

DOI 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-118

УДК 579.264:582.288:632.4

Шапошников Александр Иванович<sup>1</sup>, Вишневская Надежда Алексеевна<sup>1</sup>, Шахназарова Влада Юрьевна<sup>1,2</sup>, Сырова Дарья Сергеевна<sup>1</sup>, Бородина Елена Владимировна<sup>1</sup>, Ковалева Ольга Николаевна<sup>3</sup>, Струнникова Ольга Кондратьевна<sup>1</sup>

**Активизация защитных реакций в растениях ячменя при колонизации корней фитопатогенным грибом *Fusarium culmorum* в присутствии *Pseudomonas fluorescens* 2137**

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова»;  
e-mail: ai-shaposhnikov@mail.ru

Определение количества *F. culmorum* на корнях ячменя в стерильном вермикулите и нестерильной почве через 1–4 суток после закладки опыта показало, что в присутствии в ризосфере и на корнях антагонистической бактерии *Pseudomonas fluorescens* 2137 грибок заселяет корни в гораздо большем количестве, чем в варианте без инокуляции бактериями. При этом увеличение количества гриба в первые дни на корнях, заселенных бактериями, сопровождалось впоследствии существенным снижением заболеваемости ячменя фузариозной гнилью [1, 2]. Цель настоящей работы – установить, приводит ли ранняя колонизация корней фитопатогенным грибом *F. culmorum* в присутствии *P. fluorescens* 2137 к активизации защитных реакций в растениях ячменя, связанных с экспрессией гена *PAL* (одного из защитных генов, индуцирующихся в растениях в ответ на инфицирование).

Объектами исследования были: факультативный фитопатогенный грибок *Fusarium culmorum* штамм 30, штамм антагонистических ризобактерий *Pseudomonas fluorescens* 2137 и восприимчивый к фузариозам ячмень *Hordeum vulgare* L. сорта Белогорский. Для оценки уровня экспрессии гена *PAL* корни ячменя замораживали погружением в жидкий азот, после чего выделяли из них РНК. Для получения кДНК использовали обратную транскриптазу RevertAid<sup>TM</sup>, ингибитор рибонуклеаз RiboLock<sup>TM</sup>, праймер олигодТ<sub>(18)</sub>. Для определения количества копий гена *PAL* проводили ПЦР в реальном времени на амплификаторе Bio-Rad T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (температура отжига 62<sup>0</sup>С), в качестве референтного гена использовался ген *GAPDH*.

Ген *PAL* кодирует L-фенилаланин-аммоний-лиазу – ключевой фермент фенилпропаноидного пути, ведущего к синтезу фитоалексинов и фитоантисипинов [3]. В суточных корнях уровень экспрессии этого гена был самым высоким в ячмене, колонизированном *P. fluorescens* 2137 (рисунок). К третьим суткам уровень экспрессии этого гена увеличивался во всех случаях, наиболее интенсивно в корнях контрольных растений ячменя. Самый низкий уровень экспрессии защитного гена *PAL* отмечен в корнях ячменя, колонизированного *F. culmorum*. В корнях трехсуточного ячменя, колонизированного совместно грибом и бактерией (рисунок, вариант PF3) уровень экспрессии этого защитного гена увеличился и даже превышал таковой в корнях, колонизированных только *P. fluorescens* 2137 (рисунок, вариант P3).

Наблюдаемая ответная реакция ячменя на колонизацию фитопатогенным грибом и антагонистической бактерией свидетельствует, что именно бактерия-антагонист *P. fluorescens* 2137 индуцирует более активный защитный ответ в ячмене, чем фитопатогенный грибок. Возможно, что на ранних стадиях взаимоотношений между *F. culmorum*, *P. fluorescens* 2137 и ячменем роль штамма 2137 в контроле болезни заключается не столько в прямом подавлении фитопатогена на корнях, сколько в опосредованном – через раннюю индукцию в ячмене защитных реакций.

