

ИНДУКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ У РАСТЕНИЙ РАПСА К ЗАСОЛЕНИЮ ЭЛИСИТОРАМИ – ПРОИЗВОДНЫМИ БАКТЕРИЙ РОДОВ *PSEUDOMONAS* И *BACILLUS*

И. А. ГРИНЕВА¹⁾, Ю. М. КУЛЕШОВА¹⁾, В. А. ЛОМОНОСОВА¹⁾, Д. В. МАСЛАК¹⁾, Л. Е. САДОВСКАЯ¹⁾,
Т. Л. СКАКУН¹⁾, И. Н. ФЕКЛИСТОВА¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Установлено, что элиситоры, являющиеся производными бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494, способны при высоком уровне засоления (250 ммоль/л NaCl) одновременно увеличивать энергию прорастания и полевую всхожесть растений рапса. Оптимизированы условия совместного культивирования названных бактериальных штаммов. Определен оптимальный вариант

Образец цитирования:

Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Скакун Т. Л., Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Индукция устойчивости у растений рапса к засолению элиситорами – производными бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 38–43.

For citation:

Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., Maslak D. V., Sadovskaya L. E., Skakun T. L., Feklistova I. N., Maksimova N. P. Induction of resistance to salinization in rape plants under the influence of elicitors derived from *Pseudomonas* and *Bacillus* bacteria. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 38–43 (in Russ.).

Авторы:

Ирина Александровна Гринева – старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Юлия Михайловна Кулешова – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Вероника Александровна Ломоносова – научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Диана Викторовна Маслак – заведующий сектором молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Людмила Евгеньевна Садовская – старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Татьяна Леонидовна Скакун – старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Николаевна Феклистова – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

Authors:

Irina Grineva, senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

grineva_ia@mail.ru

Yulia Kuleshova, PhD (biology); senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

yuliakuleshova@yahoo.co.uk

Veronica Lomonosova, researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

nikaglad@gmail.com

Diana Maslak, head of the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

diana-maslak@yandex.ru

Ludmila Sadovskaya, senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

ludmilasadovskaya@rambler.ru

Tatyana Skakun, senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

stanysik@yandex.ru

Irina Feklistova, PhD (biology); head of the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

feklistova_iren@rambler.ru

Natalia Maksimova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

nataliamaksimova@yahoo.com

элиситорного препарата для повышения способности растительного организма формировать индуцированную системную устойчивость у растений рапса при засолении 150 ммоль/л NaCl, которая проявилась в достоверном повышении полевой всхожести рапса на 20 % и увеличении длины стебля на 19 %. Бактерии *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 выращивали на среде М9 с мелассой при 28 °С в течение 4 ч, а затем продолжали культивирование при 35 °С до 48 ч. Опытный образец элиситорного препарата был приготовлен путем термической обработки (100 °С, 15 мин) полученной культуральной жидкости.

Ключевые слова: *Pseudomonas*; *Bacillus*; элиситоры; растения рапса; засоление.

INDUCTION OF RESISTANCE TO SALINIZATION IN RAPE PLANTS UNDER THE INFLUENCE OF ELICITORS DERIVED FROM *PSEUDOMONAS* AND *BACILLUS* BACTERIA

I. A. GRINEVA^a, Y. M. KULESHOVA^a, V. A. LOMONOSOVA^a, D. V. MASLAK^a, L. E. SADOVSKAYA^a,
T. L. SKAKUN^a, I. N. FEKLISTOVA^a, N. P. MAKSIMOVA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: grineva_ia@mail.ru

It was established that bacterial elicitors from *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 and *B. subtilis* 494 are capable to increase both the seed vigor and germination of rape plants under high level of salinity condition (250 mmol/l NaCl). Co-cultivation conditions of selected bacterial strains were optimized. The most effective elicitor's variant capable to enhance the ability of the rape plants to generate induced systemic resistance (ISR) under salinity 150 mmol/l NaCl was selected. ISR manifested in a significant increasing of rape plants germination by 20 % and the stem length increased by 19 %. This test elicitor's sample was prepared with heat treatment (100 °C, 15 min) of the culture broth containing *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 and *B. subtilis* 494 grown in M9 medium with molasses at 28 °C for 4 h and then at 35 °C to 48 h.

Key words: *Pseudomonas*; *Bacillus*; elicitors; rape plants; salinization.

