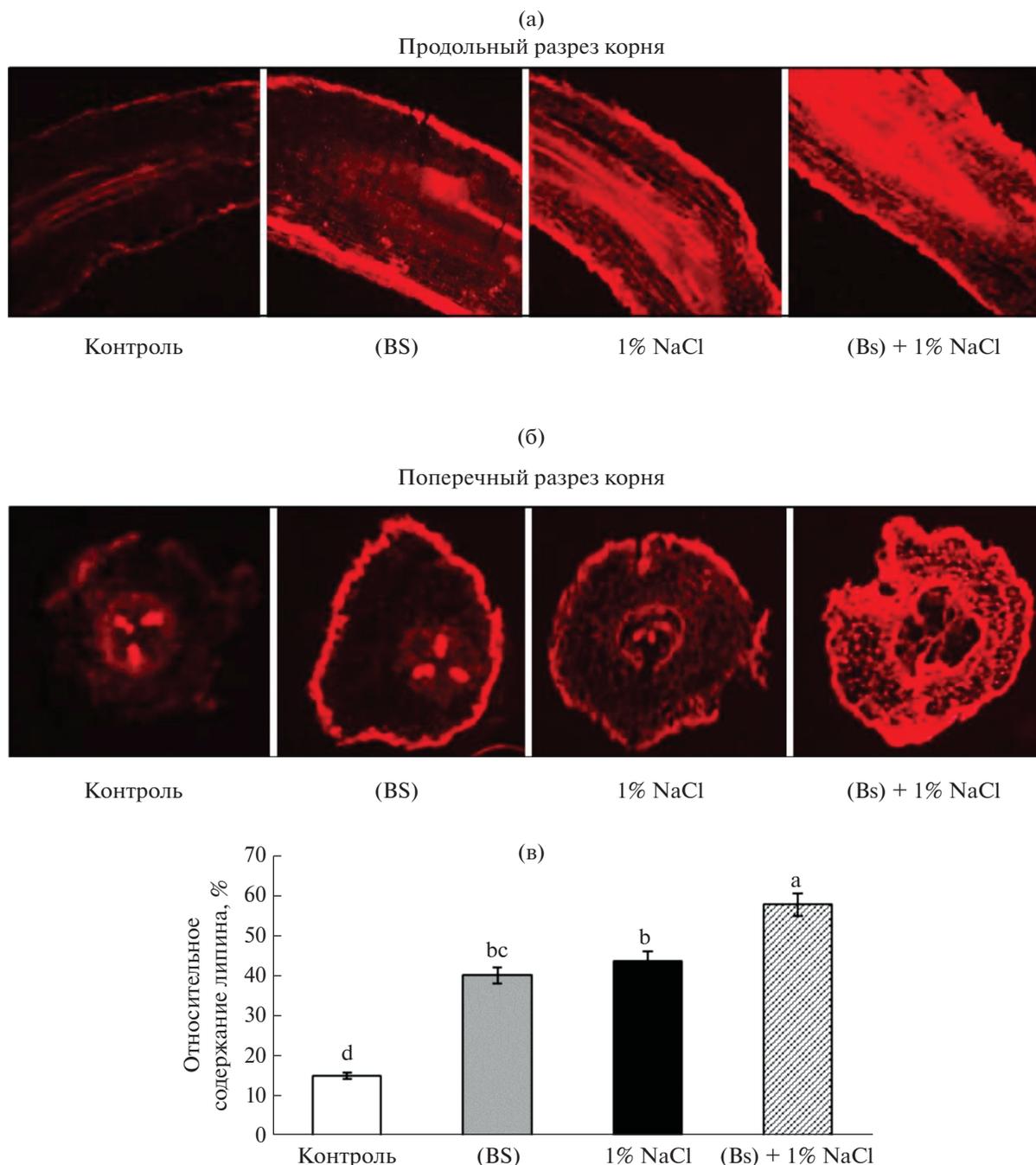
Помимо осмотических и окислительных повреждений клеток растений, засоление также оказывает существенное влияние на клеточную стенку, укреплению которой способствует процесс лигнификации. В связи с этим нами был проведен сравнительный анализ отложения лигнина на продольных и поперечных срезах базальной части корней проростков гороха, предобработанных *B. subtilis* 10-4 и подвергнутых натрий-хлоридному засолению. Выявлено, что воздействие засоления усилило лигнификацию в корнях растений гороха по сравнению с контрольными вариантами, растущими в норме. При этом, накопление лигнина происходило как во внутренних центральных цилиндрах, так и по всей периферии внешней оболочки корня (рис. 5), что может указывать на повышение защитных реакций растений в ответ на воздействие стрессового фактора (1% NaCl). Предобработка *B. subtilis* 10-4 способствовала дополнительному усилению отложения лигнина в корнях по сравнению с небактеризованными вариантами. Следует отметить, что в норме штамм 10-4 также способствовал интенсификации отложения лигнина в корнях в сравнении с небактеризованным контролем. Таким образом, важный вклад в индуцированное штаммом 10-4 повышение устойчивости проростков к засолению вносит их способность еще до воздействия стрессора ускорять отложение лигнина в клеточных стенках корней, что, однако, не препятствует проявлению рост-стимулирующего действия штамма в ходе предобработки, вероятно, благодаря способности продуцировать ауксины и другие метаболиты с рост-регулирующими свойствами (табл. 1).

