

ИНДУКЦИЯ СИСТЕМНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ РАПСА К ФИТОПАТОГЕНАМ МЕТАБОЛИТАМИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* И *PSEUDOMONAS AURANTIACA*

Ю.М. Кулешова, М.Н. Федорович, И.Н. Феклистова

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Индукция системной устойчивости растений к фитопатогенам (ISR) является широко распространенным природным явлением, которое интенсивно исследуется в последнее десятилетие. Повышенный интерес к данному эффекту объясняется не только его научной, но практической значимостью, поскольку расшифровка механизмов ISR открывает широкие перспективы для повышения эффективности и спектра действия препаратов защиты растений. В частности, различные штаммы *P. fluorescens* индуцируют развитие устойчивости у сахарной свеклы к красной гнили (*Colletotrichum falcatum*), у томатов – к фузариозу (*Fusarium oxysporum*), а у гороха – к корневой гнили (*P. ultimum*) и т.д. [1–3]. Растения, обработанные индуцирующими агентами, активируют множественные защитные ответы, которые выражаются в формировании химических и физических барьеров на пути проникновения и развития патогена, т.е. возникает индуцированная системная устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. Вместе с тем, детерминанты или так называемые элиситоры, синтезируемые бактериями и обуславливающие запуск каскада защитных реакций, исследованы недостаточно и встречаемые в литературе данные касаются, в основном, липополисахаридов и некоторых сидерофоров [3–5].

Интересно отметить, что непатогенные ризосферные бактерии *P. putida* КМБУ4308 и *P. aurantiaca* В-162, используемые для создания отечественных биопрепаратов («Немацид», «Аурин» и др.), отличаются комплексным действием: способны препятствовать поражению растений почвенными нематодами, стимулировать рост и обеспечивать защиту сельскохозяйственных культур от заболеваний как бактериальной, так и грибной этиологии. При этом обработка семенного материала культурой бактерий *P. putida* и *P. aurantiaca* при последующем искусственном заражении проростков спорами листовых фитопатогенов снижает поражаемость растений [6, 7].

Принимая во внимание вышеперечисленные данные, нами выдвинуто предположение, что антагонистическая активность бактерий *P. putida* и *P. aurantiaca* может проявляться не только при контакте вещества-антагониста с фитопатогеном, но и посредством индукции системной устойчивости растения к патогенам бактериальными метаболитами. Ранее было показано, что бактерии *P. aurantiaca* являются продуцентами антибиотиков феназинового ряда и гиббереллинов [8, 9], а *P. putida* – высокоактивных сидерофоров пиовердинов [10], вследствие чего указанные метаболиты были исследованы на способность индуцировать системную устойчивость (ISR) у растений рапса к комплексу фитопатогенов *A. Brassicae* (Berk.) Sacc. и *A. brassicicola* (Schw.) Wiltshire.

Методы исследования

Бактерии *P. putida* выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды Канедо [11], а *P. aurantiaca* – в питательном бульоне. Бактерий культивировали при 28°C в темноте с аэрацией в течение 48 ч.

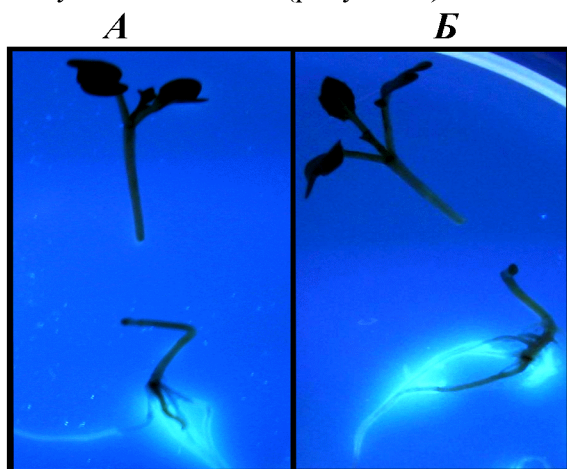
Колонизацию растений бактериями изучали с использованием бактериальных штаммов *P. putida* и *P. aurantiaca* В-162, маркированных устойчивостью к действию антибиотиков. Для этого в стерильную почву высевали семена растений, предварительно обработанные культурой маркированных бактерий. Растения культивировали 10 сут в светотеплице, после чего извлекали из почвы, тщательно отмывали корневую систему водой и помещали на чашки Петри с селективной агаризованной средой Канедо, содержащей соответствующий

антибиотик. В случае определения конкурентоспособности и выживаемости исследуемых бактерий в естественных условиях, инокулированные семена высевали в нестерильную почву. Выросшие растения извлекали из грунта спустя 3 мес культивирования.