Введение

Способность микроорганизмов PGPR-группы стимулировать иммунитет растений и ускорять их рост была открыта более 20 лет тому назад [1, с. 495; 2, с. 728; 3, с. 1508]. Растения, обработанные ризосферными непатогенными бактериями, активируют множественные защитные ответы, которые выражаются в формировании химических и физических барьеров на пути проникновения и развития патогена, включают механизмы, позволяющие выжить в сложившихся неблагоприятных условиях, т. е. в растительном организме возникает индуцированная системная устойчивость к биотическим и абиотическим факторам ISR-типа (ISR – induced systemic resistance) [2, с. 728; 3, с. 1508]. Биопрепараты, в основе действия которых лежит принцип формирования системной устойчивости у растений, обладают рядом преимуществ: они экологически безопасны, не вызывают появления резистентности фитопатогенов, увеличивают урожайность, не накапливаясь в конечном продукте, а также, в отличие от других препаратов, имеют низкие нормы расхода.

В научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ ранее был проведен скрининг коллекции нефитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* на способность проявлять антагонистические свойства относительно грибных и бактериальных фитопатогенов, мобилизовать фосфаты и расти на среде без источников азота. Кроме того, у штаммов *Pseudomonas*, способных улучшать минерализацию почвы и являющихся антагонистами фитопатогенов, ранее была обнаружена и изучена способность стимулировать рост растений, а также проведен ее сравнительный анализ с использованием модельной культуры рапса. По совокупности полезных свойств были отобраны наиболее перспективные в качестве основы для создания биопрепарата бактериальные штаммы [4, с. 154]. Исследования показали, что обработка некоторыми штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, в том числе *P. aurantiaca* В-162 (после дополнительной идентификации *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162) и *P. putida* F19, приводила к наиболее интенсивному удлинению корней 10-дневных проростков рапса. Эти штаммы бактерий включены в работы по созданию основы элиситорного биопрепарата.

Кроме того, было выдвинуто предположение, что в состав потенциального элиситорного препарата также могут быть включены бактерии PGPR-группы *Bacillus subtilis* 494. Дополнение состава

потенциального элиситорного препарата на основе бактерий рода *Pseudomonas* штаммом *B. subtilis* 494 обусловлено наличием ранее установленных нами мощных антибиотических и ростостимулирующих свойств [5, с. 225–227; 6, с. 183–185], а также связано с описываемым в литературных источниках явлением большей эффективности комплексных элиситорных препаратов по сравнению с монопрепаратами [7, с. 182; 8, с. 141; 9, с. 45].

Материалы и методы исследования

В работе использованы штаммы бактерий *Pseudomonas* «флуоресцирующей группы» коллекции биологического факультета БГУ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *P. putida* F19, а также штамм *B. subtilis* 494.

Посевной материал бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494 получали при индивидуальном культивировании. Дальнейшее совместное культивирование бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 или *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494 производили в колбах Эрленмейера с 50 мл среды на основе солевого концентрата М9 или солевого концентрата Канада с мелассой (1 %); общее количество посевного материала – 5 %, соотношение штаммов в посевном материале составляло 1 : 1; культивирование проводили при 28 °С в течение 4 ч, затем при 35 °С – до 48 ч; титр каждого штамма бактерий в образцах – не менее $1 \cdot 10^7$ КОЕ.

В целях получения элиситорного препарата культивированные вышеописанным методом бактериальные суспензии термически обрабатывали при 100 °С в течение 15 мин, хранили при комнатной температуре в герметично закупоренных сосудах.

Для изучения индукции устойчивости к засолению у растений при обработке элиситорными препаратами семена рапса сорта Зорный проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри с 5 мл раствора NaCl (250 или 150 ммоль/л) и образцами элиситорных препаратов, разведенных в 100 и 1000 раз. Результаты оценивали по изменениям параметров роста трех- и семидневных проростков.