Совокупность полученных результатов демонстрирует способность *B. subtilis* 10-4 при предпо-

севном способе обработки стимулировать ростовые процессы растений гороха в нормальных условиях и оказывать защитный эффект на прорастание и всхожесть семян, на рост корней и целое растение в условиях засоления. Получены приоритетные данные о важной роли эндофитных бактерий *B. subtilis* 10-4 в процессе лигнификации клеток корней гороха, что вносит важный вклад в снижение токсического действия соли на растения.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Применение полезных эндофитных PGPB *B. subtilis* может являться важным подходом для повышения выживаемости растений в стрессовых условиях, включая засоление. В настоящее время приходится констатировать, что положительный эффект от применения микробных биопрепаратов в растениеводстве проявляется далеко не всегда, и в большой степени результат определяется особенностями генотипов симбиотических партнеров. Выявленное в условиях засоления торможение роста проростков гороха было ожидаемым и согласуется с имеющимися в литературе данными [2, 10, 30, 31]. Снижение стресса под влиянием инокуляции гороха эндофитными бактериями также совпадает с имеющимися данными о благотворном влиянии PGPB на рост и развитие различных видов растений в условиях абиотических стрессов [3–5, 12, 30], включая засоление [10, 31, 32]. Однако результаты взаимодействия штамма 10-4 с растениями гороха, и, в частности, с районированным сортом гороха Памяти Хангильдина, а также их влияние на лигнификацию корней растений представлены впервые. Выявленная способность штамма 10-4 стимулировать рост главного и боковых корней в условиях засоления (рис. 1в, г) свидетельствует о том, что бактеризованные растения гороха были защищены от стресса (в сравнении с небактеризованными) и продолжали получать питание и воду. Недолговременное торможение роста корня в длину относительно контроля на 4-е сутки у бактеризованных проростков в норме могло быть связано с модуляцией штаммом 10-4 фитогормонального баланса в корнях [11, 13], перераспределением ресурсов в сторону побега и/или переходу к закладке боковых корней. Действительно, на 5-е сутки бактеризованные проростки имели сформировавшиеся боковые корни, тогда как в контроле их не было (рис. 1г). Разные генотипы растений могут по-разному отзываться на инокуляцию разными штаммами бактерий, в частности, это может быть связано с особенностями бактериальных штаммов [5]. Обнаруженные эффекты влияния штамма 10-4 на рост растений гороха (рис. 1) могут быть связаны с такими его характеристиками как продукция ИУК, сидерофоров, а также фиксацией



**Рис. 5.** Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 на отложение лигнина в корнях 8-суточных растений гороха сорта Памяти Хангильдина в нормальных условиях произрастания и при засолении. Время воздействия стресса (1% NaCl – 96 ч). На снимках представлены продольные (а) и поперечные (б) срезы корней, визуализированные с помощью флуоресцентного сканирующего микроскопа Biozero BZ-8100E (Keyence Co., Осака, Япония). Количественное определение содержания лигнина по степени окраски (в) проводили с использованием программного обеспечения для обработки изображений ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). В каждом варианте опыта оценивалось по четыре среза в трехкратной повторности. Различные строчные буквы в верхней части столбцов указывают на то, что средние значения для различных вариантов различаются при  $P < 0.05$ .

