

УДК 581.1:581.143.5

ВЛИЯНИЕ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА РОСТ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К КСЕНОБИОТИКАМ И ФИТОПАТОГЕНАМ

© 2020 г. С. В. Пиголева¹, Н. С. Захарченко^{1, *}, О. В. Фурс¹, С. В. Тарлачков^{1, 2},
Т. В. Фунтикова², А. Е. Филонов^{2, 4}, А. В. Ариповский³, О. В. Дьяченко¹,
Я. И. Бурьянов¹, Т. В. Шевчук¹

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московской обл., 142290 Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Московской обл., 142290 Россия

³Научно-производственная компания ООО Фирма «А-БИО», Пущино, Московской обл., 142290 Россия

⁴Тульский государственный университет, Тула, Тульская обл., 300012 Россия

*e-mail: znata_2008@mail.ru

Поступила в редакцию 03.12.2019 г.

После доработки 17.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Исследованы эффекты колонизации томата (*Lucopersicon esculentum* Mill.) и табака (*Nicotiana tabacum* L.), бактериями *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas putida*, *Methylovorus mays*. Колонизация бактериями приводила к их стабильной ассоциации с растениями, у которых повышалась скорость роста, урожайность и адаптация к условиям *in vivo*. Колонизированные растения проявляли повышенную устойчивость к бактериальным фитопатогенам *Erwinia carotovora* и *Pseudomonas syringae*. Растения, колонизированные бактериями с устойчивостью к нафталину проявляли стабильный рост на среде с этим соединением. Полученные результаты указывают на перспективность использования ассоциативных микроорганизмов для разработки методов защиты растений от биотических и абиотических стрессовых факторов.

Ключевые слова: ассоциативные микроорганизмы, фитопатогены, колонизация растений

DOI: 10.31857/S0555109920040133

Повышение продуктивности растений и их устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам является важной задачей современной биотехнологии. Одним из путей решения этой задачи является разработка методов защиты растений от фитопатогенов и ксенобиотиков с помощью их колонизации ассоциативными микроорганизмами. Ассоциированные с растениями микроорганизмы оказывают стимулирующее влияние на рост и урожай растений за счет способности к азотфиксации, вытеснению и подавлению роста патогенов, образованию физиологически активных веществ, мобилизации питательных элементов из почвы [1–3]. Способность ассоциаций растений с микроорганизмами-деструкторами можно также использовать в биотехнологии для защиты окружающей среды [4–6]. Ассоциированные микроорганизмы способны устанавливать с растениями прочную симбиотическую связь [7], что указывает на перспективность их применения в усло-

виях конкуренции с микроорганизмами различных агробиоценозов. На основе метода колонизации возможно создание экологически безопасных биопрепаратов для стимуляции роста сельскохозяйственных растений и защиты их от болезней [8–10]. Применение традиционных микробиологических препаратов для защиты растений приводит к кратковременным положительным эффектам и требует нескольких обработок растений в период вегетации. Это связано с применением в качестве защитных биопрепаратов таких микроорганизмов, которые, будучи антагонистами фитопатогенов, не являются активными колонизаторами растений. Таким образом, изучение ассоциативных связей между растениями и ассоциативными микроорганизмами важно для разработки экологически чистого способа защиты растений от патогенов и удаления из окружающей среды чужеродных соединений.

Томат (*Lycopersicon esculentum* L.) – вторая по значимости овощная культура после картофеля,

Таблица 1. Способность бактерий к росту на различных субстратах

Штамм	Нефть	Нафталин	Метанол, канамицин	Наличие плазмид	Ссылка
<i>P. putida</i> BS3701	+	+	—	pBS1141, pBS1142	[14]
<i>P. fluorescens</i> 142NF	+	+	—	pNF142	[14]
<i>A. baumannii</i> 7	+	+	—	5 плазмид	[5]
<i>R. erythropolis</i> S67	+	—	—	—	[16]
<i>P. aureofaciens</i> BS1393	—	—	—	—	[14]
<i>M. mays</i> BKMB-2221	—	—	+	pBin19	[15]

Примечание. “+” — способность бактерий к росту на субстрате; “—” — отсутствие роста на субстрате.

