



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


ВЛИЯНИЕ *BACILLUS SUBTILIS* 26Д НА РОСТОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ И СОДЕРЖАНИЕ ИУК В ИНФИЦИРОВАННЫХ ВОЗБУДИТЕМ ФИТОФТОРОЗА *PHYTOPHTHORA INFESTANS* РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ

Сорокань А.В.*, Веселова С.В., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

*E-mail: fourtyanns@googlegmail.com

Заболевания растений, в том числе вызываемый *Phytophthora infestans* фитофтороз, оказывают долговременный негативный эффект на рост и продуктивность растений. Ауксины играют важную роль как в регуляции ростовых процессов, так и во взаимодействии растений с патогенными и эндофитными микроорганизмами. Было показано, что присутствие эндофитных бактерий *B. subtilis* 26Д в тканях картофеля способствовало быстрому восстановлению темпов прироста побегов, сырой и сухой массы корней после инфицирования *P. infestans*, а также сокращало площадь распространения симптомов фитофтороза на листьях. При этом воздействие патогена приводило к увеличению содержания ИУК в побегах, которого не отмечалось в инфицированных растениях, содержащих эндофитные клетки *B. subtilis* 26Д.

Ключевые слова: эндофиты ♦ фитофтороз ♦ ауксины ♦ картофель ♦ рост

INFLUENCE OF *BACILLUS SUBTILIS* 26D ON GROWTH PARAMETERS AND IAA CONTENT IN POTATO PLANTS INFECTED WITH *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Sorokan A.V.*, Veselova S.V., Maksimov I.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research
Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

*E-mail: fourtyanns@googlegmail.com

Plant diseases, including late blight caused by *Phytophthora infestans*, have long-term negative effects on plant growth and productivity. Auxins play an important role both in the regulation of growth processes and in the interaction of plants with pathogenic and endophytic microorganisms. It was shown that the presence of endophytic bacteria *B. subtilis* 26D in potato tissues promoted a rapid recovery of the growth rates of shoots, wet and dry mass of roots after *P. infestans* infection, and also reduced the area of late blight damaged zones on the leaves. At the same time, the effect of the pathogen led to an increase in the IAA content in the shoots, which was not observed in infected plants containing *B. subtilis* 26D endophytic cells.

Keywords: endophytes ♦ late blight ♦ auxins ♦ potato, growth

Поступила в редакцию: 30.06.2021

DOI: [10.31163/2618-964X-2021-4-2-89-93](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-2-89-93)

ВВЕДЕНИЕ

Фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary является одним из наиболее распространенных факторов, снижающих урожайность картофеля. Поиск экологически безопасных средств, позволяющих увеличить устойчивость этой культуры при сохранении продуктивности – важная задача современной агробиотехнологии.

Восприимчивость растений к патогенам рода *Phytophthora* связывают с повышенным содержанием в тканях ИУК [Evangelisti et al., 2013]. Однако роль этого фитогормона в развитии устойчивости растений картофеля к *P. infestans* изучена недостаточно. Так, нокаут гена ИУК-аминогидролазы приводил к снижению содержания свободной ИУК и устойчивости к *P. infestans* растений табака [D'Ippolito et al., 2016]. Во время колонизации корней сои *P. sojae*, содержание ИУК и связанных метаболитов были значительно выше как

в умеренно устойчивом, так и в умеренно восприимчивом сортах по сравнению с неинфицированными растениями [Stasko et al., 2020]. Позднее в устойчивом сорте наблюдалось меньшее содержание этого фитогормона, чем в восприимчивом. Было показано, что все продуцирующие ИУК ризобактерии, выделенные из корней *Capsicum annuum*, стимулировали рост инфицированных *P. capsici* растений и снижали выраженность симптомов заболевания на листьях [Hyder et al., 2020]. Способность к продуцированию ИУК в среду культивирования характерна для эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д, клетки которого содержатся в растениях картофеля в количестве порядка 10^5 клеток/мг сырой массы [Sorokan et al., 2021]. Отмечается их способность увеличивать доступность для растений минеральных веществ, индуцировать системную устойчивость растений к патогенам и фитофагам, оказывать прямое токсическое воздействие на организм вредителей [Tamošiūnė et al., 2018].