атмосферного N (табл. 1), модулирующих реакцию растений и ответственных за установление взаимодействия между растениями и микробами [5]. В частности, способность *B. subtilis* 10-4 улучшать всхожесть, прорастание семян и рост расте-

ний гороха в норме и при засолении (рис. 1), вероятно, связана с продукцией ауксинов, играющих важную роль в регуляции деления клеток, пролиферации и дифференцировке клеток и тканей, развитии сосудистых тканей, удлинении кле-

ток и апикальном доминировании в растениях. В целом, увеличение длины корней позволяет растениям улучшить поглощение микро-/макроэлементов, ускорять рост и формировать стрессоустойчивость. Сообщалось, что *Bacillus* sp. используют продуцируемые ауксины для взаимодействия с растениями в рамках их стратегии колонизации, включая фитостимуляцию и обход основных защитных механизмов растений [5]. Очевидно, влияние эндофитных *B. subtilis* 10-4, обусловившее выживание растений гороха при засолении, также могло быть связано с изменением гормонального статуса и архитектуры корней с более глубокой и разветвленной корневой системой, обеспечивающей растения водой для лучшего роста и развития.

Колонизация бактериями эндоризосферы является одним из важнейших доказательств их эндофитных свойств и фактором, влияющим на биологическую активность в растительно-микробных отношениях [16, 17]. Идентичность RAPD-профилей бактерий, выделенных из поверхностно стерилизованных растений, семена которых были предобработаны штаммом 10-4, и RAPD-профиля исходного штамма (рис. 2) являлась доказательством их эндофитности. Ранее эндофитность данного штамма была подтверждена при взаимодействии с растениями фасоли [4] и пшеницы [14]. Колонизация эндофитами на начальном этапе взаимодействия обычно вызывает у растений иммунный ответ, сходный с таковым против патогенов, но позже мутуалисты избегают защитных реакций хозяина и способны успешно колонизировать растения [17]. Была высказана гипотеза, что одним из критериев для определения чувствительности хозяина к присутствию эндофитов может служить содержание в растительных тканях МДА [24]. Приводятся доказательства того, что увеличение количества МДА может свидетельствовать о процессах акклиматизации, а не только о повреждении мембран, поскольку МДА может активировать регуляторные гены, участвующие в защите и развитии растений в условиях окислительного стресса [22]. В литературе можно найти противоречивые сведения о содержании МДА в предобработанных эндофитами растениях в нормальных условиях. Так, в экспериментах с саженцами яблони было отмечено варьирование концентрации МДА в зависимости от инокуляции разными штаммами, при этом более высокий уровень симптомов окислительного стресса в одних случаях согласовывался с негативным влиянием штамма на рост побегов, в других – уровни МДА были сопоставимы с таковыми у штаммов, стимулирующих рост и пролиферацию побегов [33]. При инокуляции риса эндофитные бактерии вызывали контрастные реакции растений по уровню МДА, сохраняя при этом растения метаболически сбалансированными без признаков

угнетения роста [34]. Высокие уровни МДА были обнаружены в делящихся клетках в зоне пролиферации клеток кончика корня *Arabidopsis* [35]. Выявленное нами увеличение МДА в предобработанных штаммом 10-4 проростках гороха, вероятно, связано с системными перестройками под влиянием сигнальных факторов бактерий, запустивших адаптационные процессы растения, включая клеточное деление (появление боковых корней), благодаря продукции бактериями стимулирующих рост соединений (табл. 1). Для понимания сложных процессов окислительно-восстановительной биологии имеет значение баланс между продукцией, элиминацией и передачей сигналов МДА, обуславливающий выживаемость растений в условиях стресса [22]. Что касается снижения уровня стресс-индуцированного накопления МДА у бактериализованных растений, то подобные эффекты описаны в литературе и связываются со способностью PGPB к контролю уровня АФК за счет модуляции активности антиоксидантных ферментов и снижения окислительных повреждений, вызванных натрий-хлоридным засолением [10, 31, 32].