Элиситорную активность бактериальных метаболитов исследовали в модельной системе искусственного заражения проростков рапса спорами фитопатогенных грибов. Для этого семена рапса стерилизовали и высаживали в стерильный почвогрунт, а на 5-е сут после посева почву обрабатывали раствором изучаемых метаболитов. После этого, для исключения возможности взаимодействия фитопатогена с исследуемыми соединениями, растения обильно опрыскивали стерильной водой. В случае изучения действия газообразных метаболитов, для предотвращения контакта с почвой и растениями, культуру бактерий вносили в стерильные емкости, находящиеся внутри контейнера с почвогрунтом. На 8-е сут проводили искусственное заражение проростков рапса спорами *Alternaria brassicae* и *Alternaria brassicicola*, вызывающих альтернариоз крестоцветных. Для этого растения опрыскивали суспензией, содержащей равные количества спор обоих видов грибов (примерно 5×10^4 спор/мл). Концентрацию спор определяли с использованием камеры Горяева. Эффективность действия элиситора оценивали на 15-е сут культивирования рапса, исходя из соотношения пораженных растений к их общему количеству в пробе.

Результаты и обсуждение

Для изучения способности почвенных бактерий *P. putida* и *P. aurantiaca* В-162 индуцировать системную устойчивость растений к листовым фитопатогенам на первом этапе исследования нами была изучена локализация бактерий *P. putida*, маркированных устойчивостью к канамицину, и *P. aurantiaca* В-162, обладающих природной устойчивостью к действию стрептомицина, на проростках рапса, табака и арабидопсиса. Установлено, что данные бактерии способны эффективно колонизировать корневую систему растений, но не надземную часть побега (рисунок 1).



Побеги разделены на две части для исключения перемещения бактерий вдоль стебля в конденсированной жидкости

Рисунок 1 – Колонизация корней растений бактериями *P. putida* (А) и *P. aurantiaca* (Б)

На рисунке видно, что устойчивые к действию антибиотиков бактерии способны расти, выделяя при этом в среду флуоресцирующие пигменты, лишь в прикорневой зоне растения. Надземная же часть стебля и листья проростков рапса оставались свободными от исследуемых бактерий. Подобная же картина наблюдалась при исследовании колонизации растений табака и арабидопсиса. Интересно отметить, что маркированные бактерии выделялись из ризосферы растений даже спустя 3 мес культивирования в нестерильной почве. Полученные результаты свидетельствуют о том, что аборигенная микрофлора, присутствующая в почве до посева обработанных семян, не вытесняет клетки бактерий *P. putida* и *P. aurantiaca* В-162. В то же время, указанные бактерии не были обнаружены на надземной части растений, что исключает прямой антагонистический эффект бактериальных метаболитов в случае снижения заражаемости растений спорами листовых фитопатогенов и свидетельствует о потенциальной возможности индукции системной устойчивости соединениями бактериального происхождения.

Для детального исследования способности бактериальных метаболитов индуцировать системную устойчивость растений в качестве модельной была выбрана система искусственного заражения проростков рапса спорами фитопатогенных грибов рода *Alternaria*, поскольку альтернариоз является одной из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний крестоцветных культур [12]. Нами учитывалось, что на листьях рапса, инфицированных в природных условиях, одновременно присутствуют споры изолятов двух видов фитопатогенных грибов: *A. brassicae* и *A. brassicicola* [13]. Поэтому заражение проводили смесью спор обоих видов, взятых в равной концентрации.

В качестве элиситоров были использованы пиовердины, феназиновые антибиотики, гиббереллины, внеклеточные метаболиты (культуральная жидкость, освобожденная от клеток), а также комплекс внутриклеточных веществ (дизинтегрированные клетки). В контрольных пробах почву обрабатывали средой Канедо (в экспериментах с использованием метаболитов *P. putida*), а в экспериментах с продуктами метаболизма *P. aurantiaca* – питательным бульоном. Для получения наиболее достоверных результатов введен контроль, предполагающий обработку водой.

Было установлено, что обработка почвы в прикорневой зоне пятисуточных проростков рапса каждым из исследуемых видов бактериальных метаболитов вызывает понижение поражаемости растений на 24–42% в зависимости от используемого индуктора устойчивости (таблица 1).