В данной статье нами было исследовано воздействие предварительной инокуляции картофеля бактериями *B. subtilis* 26Д на содержание ИУК и ростовые характеристики содержащих эндофиты растений картофеля после инфицирования возбудителем фитофтороза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения *Solanum tuberosum* L. (сорт Ранняя роза) были получены методом микроклонирования и выращены в пробирках со средой Мурашиге и Скуга в климатической камере KMF240 (Binder GmbH, Германия) при 20–22 °С в течение 21 дня. 7-дневные растения инокулировали 5 мкл суспензии клеток *B. subtilis* 26Д (10^8 клеток/мл) путем нанесения на нижний лист.

Через 7 суток после инокуляции бактериями содержание клеток эндофитов составляло 4×10^5 КОЕ/мг сырой массы растений [Sorokan et al., 2021]. Часть инокулированных и интактных растений картофеля инфицировали (непосредственно в пробирках) 20 μ л суспензии зооспор (10^6 спор/мл) оомицета *P. infestans* (штамм 1.2). Развитие симптомов фитофтороза фиксировали на 9 сут после инфицирования.

Длину каждого растения от основания стебля до верхушечной почки был измерен до инфицирования (0), через 1, 3, 6 и 9 суток после инфицирования без извлечения из пробирки в стерильных условиях. Впоследствии для каждого растения был рассчитана величина прироста.

Содержание ИУК определяли в побегах (стебель с листьями) пробирочных растений картофеля через 1, 2, 3 суток после инокуляции спорами патогена. Растительный материал гомогенизировали и экстрагировали 80 % этанолом (1:10 масса/объем) в течение 16-20 ч при 4°С. Спиртовой экстракт отделяли центрифугированием (DiaCent-CW, Bio-Rad, США) и упаривали до водного остатка. Экстракцию фитогормонов в диэтиловый эфир из подкисленного водного остатка спиртового экстракта с последующей экстракцией в раствор гидрокарбоната натрия и реэкстракцией в диэтиловый эфир (после подкисления соды) проводили с уменьшением объема на каждом этапе экстракции-реэкстракции. После метилирования определяли количество ИУК с помощью твердофазного иммуоферментного анализа. Содержание фитогормонов в растениях рассчитывали на мг сырой массы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инфицирование растений картофеля возбудителем фитофтороза вызывало существенное снижение роста растений, не содержащих клетки *B. subtilis* 26Д, через 5 дней после нанесения спор патогена и в дальнейшем. Присутствие эндофитных бактерий в тканях поврежденных растений способствовало снижению негативного эффекта патогенеза на рост стебля (табл. 1). Инфицирование обработанных водой растений приводило к снижению сырой массы стебля и корня. Масса корней как неинфицированных, так и инфицированных растений, содержащих *B. subtilis* 26Д, была статистически значимо ($p \leq 0,05$) выше этого показателя в обработанных водой растениях (табл. 1). При этом наблюдалось значительное снижение интенсивности распространения симптомов фитофтороза на листьях растений, обработанных *B. subtilis* 26Д относительно обработанных водой инфицированных растений.

Таблица 1. Ростовые параметры и пораженность фитофторозом растений картофеля, обработанных водой или суспензией клеток *B. subtilis* 26Д после инфицирования *P. infestans*

| Показатели | Варианты | | | |
|-------------------------------|------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| | вода | | <i>B.s.</i> 26Д | |
| | контроль | <i>P. infestans</i> | контроль | <i>P. infestans</i> |
| Длина стебля, см | 12,62±0,5 | 10,3±0,93* | 12,84±0,64 | 11,75±0,74 |
| Сырая масса стебля, мг | 168,2±9,82 | 125,05±14,43* | 174,4±13,57 | 155,6±14,71 |
| Сырая масса корня, мг | 72,2±6,48 | 56,0±5,53* | 85,1±5,26* | 87,5±4,54* |
| Пораженность, % площади листа | — | 81,6±8,46 | — | 32,7±6,43* |

Примечание. * - значимые отличия от неинфицированных, обработанных водой растений ($p \leq 0,05$)

В инфицированных растениях, обработанных водой, содержание ИУК было выше, чем в здоровых растениях, при этом существенный рост этого показателя наблюдался на 3 сутки после нанесения спор патогена (рис. 1).