В ответ на засоление в растениях гороха было отмечено увеличение содержания пролина (рис. 4), что свидетельствует об активизации ферментов, участвующих в синтезе пролина, и может сопровождаться подавлением катаболизирующих ферментов. Проллин, играя важную роль в клеточном метаболизме, как в составе белков, так и в качестве свободной аминокислоты, проявляет определенные регуляторные функции во время синтеза белка и действует как сигнальная молекула во время развития растений [36]. Сообщалось о важной роли пролина в росте и жизненном цикле растений путем регуляции генов циклина, общего синтеза белка [23], а также в координации биосинтеза лигнина [37]. В литературе имеются противоречивые сведения о воздействии PGPB на осмотиты разных растений и при разных стресс-факторах. К примеру, инокуляция растений *B. cereus* BST YS1\_42 повышала содержание пролина в норме, но приводила к снижению в условиях солевого стресса [10]. Инокуляция нута при солевом стрессе бактериями *B. subtilis* приводила к меньшему содержанию пролина, чем в инокулированных растениях [30]. В инокулированных *B. subtilis* 10-4 растениях гороха в норме концентрация пролина была ниже, чем в неинокулированных (рис. 4). Это может быть связано с расходом пролина для поддержания водного баланса тканей, белкового обмена или синтеза других соединений, вовлеченных в положительную регуляцию роста и развития, а также преадаптацию растений к последующим возможным стрессам, приводящим к водному дефициту. Аналогичные результаты в стрессовых условиях были получены Gupta с соавт. [10], которые продемонстрировали,

что инокуляция *B. cereus* BST YS1\_42 и *B. marisfavi* CHR JH 203 предотвращала вызываемое засолением накопление пролина в растениях гороха и оказывала защитный эффект на их рост; тогда как в норме, напротив, наблюдалось увеличение его накопления. Остается спорным вопрос: накопление пролина является симптомом стрессовых повреждений или показателем устойчивости к стрессу [38]. Неоднозначный характер связи между содержанием пролина и стресс-устойчивостью растений может быть обусловлен различной силой стрессовых воздействий в разных экспериментах и сложным взаимодействием пролина с другими стресс-протекторными системами, в частности, с ферментативной антиоксидантной системой [39]. Вероятно, выявленные нами изменения в содержании пролина в предобработанных штаммом 10-4 растениях гороха (рис. 4), наряду с ролью в осморегуляции, могут также принимать участие в защите структур различных биомолекул и мембран или действовать как поглотители свободных радикалов, защищая ДНК от повреждающего действия АФК [38]. Недавно появились сведения о том, что пролин может влиять на рост и развитие растений путем координации с биосинтезом лигнина [37]. Вероятно, выявленное нами в норме снижение содержания пролина в обработанных штаммом 10-4 растениях гороха (рис. 4), может быть связано с его вовлечением в опосредованные эндофитами процессы образования лигнина (рис. 5). Укрепление эндо- и экзодермального апопластических барьеров играет важную роль в защите клеточной стенки растений в целом при стрессах, включая натрий-хлоридное засоление [25]. Среди различных фенольных соединений клетки лигнина отвечает за придание механической прочности и долговечности тканей и важен для правильного роста и развития растений [25, 40] благодаря облегчению тока воды и поддержанию структурной целостности сосудов ксилемы во время стресса. Между тем, компромисс между ростом и защитой растений имеет основополагающее значение для оптимального роста и адаптации растений в меняющейся биотической/абиотической среде. Считается, что этот процесс включает перераспределение ресурсов по разным путям. Часто наблюдалось, что среди вторичных компонентов клеточной стенки изменение биосинтеза лигнина приводит к изменениям как в росте, так и в защите. Однако, как регулируется этот процесс, на сегодняшний день остается в значительной степени неясным и непредсказуемым из-за ограниченного понимания лежащих в их основе механизмов [25]. Имеются единичные сведения о влиянии PGPB на лигнификацию клеток растений. Например, *Pseudomonas aeruginosa* и *B. megaterium* защищали кукурузу от повреждений, вызванных засолением, наряду с усилением роста растений, регулированием содержания воды, по-