Таблица 1 – Степень заражения альтернариозом* растений рапса, обработанных бактериальными метаболитами

Вариант обработки	Количество пораженных растений, %	Вариант обработки	Количество пораженных растений, %
контроль (вода)	63,4	питательный бульон	65,3
среда Канедо	58,0	гиббереллины (<i>P. aurantiaca</i>)	35,5
пиовердины (<i>P. putida</i>)	33,4	феназины (<i>P. aurantiaca</i>)	33,0
культуральная жидкость <i>P. putida</i>	25,8	культуральная жидкость <i>P. aurantiaca</i>	36,3
дизинтегрированные клетки <i>P. putida</i>	27,9	дизинтегрированные клетки <i>P. aurantiaca</i>	23,2

Примечание. * – заражение проростков рапса проводили смесью спор *A. brassicae* и *A. brassicicola*.

Поскольку использованная нами система проведения исследования позволила пространственно разделить элиситоры бактериального происхождения и фитопатогенные агенты, то приведенные результаты позволяют сделать вывод об индукции системной устойчивости у растений рапса бактериальными метаболитами. При этом наименьший процент поражаемости наблюдался у растений, выращенных на почве, обработанной продуктами дезинтеграции бактериальных клеток *P. aurantiaca* (23%) и *P. putida* (28%); в то время как в контрольных выборках с использованием бульона и воды альтернариозом поражалось более 60% побегов. Незначительное снижение поражаемости рапса, выращенного на почве, содержащей минимальную солевую среду Канедо, может объясняться наличием в составе последней натриевой соли янтарной кислоты, которая может влиять на ростовые процессы растений. Высокая элиситорная активность разрушенных клеток вызвана, очевидно, высокой концентрацией остатков клеточной стенки и липосахаридов в изучаемом комплексе метаболитов. В случае дезинтеграции бактериальных

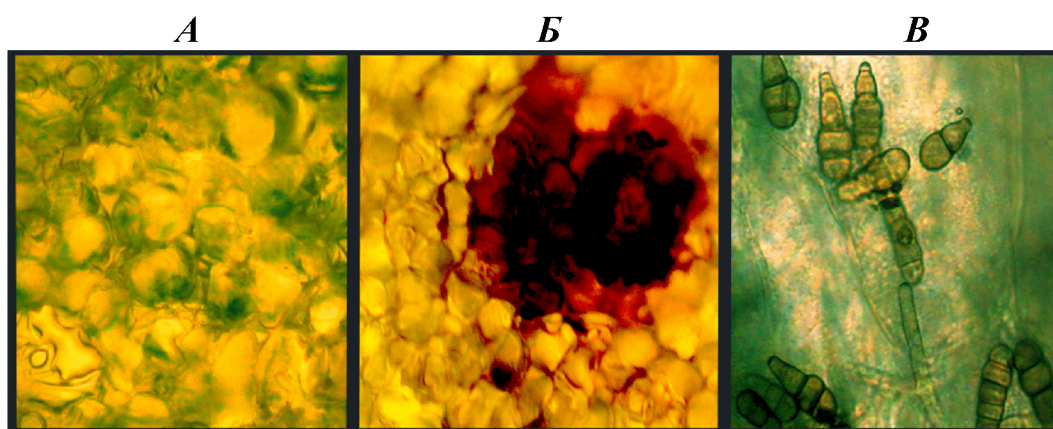
клеток *P. aurantiaca* в раствор также попадали внутриклеточные феназиновые пигменты и их предшественники, что также привело к увеличению активности полученной суспензии.

Из исследованных веществ, синтезируемых бактериями *P. putida* наибольшей элиситорной активностью обладал комплекс внеклеточных метаболитов (культуральная жидкость, освобожденная от клеток): наблюдалось снижение количества пораженных растений до 25,8%, в то время как обработка почвы раствором чистого пиовердина приводила к снижению зараженных проростков до 33,4% (таблица 1). Очевидно, в нативной культуральной жидкости *P. putida* содержатся вещества, усиливающие элиситорные способности пиовердина, либо дополнительные индукторы ISR.