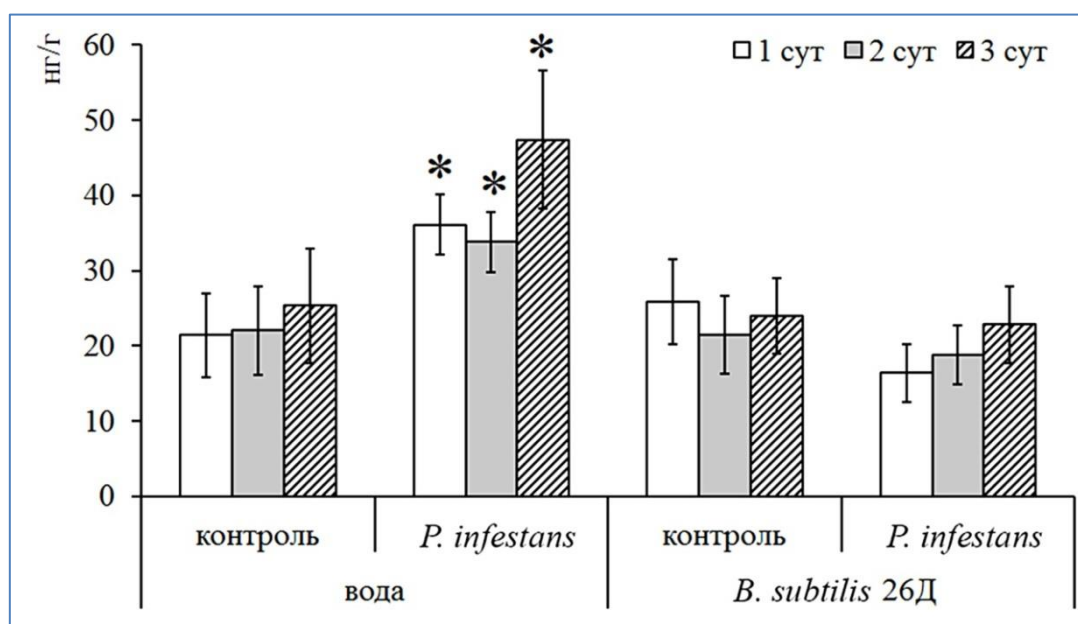


Рис. 1. Влияние *B. subtilis* 26Д на содержание ИУК в побегах здоровых и инфицированных *P. infestans* растениях картофеля.
Примечание. * - значимые отличия от неинфицированных, обработанных водой растений в соответствующей временной точке ($p \leq 0,05$)

ОБСУЖДЕНИЕ

Секреция СРРМ рост-стимулирующих соединений, таких как ауксины и цитокинины, широко известна [Pérez-Flores et al., 2017, Arkhipova et al., 2005]. Положительная корреляция наблюдалась между продукцией ауксина бактерией *B. methylotrophicus* М4-96, изолированной из корней кукурузы и ростом инокулированных растений *A. thaliana* [Pérez-Flores et al., 2017]. Однако вопрос об источнике фитогормонов в растениях, содержащих эндофиты и патогены, остается открытым. Исследуемый штамм эндофитных бактерий способен секретировать в среду культивирования около 80 нг/мл среды ИУК [Sorokan et al., 2021], но под действием *B. subtilis* 26Д в здоровых растениях не наблюдалось изменения содержания ауксинов, что требует дальнейших исследований. В растениях, содержащих эндофитные клетки *B. subtilis* 26Д, увеличивалась масса корневой системы, которая значительно снижалась в инфицированных растениях, обработанных водой. Ингибирование роста корней в инфицированных растениях могло быть вызвано высоким содержанием ИУК, наблюдаемым в растениях этого варианта. В исследовании Fendrych et al. [2018] было показано, что наномолярные концентрации ИУК ингибируют удлинение корней арабидопсиса, и быстрый ответ показал дозозависимость, аналогичную реакции корней, выращиваемых в присутствии ИУК в течение более длительных периодов времени. ИУК, синтезируемая и секретлируемая патогенами, может действовать как фактор вирулентности. Так, патогенный *Pseudomonas fluorescens* HP72, слабо продуцирующий ИУК имеет ослабленную способность колонизировать корни полевицы [Suzuki et al., 2003].