вышением содержания фенолов, флавоноидов и антиоксидантных ферментов, также и за счет лигнификации [40]. На примере фасоли была показана способность *B. subtilis* 10-4 повышать солеустойчивость растений, укрепляя клеточные стенки корней через отложение лигнина [4]. Однако сведениями о влиянии эндофитных PGPB на растения гороха в условиях натрий-хлоридного засоления к моменту начала нашей работы мы не располагали. Выявленное существенное усиление лигнификации в клеточных стенках корней гороха при предобработке штаммом 10-4 при засолении (рис. 5) свидетельствует о важном вкладе этих бактерий в укрепление барьерных свойств растений и снижении поступления в них токсических ионов. Кроме того, очевидно, что в выявленное повышение устойчивости проростков гороха к хлориду натрия, индуцированное *B. subtilis*, существенный вклад вносит способность бактерий еще до воздействия стрессора ускорять отложение лигнина в клеточных стенках корней, что, однако, не препятствует проявлению рост-стимулирующего действия этого штамма бактерии в ходе предобработки (рис. 1), вероятно, благодаря способности продуцировать ауксины и другие метаболиты с рост-регулирующими свойствами (табл.1). Кроме того, основываясь на сведениях о способности пролина влиять на рост и развитие растений путем координации с биосинтезом лигнина [37], можно предположить, что выявленное в норме снижение пролина в обработанных штаммом 10-4 растениях гороха (рис. 4) связано с его расходованием бактериями при регуляции образования лигнина (рис. 5). Очевидно, что вовлечение штамма 10-4 в регуляцию образования лигнина вносит важный вклад в защиту растений от осмотических (пролин) (рис. 4) и окислительных (МДА) (рис. 3) повреждений клеток при засолении благодаря корням, имеющим прочный барьер, препятствующий проникновению токсичных ионов в клетки. Эти эффекты, безусловно, требуют дальнейшего тщательного изучения.

В целом, совокупность полученных результатов демонстрирует способность эндофитных бактерий *B. subtilis* 10-4 при предпосевном способе обработки стимулировать ростовые процессы проростков гороха в норме и оказывать протекторный эффект на прорастание и всхожесть семян, а также на рост корней при солевом стрессе. Получены приоритетные данные о важном вкладе *B. subtilis* 10-4 в процесс лигнификации клеточных стенок корней гороха и снижении токсического действия натрий-хлоридного засоления на растения. Это, в свою очередь, отразилось в снижении вызываемых засолением окислительных и осмотических повреждений клеток в предобработанных штаммом 10-4 проростках гороха, о чем судили по содержанию в них МДА и пролина, соответственно. Выявленные свойства бактеризован-

ных растений обеспечивать рост растений в условиях засоления впервые были связаны не только со способностью бактерий продуцировать ауксины и другие регулирующие рост соединения, но и индуцировать в растениях лигнификацию, при которой клеточные стенки получили дополнительную барьерную защиту, а корни продолжили рост при формировании боковых корней. Полученные новые сведения представляют интерес для дальнейшего пристального внимания и углубленных исследований в этом направлении для более полного использования потенциала эндофитных бактерий *B. subtilis* в экологически ориентированных технологиях выращивания гороха, особенно в условиях неблагоприятных стресс-факторов, включая засоление.