Результаты исследований и их обсуждение

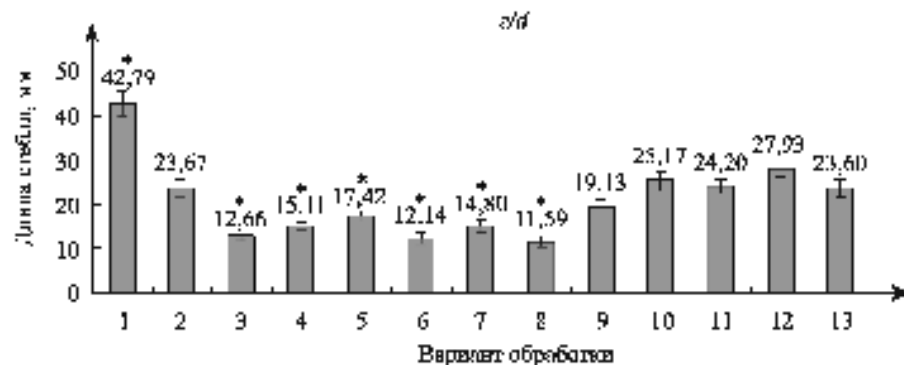
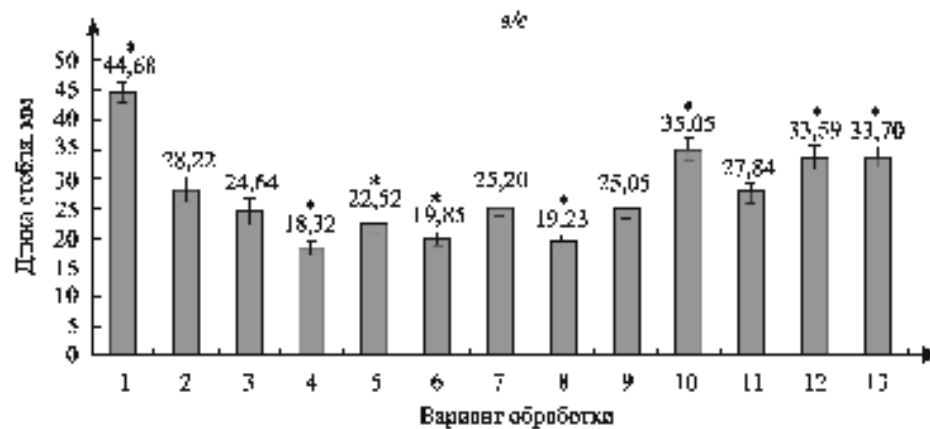
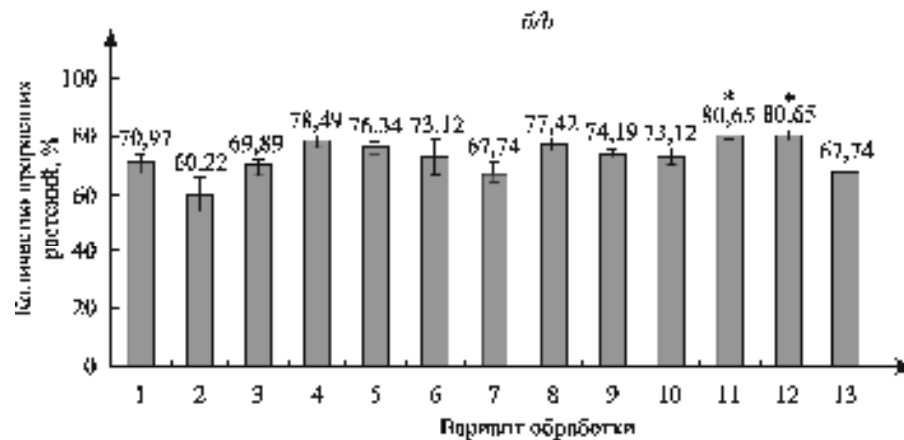
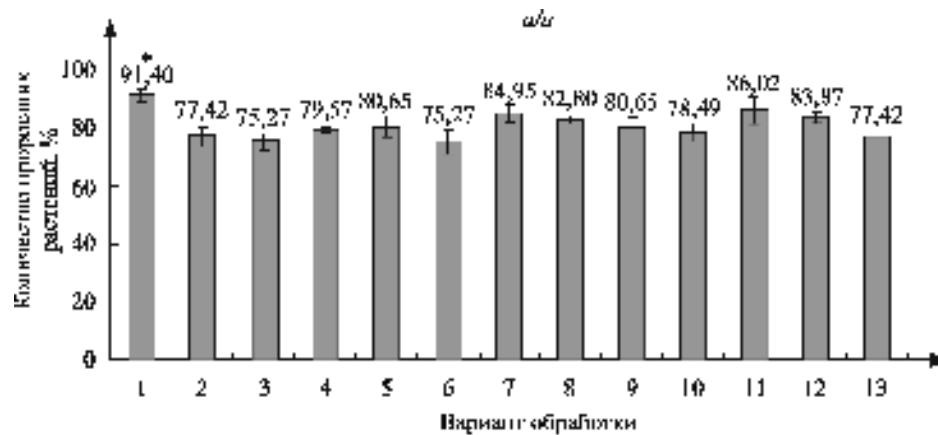
В предварительной серии экспериментов установлено, что элиситоры, приготовленные на основе бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494, способны одновременно увеличивать энергию прорастания и полевую всхожесть растений рапса в условиях высокого уровня засоления (250 ммоль/л NaCl).