При обработке почвы бесклеточной культуральной жидкостью *P. aurantiaca* количество пораженных проростков было незначительно выше (36,3%), чем таковое при использовании очищенных феназинов (33,0%). Этот эффект можно объяснить тем, что концентрация очищенных феназинов в используемом растворе была несколько выше, чем в культуральной жидкости *P. aurantiaca* (60 мкг/мл и 10 мкг/мл, соответственно). Следует отметить, что в случае использования дезинтегрированных клеток *P. aurantiaca* для активации механизмов ISR поражаемость проростков снижалась на 42%, тогда как при использовании феназинов – на 32,3%. Данная закономерность может быть связана с синтезом бактериями *P. aurantiaca* дополнительных внутриклеточных элиситоров.

Интересно отметить, что резистентность к возбудителям альтернариоза вызывают также и гиббереллины, синтезируемые *P. aurantiaca* – количество пораженных растений достигало 35,%, тогда как в контрольном варианте – 65,3%. Сведения о возможности индуцирования системной устойчивости с помощью фитогормонов получены впервые и в литературных источниках до настоящего времени отсутствовали.

Для контроля природы поражения была сделана микроскопия листьев растений, зараженных возбудителями альтернариоза (рисунок 2).



A – ткань здорового листа рапса; *B* – внешний вид альтернариозного поражения листа; *B'* – споры и мицелий в ткани листа, зараженного *A. brassicae* и *A. brassicicola*

Рисунок 2 – Альтернариозное поражение проростков рапса

Как видно из результатов, представленных на рисунке 2Б, споры *A. brassicae* и *A. brassicicola* прорастали и образовывали гифы в тканях растения, что приводило к образованию некротических пятен на листьях (рисунок 2Б). В случае обработки почвы бактериальными метаболитами большая часть растений оставалась здоровыми (рисунок 2А).

Известно, что газообразные вещества, синтезируемые некоторыми бактериями также могут выполнять роль элиситоров. В частности, находящийся в воздухе газообразный гормон этилен является потенциальным активатором возникновения устойчивости к болезням [14]. Также газообразные вещества, выделяемые *B. subtilis* GBO3 и

B. amyloquefaciens IN937a в воздухе, активируют ISR у *Arabidopsis* при заражении *E. carotovora* [1]. Учитывая имеющуюся информацию, в следующей серии экспериментов нами была исследована возможность активации механизмов ISR газообразными метаболитами бактерий *P. putida* и *P. aurantiaca*. Для этого в контейнеры с проростками рапса помещали емкости, содержащие двухсуточную живую культуру бактерий, а в контрольных экспериментах – воду. На стадии пятисуточных проростков рапс заражали споровой суспензией *A. brassicicola* и через 7 сут после заражения учитывали количество пораженных растений. Было установлено, что комплекс летучих метаболитов исследуемых представителей *Pseudomonas* способен снижать степень заражения растений спорами *A. brassicicola* на 21–33% (рисунок 3).

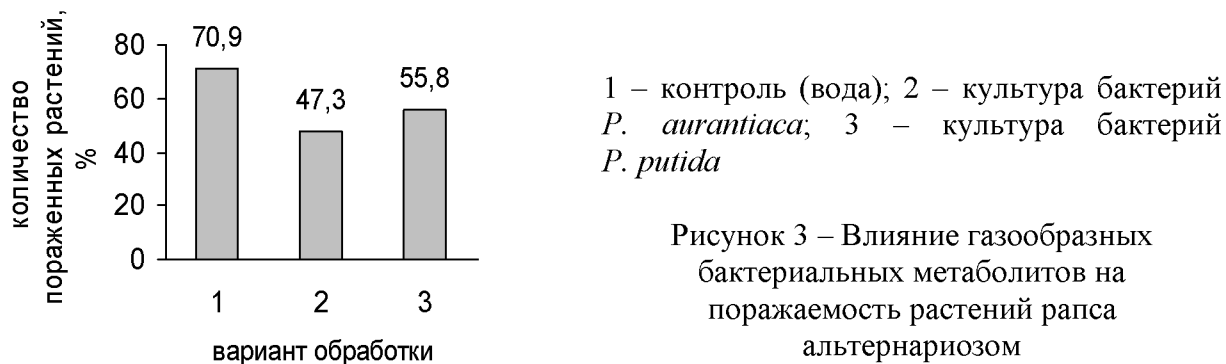


Рисунок 3 – Влияние газообразных бактериальных метаболитов на поражаемость растений рапса альтернариозом

Представленные на рисунке данные позволяют сделать вывод о выраженной элиситорной способности летучих соединений, синтезируемых непатогенными ризосферными бактериями *P. putida* и *P. aurantiaca*. Это, в свою очередь, значительно расширяет сферу использования биопрепаратов на основе данных микроорганизмов.

