

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

УДК 579.264:582.288:632.4

Шапошников Александр Иванович¹, Вишневская Надежда Алексеевна¹, Шахназарова Влада Юрьевна^{1,2}, Сырова Дарья Сергеевна¹, Бородина Елена Владимировна¹, Ковалева Ольга Николаевна³, Струнникова Ольга Кондратьевна¹

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

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

³ФГБНУ «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 RevertAidTM, ингибитор рибонуклеаз RiboLockTM, праймер олигодТ₍₁₈₎. Для определения количества копий гена *PAL* проводили ПЦР в реальном времени на амплификаторе Bio-Rad T100TM Thermal Cycler (температура отжига 62⁰С), 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.

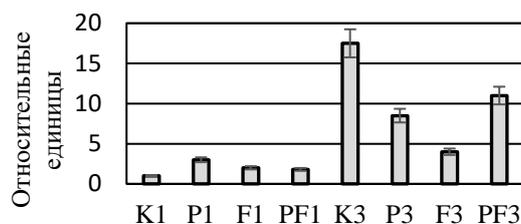


Рисунок 1 –Уровень экспрессии гена *PAL* в корнях ячменя

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*.