используемая также и для производства различных продуктов [11].

Цель работы — исследование физиолого-биохимических особенностей взаимодействия растений томата и табака с ассоциативными микроорганизмами.

МЕТОДИКА

Растительный материал. Объектами исследования служили растения томата (*Lucopersicon esculentum*) сорта Джина и табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун. Семена стерилизовали в 2%-ном растворе гипохлорита натрия (“Лабтех”, Россия) и промывали 3 раза по 10 мин в стерильной воде. Семена проращивали *in vitro* на агаризованной безгормональной среде Мурасиге-Скуга (МС) [12]. Растения выращивали при температуре 22–24°C и 16-часовом световом дне и освещенности 2.5 клк. Проростки черенковали 1 раз в месяц.

Микроорганизмы и условия их культивирования. В качестве ассоциативных микроорганизмов использовали штаммы: *Pseudomonas aureofaciens* BS1393, *Pseudomonas fluorescens* 142NF, *Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141, pBS1142), *Acinetobacter baumannii* 7, *Rhodococcus erythropolis* S67, метиловых бактерий *Methylovorus mays* BKMB-2221 (табл. 1), полученные в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН (Пушино, Россия) (табл. 1) [7, 13–16]. Бактерии *A. baumannii*, *R. erythropolis* и бактерии рода *Pseudomonas* выращивали до D_{660} 1.0 при 28°C на роторной качалке (120 об./мин) в колбах Эрленмейера на 750 мл с 200 мл среды LB [17], содержащей бакто-триптон (“Difco”, США) — 10 г/л, дрожжевой экстракт (“Difco”, США) — 5 г/л и NaCl — 10 г/л. (“Химмед”, Россия).

Метилотриптон выращивали на среде Канада (К), содержащей (г/л): KH_2PO_4 — 2.0 (“CarlRoth”, Германия); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2.0 (“Химмед”, Россия); NaCl — 0.5 (“Химмед”, Россия); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.125 (“Химмед”, Россия); FeSO_4 — 0.002 (“Химмед”, Россия); агар — 12.0 (“Difco”, США), с добавлением 1.0% CH_3OH в качестве источника углерода и энергии [14] до оптической плотности

(D_{660}) 1.5, на роторной качалке (120 об./мин) в колбах Эрленмейера на 750 мл с 200 мл среды К при 37°C. Для колонизации использовали суспензию бактерий плотностью $2\text{--}3 \times 10^5$ КОЕ/мл.

В качестве фитопатогенных штаммов использовали бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* B15 (Horticulture Centre, Канада) и *Pseudomonas syringae*, полученный из коллекции Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (Пушино, Россия). Остальные бактерии выращивали в жидкой среде LB.

Колонизация растений ассоциативными бактериями. Семена и молодые побеги томата и табака обрабатывали суспензией ассоциативных бактерий. Для этого семена помещали в жидкую культуру бактерий с титром $10^3\text{--}10^5$ на 1–2 мин, подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на чашки Петри, со средой МС.

Молодые побеги однократно опрыскивали 1 мл суспензии бактерий с титром $10^3\text{--}10^5$ и культивировали в стеклянных пробирках. В качестве контроля на среду МС помещали необработанные бактериями семена и побеги, и культивировали при 22–24°C и 16-часовом фотопериоде при освещенности 2 клк. Колонизированные и укорененные растения *in vitro* переносили в теплицу станции искусственного климата Биотрон.

Биотесты на стабильность ассоциаций. Микробиологическое тестирование различных эксплантов растений (листьев или корней) проводили через 7, 14 и 49 сут после колонизации. Для этого растительный экстракт, полученный путем гомогенизации 1 см² растительной ткани, наносили на поверхность твердой питательной среды LB или К с селективными антибиотиками в чашках Петри и инкубировали при температуре 22–24°C 2 сут, затем проводили подсчет КОЕ на 1 см² площади растительной ткани.