Выводы

В работе установлено, что ризосферные непатогенные бактерии *P. putida* и *P. aurantiaca* колонизируют корневую систему, но не надземную часть растений. Изучаемые бактерии не вытесняются аборигенной микрофлорой нестерильной почвы даже спустя 3 мес после инокуляции. Одним из механизмов фитопротекторной активности бактерий *P. putida* и *P. aurantiaca* является их способность синтезировать внутри- и внеклеточные метаболиты, индуцирующие системную устойчивость рапса к возбудителям альтернариоза. Показано, что пиовердины, феназиновые антибиотики, гиббереллины, комплекс газообразных соединений, внеклеточные метаболиты (культуральная жидкость, освобожденная от клеток), а также комплекс внутриклеточных веществ (дезинтегрированные клетки) способны индуцировать ISR и снижать заражение рапса фитопатогенными грибами рода *Alternaria* на 15–42%, в зависимости от используемого индуктора устойчивости.

Список литературы:

1. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future properties / S. Compant [at al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 9 – P. 4951–4959.
2. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response / D. De Vleeschauwer [at al.] // Plant Physiology. – 2008. – Vol. 148. – P. 1996–2012.
3. van Loon, L.C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria / L.C. van Loon, P.A.H.M. Bakker, C.M.J. Pieterse // Annu. Rev. Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – P. 453–483.
4. Induction of systemic resistance by *P. fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt using a novel bioassay / M. Leeman [at al.] // Eur. J. Plant. Pathol. – 1995. – Vol. 101. – P. 655–664.

5. Bioccontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *P. fluorescens* WCS374 / M. Leeman [at al.] // *Phytopathology*. – 1995. – Vol. 85. – P. 1301–1305.

6. Роль бактериального сидерофора пиовердина Pm в антагонистической активности *Pseudomonas putida* КМБУ 4308 по отношению к грибам рода *Alternaria nees* / Ю.М. Кулешова [и др.] // *Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География*. – 2008. – № 3. – С. 89–97.

7. Генетические подходы создания штаммов-продуцентов биологически активных соединений / Н.П. Максимова [и др.] // *Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем»*. – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С. 15–56.

8. Феклистова, И.Н. Синтез феназиновых соединений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // *Вест. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География*. – 2005. – № 2. – С. 66–69.

9. Феклистова, И.Н. Гиббереллины бактерий *Pseudomonas aurantiaca*: биологическая активность, подходы к получению и использованию продуцентов / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // *Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем: Труды Белорусского государственного университета*. – 2009. Т. 3., ч. 1. – С. 168–173.

10. Кулешова, Ю.М. Получение бактерий *P. putida* КМБУ 4308, способных к сверхпродукции пигмента пиовердина Pm / Ю.М. Кулешова, М.В. Камаева, Н.П. Максимова // *Вест. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География*. – 2006. – № 2. – С. 48–52.

11. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер – М: Мир, 1976. – 370 с.

12. Doullah, M.A.U. Development of an effective screening method for partial resistance to *Alternaria brassicicola* (dark leaf spot) in *Brassica rapa* / M.A.U. Doullah, M.B. Meah, K. Okazaki // *Eur. J. Plant pathol.* – 2006. – Vol. 116. – P. 33–43.

13. Humpherson-Jones, F.M. Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* / F.M. Humpherson-Jones, K. Phelps. // *Ann. appl. Biol.* – 1989. – Vol. 14. – P. 449–458.

14. Bacterial volatiles systemic resistance in *Arabidopsis* / С.-М. Ryu [at al.] // *Plan Physiol.* – 2004. – Vol. 134. – P. 1017–1026.

BACTERIAL METABOLITES OF *P. PUTIDA* AND *P. AURANTIACA* INDUCE SYSTEMIC RESISTANCE IN RAPE PLANTS TO PHYTHOPATHOGENIC FUNGI

Yu.M. Kuleshova, M.N. Fedorovich, I.N. Feklistova

Belarusian State University, Minsk, Belarus

It was established, that *P. putida* and *P. aurantiaca* bacteria induce systemic resistance in rape plants to phytopathogenic fungi by intracellular and extracellular metabolites. Pyoverdines, phenazine antibiotics, gibberellins, volatiles, complex of extracellular metabolites and disintegrated bacterial cells induce systemic resistance in rape plants to *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*.