Для оптимизации условий культивирования отобранных бактериальных штаммов были проведены эксперименты по их совместному культивированию с разными вариантами среды, температуры и соотношения посевного материала. Необходимость подбора условий одновременного культивирования штаммов обосновывалась необходимостью минимизации времени и энергозатрат для получения комплексного элиситорного препарата в промышленных условиях и его удешевления для производителя и потребителей. Поскольку подбор препарата, действующего при низких его концентрациях, является экономически целесообразным как для производителя, так и для потребителя продукции, то в дальнейшей работе были использованы варианты таких элиситорных препаратов, которые при разведении в тысячу раз существенно улучшали энергию прорастания и полевую всхожесть рапса. В таблице приведен композиционный состав отобранных элиситорных биопрепаратов.

На следующем этапе проводилась оценка способности полученных элиситорных препаратов формировать индуцированную системную устойчивость ISR-типа у растений рапса при засолении 150 ммоль/л NaCl.

Из рис. а видно, что в вышеописанном эксперименте достоверного изменения энергии прорастания при применении элиситорных препаратов отмечено не было, достоверное увеличение полевой всхожести на 20 % было зарегистрировано в вариантах опыта 11 и 12. При применении всех остальных элиситоров наблюдалась тенденция увеличения полевой всхожести. Как продемонстрировано на рис. в, длина стебля рапса достоверно увеличивалась при применении элиситоров в вариантах обработки 10, 12 и 13. Тенденция к удлинению корня при использовании в качестве элиситоров препаратов из вариантов обработки 10, 11 и 12 показана на рис. г. Достоверной разницы в массе сухих проростков в эксперименте обнаружено не было.

Продemonстрированная нами индукция системной устойчивости у растений на ранних этапах развития при обработке их семян бактериями PGPR-группы согласуется с описанным в [9, с. 58] явлением праймирования растений при воздействии на их семена элиситоров. Под праймированием подразумевается приобретение растениями состояния готовности быстрее или агрессивнее ответить на биотический или абиотический стресс.



Влияние элиситорных препаратов на растения рапса в условиях засоления (150 ммоль/л NaCl):
а – энергия прорастания, %; *б* – полевая всхожесть, %; *в* – длина стебля, мм; *г* – длина корня, мм.

*Выборки статистически значимо различаются при $p < 0,05$

The effect of eliciting drugs on rape plants under saline (150 mmol/l NaCl):
a – energy of germination, %; *b* – field germination, %; *c* – enght of stem, mm; *d* – root length, mm. * $p < 0.05$

Композиционный состав испытываемых образцов элиситорных биопрепаратов*

The composition of samples eliciting biological products*

Вариант обработки	Бактериальные штаммы (соотношение посевного материала)	Температура культивирования, °С	NaCl, ммоль/л
1	Вода (контроль 1)	—	0
2	Соль (контроль 2)	—	150
3	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 : <i>B. subtilis</i> 494 (1,0 : 4,5 : 4,5)	28	150
4	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 9)	28	150
5	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 9)	28	150
6	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 1)	28	150
7	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 (9 : 1)	28	150
8	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 : <i>B. subtilis</i> 494 (1 : 1 : 1)	28 °С в течение 4 ч, затем 35 °С до 48 ч	150
9	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 : <i>B. subtilis</i> 494 (1 : 1 : 1)	35 °С в течение 4 ч, затем 28 °С до 48 ч	150
10	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 1)	28 °С в течение 4 ч, затем 35 °С до 48 ч	150
11	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 1)	35 °С в течение 4 ч, затем 28 °С до 48 ч	150
12	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 (1 : 1)	28 °С в течение 4 ч, затем 35 °С до 48 ч	150
13	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>B. subtilis</i> 494 (1 : 1)	35 °С в течение 4 ч, затем 28 °С до 48 ч	150

*Бактерии культивировали на среде с основой из солевого концентрата М9, титр каждой из культур – не менее 10⁷ КОЕ.

*The bacteria were cultured on a medium based on the salt concentrate M9, the titler of each of the cultures is not less 10⁷ cfu.