Работа выполнена в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования РФ (№ АААА-А21-121011990120-7 и № АААА-А19-119021890030-4) с использованием оборудования Центра коллективного пользования "Агидель" и Уникальных научных установок "Кодинк" Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mukhopadhyay R., Sarkar B., Jat H.S., Sharma P.C., Bolan N.S. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security // J. Environ. Manage. 2021. V. 280: e111736. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111736>
2. Isayenkov S.V., Maathuis F.J. Plant salinity stress: many unanswered questions remain // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: e80. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
3. Numan M., Bashir S., Khan Y., Mumtaz R., Shinwari Z.K., Khan A.L., Khan A., AL-Harrasi A. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review // Microbiol. Res. 2018. V. 209. P. 21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
4. Lastochkina O., Aliniaiefard S., Garshina D., Garipova S., Pusenkova L., Allagulova Ch., Fedorova K., Baymiey A., Koryakov I., Sobhani M. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages // J. Plant Physiol. 2021. V. 263: e153462. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153462>
5. Lastochkina O. *Bacillus subtilis*-mediated abiotic stress tolerance in plants // *Bacilli* and agrobiotechnology: phytostimulation and biocontrol / Eds. M.T. Islam et al. Springer. 2019. P. 97. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_6)
6. Benedetto N.A., Corbo M.R., Campaniello D., Cataldi M.P., Bevilacqua A., Sinigaglia M., Flagella Z. The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat // AIMS Microbiol. 2017. V. 3. P. 413. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>
7. Abd El-Daim I.A., Bejai S., Fridborg I., Meijer J. Identifying potential molecular factors involved in *Bacillus amyloliquefaciens* 5113 mediated abiotic stress tolerance in wheat // Plant Biol. 2018. V. 20. P. 271. <https://doi.org/10.1111/plb.12680>
8. Abd El-Daim I.A., Bejai S., Meijer J. *Bacillus velezensis* 5113 induced metabolic and molecular reprogramming during abiotic stress tolerance in wheat // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 16282. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52567-x>
9. Blake C., Christensen M.N., Kovács Á. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis* // MPMI. 2021. V. 34. P. 15. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
10. Gupta A., Bano A., Rai S., Kumar M., Ali J., Sharma S., Pathak N. ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in *Pisum sativum* // Biotech. 2021. V. 11: e514. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03047-5>
11. Eichmann R., Richards L., Schäfer P. Hormones as go-betweens in plant microbiome assembly // Plant J. 2021. V. 105. P. 518. <https://doi.org/10.1111/tpj.15135>
12. Shobana N., Sugitha T., Sivakumar U. Plant growth-promoting *Bacillus* sp. cahoots moisture stress alleviation in rice genotypes by triggering antioxidant defense system // Microbiol. Res. 2020. V. 239: e126518. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126518>
13. Barnawal D., Bharti N., Pandey S.S., Pandey A., Chanoitiya C.S., Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria enhances wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and *TaCTR1/TaDREB2* expression // Physiol. Plant. 2017. V. 161. P. 502. <https://doi.org/10.1111/ppl.12614>
14. Lastochkina O., Pusenkova L., Yuldashev R., Babaev M., Garipova S., Blagova D., Khairullin R., Aliniaiefard S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 121. P. 80. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.020>
15. Vasileva E.N., Akhtemova G.A., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture // Ecological Genetics. 2019. V. 17. P. 19. <https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>
16. Pandey P.K., Singh M.C., Singh S.S., Kumar M., Pathak M., Shakywar R.C., Pandey A.K. Inside the plants: endophytic bacteria and their functional attributes for plant growth promotion // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2017. V. 6. P. 11. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.002>
17. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial

- endophytes // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015. V. 79. P. 293.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
18. *Tikhonovich I.A., Andronov E.E., Borisov A.Yu., Dolgikh E.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Provorov N.A., Rummyantseva M.L., Simarov B.V.* The principle of complementarity of genomes in expanding the adaptive potential of plants // *Genetics*. 2015. V. 51. P. 973.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795415090124>
  19. *Vasileva E.N., Akhtemova G.A., Afonin A.M., Borisov A.Yu., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A.* Culturable endophytic bacteria from stems and leaves of garden pea (*Pisum sativum* L.) // *Ecological Genetics*. 2020. V. 18. P. 169.  
<https://doi.org/10.17816/ecogen17915>
  20. *Гарипова С.Р., Маркова О.В., Гарифуллина Д.В., Иванчина Н.В., Хайруллин Р.М.* Региональная коллекция бактериальных эндофитов клубеньков бобовых растений как основа создания биопрепаратов для агробиотехнологии // *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. 2017. Т. 3. С. 56.
  21. *Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Fujita M., Fotopoulos V.* Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator // *Antioxidants*. 2020. V. 9. P. 681.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
  22. *Morales M., Munné-Bosch S.* Malondialdehyde: Facts and Artifacts // *Plant Physiol.* 2019. V. 180. P. 1246.  
<https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
  23. *Kavi K.P.B., Hima K.P., Sunita M.S., Sreenivasulu N.* Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 66: e544.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
  24. *Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M.A., Iksanova M.A., Kamaletdinova A.A., Lastochkina O.V., Pusenkova L.I.* Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria // *Acta Physiol. Plant.* 2022. V. 44. P. 89.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-022-03427-1>
  25. *Xie M., Zhang J., Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., Chen J.-G., Muchero W.* Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1427.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01427>
  26. *Гарипова С.Р., Маркова О.В., Вахитова Р.К., Гарифуллина Д.В., Каримов И.К., Давлетов Ф.А.* Сравнение морфометрических показателей симбиоза, продуктивности и устойчивости к корневым гнилям и плодовой гнили у усатых и листочковых сортов гороха в условиях Предуралья // *Вестник Башкирского университета*. 2015. Т. 20. С. 460.
  27. *Heath R.L., Packer L.* Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. V. 125. P. 189.  
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
  28. *Bates L.S., Waldern R.P., Teare D.* Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205.  
<https://doi.org/10.1007/BF00018060>
  29. *Фурцев Г.Г.* Методы анатомо-гистохимических исследований растений. Москва: Наука, 1979. 155 с.
  30. *Abd Allah E.F., Alqarawi A.A., Hashem A., Radhakrishnan R., Al-Huqail A.A., Al-Otibi F.O.N., Malik J.A., Alharbi R.I., Egamberdieva D.* Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms // *J. Plant Inter.* 2018. V. 13. P. 37.  
<https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1414321>
  31. *Gupta A., Rai S., Bano A., Khanam A., Sharma S., Pathak N.* Comparative evaluation of different salt-tolerant plant growth-promoting bacterial isolates in mitigating the induced adverse effect of salinity in *Pisum sativum* // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2021. V. 11. P. 13141.  
<https://doi.org/10.33263/briac115.1314113154>
  32. *Sofy M.R., Aboeidah A.A., Heneidak S.A., Ahmed H.R.* ACC deaminase containing endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Pisum sativum* through reduced oxidative damage and induction of antioxidative defense systems // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021. V. 28. P. 40971.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-13585-3>
  33. *Tamošiūnė I., Staniėnė G., Haimi P., Stanys V., Rugienius R., Baniulis D.* Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. modulate apple shoot growth, cellular redox balance, and protein expression under *in vitro* conditions // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9: e889.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00889>
  34. *Deivanai S., Bindusara A.S., Prabhakaran G., Bhore S.J.* Culturable bacterial endophytes isolated from Mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in rice // *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2014. V. 5. P. 437.  
<https://doi.org/10.4103/0976-9668.136233>
  35. *Schmid-Siegert E., Loscos J., Farmer E.E.* Inducible malondialdehyde pools in zones of cell proliferation and developing tissues in Arabidopsis // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 8954.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322842>
  36. *Wang G., Zhang J., Wang G., Fan X., Sun X., Qin H., Xu N., Zhong M., Qiao Z., Tang Y., Song R.* Proline responding plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 2582.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.125559>
  37. *Guan C., Cen H.F., Cui X., Tian D.Y., Tadesse D., Zhang Y.W.* Proline improves switchgrass growth and development by reduced lignin biosynthesis // *Sci. Rep.* 2019. V. 9: e20117.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56575-9>
  38. *Moura J.C.M.S., Bonine C.A.V., Viana J.O.F., Dormelas M.C., Mazzafera P.* Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. P. 360.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>
  39. *Четина О.А., Еремченко О.З., Боталова Е.И., Середина А.М.* Изменение в содержании пролина в растениях при воздействии NaCl-засоления и щелочности корневой среды // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. Т. 6. С. 582.
  40. *Jha Y.* Cell water content and lignification in maize regulated by rhizobacteria under salinity // *Braz. J. Biol. Sci.* 2017. V. 4. P. 9.  
<https://doi.org/10.21472/bjbs.040702>