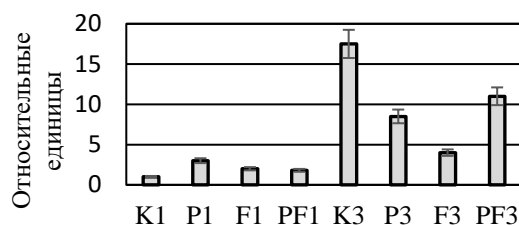


Рисунок 1 –Уровень экспрессии гена *PAL* в корнях ячменя

**Примечание.** Суточные растения: контроль без инокуляции – K1; инокуляция *P. fluorescens* 2137 – P1, *F. culmorum* – F1; двойная инокуляция – PF1. Трехсуточные растения: контроль без инокуляции – K3; инокуляция *P. fluorescens* 2137 – P3, *F. culmorum* – F3; двойная инокуляция – PF3.

Также выявлен высокий уровень экспрессии гена *PAL* в контрольных растениях ячменя, которые не были искусственно инфицированы микроорганизмами. Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что ячмень был, хотя и в очень незначительной степени, инфицирован грибом рода *Fusarium* (семенная инфекция), что при дальнейшем выращивании растений к восьмым суткам приводило к слабым симптомам фузариозной гнили корней. Видимо, присутствие гриба со сниженной агрессивностью, когда к третьим суткам его количество на корнях увеличилось, и вызвало такую сильную ответную реакцию в ячмене, которую не наблюдали в ответ на инфицирование ячменя используемым в наших исследованиях сильно агрессивным штаммом *F. culmorum* 30.

Таким образом, наше предположение, что именно фитопатоген, подвергшийся антагонистической атаке в ризосфере и колонизирующий корни в присутствии *P. fluorescens* 2137, будет индуцировать самый сильный защитный ответ в ячмене (связанный с экспрессией гена *PAL*), не получило своего подтверждения для суточных растений, но возможно имело место в трехсуточных корнях ячменя при двойной инокуляции *F. culmorum*, *P. fluorescens* 2137. Судя по имеющимся на данный момент данным, наиболее сильными индукторами защитного ответа являлись *P. fluorescens* 2137 и слабоагрессивный неидентифицированный гриб рода *Fusarium*, не удаленный с семян в результате стерилизации и колонизировавший контрольные растения ячменя.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-016-00111-а.*

#### Литература

1. Струнникова О.К., Шахназарова В.Ю., Вишневецкая Н.А., Чеботарь В.К., Тихонович И.А. Взаимоотношения *Fusarium culmorum* и *Pseudomonas fluorescens* в ризосфере и ризоплане ячменя // Микология и фитопатология. 2008. Т.42. Вып. 1. С. 68–77.
2. Струнникова О. К., Вишневецкая Н. А., Тихонович И. А. Колонизация корней ячменя *Fusarium culmorum* и влияние *Pseudomonas fluorescens* на этот процесс // Микология и фитопатология. 2010. Т.44. Вып. 2. С. 160–168.
3. Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н., Тихонович И. А., Ходжайова Л. Т., Шишкова С. О. Генетика развития растений. СПб.: Наука, 2000. 539 с.

UDC 579.264:582.288:632.4

Shaposhnikov A. I., Vishnevskaya N. A., Shakhnazarova V. Yu., Syrova D. S., Borodina E. V., Kovaleva O. N., Strunnikova O. K.

#### Activation of protective reactions in barley plants during colonization of roots with the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* 2137

**Summary.** The expression of the *PAL* gene, one of the host protection genes, in sterile barley plants and colonized *F. culmorum* and *P. fluorescens* 2137 were assessed. The obtained results indicate that strain 2137 may cause a more active protective response (1.5–2.1 fold) in barley than a phytopathogenic fungus.

**Keywords:** *Fusarium culmorum*, *Pseudomonas fluorescens*, plant-microbe interactions, root colonization, *PAL*.