Устойчивость колонизированных растений к нафталину и нефти. Нафталин (“Химмед”, Россия) растворяли в спирте (исходный раствор 100 мг/мл). В расплавленную агаризованную среду МС добавляли нафталин (50–100 мкг/мл) или нефть (0.5–0.7%). Нефть получена с нефтеперерабатываю-

шего завода (“Газпромнефть” — Московский НПЗ”, Москва, Россия). Характеристики вносимой нефти: плотность — 0.868 г/см³; содержание воды — 0.06%; содержание солей — 45 мг/мл; механические примеси — 0.0080%; содержание серы — 1.42%; состав фракций (%): гексановая — 62.29; бензольная — 13.49; спиртобензольная — 11.21. В приготовленные пробирки пересаживали свежечеренкованные растения и проводили наблюдение за ростом растений в течение месяца.

Влияние нафталина на водоемкость, водообеспечение, водный дефицит растений томата. Для исследования влияния нафталина на водный режим [18] листья раскладывали на среду МС с нафталином (3–15 мкг/мл) и без нафталина (контроль), и инкубировали в чашках Петри течение 20 ч при температуре 22–24°C. Затем листья взвешивали (*A*), отмывали в дистиллированной воде и перекладывали в воду на 2 ч. Через 2 ч листья снова взвешивали (*C*) и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60°C в течение 16 ч. Сухие листья снова взвешивали (*D*) и проводили расчет по формулам:

$$\text{водоемкость: } (G) - G = (C - D) \times 100 / C;$$

водообеспечение:

$$(I) - I = (A - D) \times 100 / (C - D);$$

водный дефицит

$$(K) - K = (C - A) \times 100 / (C - D),$$

где *A* — начальный вес листьев; *C* — листья после 2-часовой инкубации на воде; *D* — листья после высушивания.

Определение перекисного окисления липидов. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрически по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (“Acros” Индия), основанному на взаимодействии ТБК с конечными продуктами окисления липидов, основную долю которых составлял малоновый диальдегид (МДА) (“Sigma”, США) [19]. Для этого растительный материал (300 мг) растирали в 5 мл 0.1 М Трис-НСl буфера (“Sigma”, США), pH 7.5, с 0.35 М NaCl (“Химмед”, Россия), отбирали 1.5 мл экстракта и добавляли к нему 1.0 мл 0.5%-ного ТБК в 20%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ, “Химмед”, Россия). Смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем очень быстро охлаждали во льду и центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 мин. После этого измеряли оптическую плотность проб при 532 и 600 нм.

Биотесты на изолированных листьях и растениях. Для проверки устойчивости колонизированных растений к фитопатогенам молодые листья инфицировали суспензией бактерий *E. carotovora* и *P. syringae*. В качестве контроля служили листья

не колонизированных растений. Фитопатогенными бактериями (суспензия 10³–10⁵ кл./мл) инокулировали черешки листьев колонизированных и не колонизированных растений, помещали их на агаризованную питательную среду МС в чашки Петри и выдерживали их в закрытых емкостях при 24°C и 16-часовом световом дне, через 1–7 сут оценивали степень повреждения. Целые растения заражали уколом иглы, смоченной в суспензии патогенных бактерий. В каждом варианте опыта заражали по 4 листа. В таблицах представлены средние арифметические величины и их стандартные отклонения по 3–5 опытам в 3 биологических повторностях в каждом из них *n* = 9–15 [7].

Анализ жирнокислотного состава семян томата. Подготовка пробы. Перевод липидов пробы в метиловые эфиры соответствующих высших жирных кислот выполняли методом безэкстракционного последовательного метилирования растворами метоксида натрия и трехфтористого бора в метаноле [20]. Каждый из образцов измельчали в кофемолке и просеивали сквозь сито с ячейками размером 0.7 мм. К навеске 16.0–22.0 мг порошкообразной пробы добавляли раствор 500 мкг марганисовой кислоты в 220 мкл толуола (внутренний стандарт) и 350 мкл 1.0 М метанольного раствора метоксида натрия. Смесь нагревали 20 мин при 70°C, добавляли 400 мкл 15%-ного трехфтористого бора в метаноле и нагревали еще 20 мин при 70°C. К реакционной смеси добавляли 0.7 мл воды и 2 мл перегнанного гептана, и экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот в органическую фазу, которую далее анализировали хроматографическим методом.