Заключение

Таким образом, в экспериментах отобран оптимальный элиситорный препарат из варианта обработки 12, обеспечивающего повышение способности растительного организма формировать индуцированную системную устойчивость у растений рапса в начале их вегетации. Системная устойчивость проявилась в достоверном возрастании полевой всхожести рапса на 20 % и увеличении длины стебля на 19 % в условиях действия неблагоприятного абиотического фактора (150 ммоль/л NaCl). Опытный образец был получен путем термической обработки (100 °С, 15 мин) культуральной жидкости бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494, выращенных на среде М9 с мелассой при 28 °С в течение 4 ч, а затем при 35 °С – до 48 ч.

Необходимо отметить, что обработка рапса образцом из варианта 10 приводила к увеличению длины стебля на 24 %, а образцом из варианта 11 – к увеличению всхожести на 20 %. Указанные образцы – производные бактерий *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494 – также могут быть предложены в качестве основы для элиситорного препарата и дальнейших испытаний.

Библиографические ссылки

1. Alstrom S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere *Pseudomonads* // J. Gen. Appl. Microbiol. 1991. Vol. 37. P. 495–501.
2. Van Peer R., Niemann G. J., Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 // Phytopathol. 1991. Vol. 81. P. 728–734.
3. Wei G., Kloepper J. W., Tuzun S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria // Phytopathol. 1991. Vol. 81. P. 1508–1512.
4. Кулешова Ю. М., Рыбакова В. И., Феклистова И. Н. и др. Стимуляция роста рапса бактериями рода *Pseudomonas* – антагонистами фитопатогенов // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2016. Т. 11 : в 2 ч. Ч. 1. С. 154–161.
5. Максимова Н. П., Лысак В. В., Комарова М. С. и др. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* КМБУ 30043 – антагонист фитопатогенных микроорганизмов // Молекулярная генетика и биотехнология : материалы междунар. конф. (Минск, 6–8 апр. 1998 г.). Минск, 1998. С. 225–227.

6. Максимова Н. П., Лысак В. В., Комарова М. С. и др. Перспективы использования биопрепаратов микробного происхождения для защиты растений // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI ст. : материалы междунар. конф. (Минск, 1–2 июня 2000 г.). Минск, 2000. С. 183–185.
7. Figueiredo V. B., Burity H. A., Martinez C. R., et al. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici* // Appl. Soil Ecol. 2008. № 40. P. 182–188.
8. Kohler J., Hernandez J. A., Caravaca F., et al. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants // Funct. Plant Biol. 2008. № 35. P. 141–151.
9. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore, 2016.

References

1. Alstrom S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere *Pseudomonads*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1991. Vol. 37. P. 495–501.
2. Van Peer R., Niemann G. J., Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417. *Phytopathol.* 1991. Vol. 81. P. 728–734.
3. Wei G., Kloepper J. W., Tuzun S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* 1991. Vol. 81. P. 1508–1512.
4. Kuleshova Yu. M., Rybakova V. I., Feklistova I. N., et al. Stimulyatsiya rosta rapsa bakteriyami roda *Pseudomonas* – antagonistami fitopatogenov [Stimulation of rape growth by *Pseudomonas* bacteria – antagonists of phytopathogens]. *Tr. BGU. Ser.: Fiziol., biokhim. i mol. osnovy funkts. biosist.* 2016. Vol. 11 : in 2 parts. Part 1. P. 154–161 (in Russ.).
5. Maksimova N. P., Lysak V. V., Komarova M. S., et al. Shtamm bakterii *Bacillus subtilis* KMBU 30043 – antagonist fitopatogennykh mikroorganizmov [The strain *Bacillus subtilis* bacteria KMBU 30043 – antagonist of pathogenic microorganisms]. *Molecular genetics and biotechnology* : materialy mezhdunar. konf. (Minsk, 6–8 April, 1998). Minsk, 1998. P. 225–227 (in Russ.).
6. Maksimova N. P., Lysak V. V., Komarova M. S., et al. Perspektivy ispol'zovaniya biopreparatov mikrobnogo proiskhozhdeniya dlya zashchity rastenii [Prospects for the use of biological products microbial plant protection]. *Microbiology and Biotechnology at the turn of the XXI century* : materialy mezhdunar. konf. (Minsk, 1–2 June, 2000). Minsk, 2000. P. 183–185 (in Russ.).
7. Figueiredo V. B., Burity H. A., Martinez C. R., et al. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* 2008. No. 40. P. 182–188.
8. Kohler J., Hernandez J. A., Caravaca F., et al. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Funct. Plant Biol.* 2008. No. 35. P. 141–151.
9. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore, 2016.

Статья поступила в редакцию 28.11.2016.
Received by editorial board 28.11.2016.