Сведений о способности возбудителя фитофтороза картофеля синтезировать ИУК не обнаружено, однако известно, что *P. sojae* продуцирует предшественник ИУК – триптофан [Stasko et al., 2020]. Кроме того, в инфицированных растениях, содержащих эндофиты, не наблюдалось увеличения уровня этого фитогормона. Таким образом, обработка эндофитным штаммом *B. subtilis* 26Д способствует увеличению устойчивости растений к фитофторозу и стимулирует развитие корневой системы растений, препятствуя увеличению содержания ИУК под действием патогена.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках проекта РНФ «Физиологические основы формирования симбиотических взаимоотношений растений картофеля с эндофитными бактериями рода *Bacillus*» № 20-76-00003

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I., Kudoyarova G. R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants // *Plant Soil*. 2005. V. 272 (5). P. 201-209. DOI: [10.1007/s11104-004-5047-x](https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x)
2. D'Ippolito S., Vankova R., Joosten M.H.A.J., Casalongué C.A., Fiol D. F. Knocking down expression of the auxin-amidohydrolase IAR3 alters defense responses in *Solanaceae* family plants // *Plant Science*. 2016. V. 253. P. 31-39. DOI: [10.1016/j.plantsci.2016.09.008](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.09.008)
3. Evangelisti E., Govetto B., Minet-Kebdani N., Kuhn M.-L., Attard A., Ponchet M., Panabières F. Gourgues M. The *Phytophthora parasitica* RXLR effector penetration-specific

- effector 1 favours *Arabidopsis thaliana* infection by interfering with auxin physiology // *New Phytol.* 2013. V. 199. P. 476-489. DOI: [10.1111/nph.12270](https://doi.org/10.1111/nph.12270)
4. Fendrych M., Akhmanova M., Merrin J. Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signaling // *Nature Plants.* 2018. V. 4. P. 453–459. DOI: [10.1038/s41477-018-0190-1](https://doi.org/10.1038/s41477-018-0190-1)
 5. Hyder S., Gondal A.S., Rizvi Z.F. Characterization of native plant growth promoting rhizobacteria and their anti-oomycete potential against *Phytophthora capsici* affecting chilli pepper (*Capsicum annum* L.) // *Sci Rep.* 2020. V. 10, A. 13859. DOI: [10.1038/s41598-020-69410-3](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69410-3)
 6. Pérez-Flores P., Valencia-Cantero E., Altamirano-Hernández J., Pelagio-Flores R., López-Bucio J., García-Juárez P., Macías-Rodríguez L. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles // *Protoplasma.* 2017. V. 254(6). P. 2201-2213. DOI: [10.1007/s00709-017-1109-9](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1109-9)
 7. Sorokan A., Veselova S., Benkovskaya G., Maksimov I. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26D increases levels of phytohormones and repairs growth of Potato Plants after Colorado Potato Beetle Damage // *Plants.* 2021. V. 10. A. 923. DOI: [10.3390/plants10050923](https://doi.org/10.3390/plants10050923)
 8. Stasko A.K., Batnini A., Bolanos-Carriel C., Lin J.E., Lin Y., Blakeslee J.J., Dorrance A.E. Auxin profiling and GmPIN expression in *Phytophthora sojae*-soybean root interactions // *Phytopathology.* 2020. V. 110(12). P. 1988-2002. DOI: [10.1094/PHYTO-02-20-0046-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0046-R)
 9. Suzuki S., He Y., Oyaizu H. Indole-3-Acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch // *Curr Microbiol.* 2003. 47(2). P. 138-143. DOI: [10.1007/s00284-002-3968-2](https://doi.org/10.1007/s00284-002-3968-2)
 10. Tamošiūnė I., Stanienė 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. P. 889-904. DOI: [10.3389/fpls.2018.00889](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00889)