Хроматография. Анализ выполняли на аналитическом газовом хроматографе HP5890м (“Хьюлетт-Пакард”, США). Использована кварцевая капиллярная колонка размером 15 м × 0.2 мм × 0.2 мкм с полярной фазой “Супелковакс-10” м (“Supelco”, Швейцария), ввод пробы (0.5 мкл) — с делением потока газа-носителя (1 : 40). Температурная программа анализа — от 120°C (0.5 мин) до 240°C (5 мин) со скоростью 10°C/мин. Температуры испарителя/детектора (ДИП) — 260 и 255°C. Для регистрации сигнала использовали интегратор пиков “HP 3396А” (“Хьюлетт-Пакард”, США). Количественное определение жирных кислот масла семян томата выполнено методом внутреннего стандарта. Внутренний стандарт — марганисовую кислоту (17 : 0) вносили в каждый из образцов исследуемого материала непосредственно перед его химической дериватизацией.

Определение сахаров и оксикислот в томатном соке. Подготовка образцов. К 50 мкл исследуемого сока добавляли 50 мкл водного раствора D-маннита с концентрацией 1.0 мг/мл (внутренний стандарт) и упаривали раствор досуха в вакууме ротационной сушилки “Савант спидвак” (“Savant

Instrument IN", США). К сухому остатку добавляли 50 мкл 2%-ного раствора гидрохлорида метоксимиана в пиридине и нагревали при 80°C в течение 15 мин, после чего добавляли 120 мкл чистого бис (N,O-триметилсилил)трифторацетамида и дополнительно нагревали при 80°C в течение 30 мин. Состав смеси полученных триметилсилильных эфиров анализировали методом газовой хроматографии.

Хроматография. Анализ выполняли на аналитическом газовом хроматографе HP5890 ("Хьюлетт-Паккард", США) со следующими параметрами процесса: использована кварцевая капиллярная колонка SPB-1, размером 20 м × 0.2 мм × 0.2 мкм, газ-носитель — гелий (1.8 мл/мин), метод ввода пробы — с делением потока газа-носителя (1 : 65), объем вводимой жидкой пробы — 1 мкл, температурная программа анализа — от 80°C (0.5 мин) до 310°C со скоростью 10°C/мин, температуры испарителя и пламенно-ионизационного детектора (ДИП) — 280 и 320°C соответственно. Для регистрации сигнала использовали интегратор пиков HP3396A. Для количественной обработки результатов использовали метод внутреннего стандарта с добавлением D-маннита [21].

Биометрические исследования. Для определения влияния ассоциативных бактерий на рост и развитие растений томата и табака и их адаптацию к условиям закрытого грунта, колонизированные растения из стерильных условий высаживали в закрытый грунт станции искусственного климата "Биотрон" ФИБХ РАН (Пушино, Россия). Биометрические измерения проводили еженедельно, отмечая время наступления фенологических фаз.

Статистические методы анализа. Для статистической обработки данных использовали программы Statistica 6.0 и MS Excel 2007. Измерения проводили в трех аналитических и трех биологических повторностях. На графиках и диаграммах приведены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического критерия Мана—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Колонизация растений. Колонизацию растений бактериальными штаммами проводили в условиях *in vitro*. Стерильные растения однократно опрыскивали суспензией одной из бактерий *P. fluorescens*, *A. baumannii*, *R. erythropolis*, *P. aureofaciens*, *P. putida*, *M. mays* (табл. 1), с титром клеток 10^3 — 10^5 . Через 1–2 нед. после черенкования проводили тестирование на установление ассоциативной связи бактерий с растениями *in vitro*. Затем растения высаживали в теплицу на 7 нед. после колонизации проводили тестирование растений *in vitro*. Для этого экстракты, полученные из растительных эксплантов, наносили на поверхность

Таблица 2. Количество бактерий на корнях томата после колонизации в расчете на 1 г сырой массы*

Колонизация, штамм	Время выращивания, сут		
	7	14	49
<i>M. mays</i>	—	2.45 ± 0.23	2.50 ± 0.29
<i>P. fluorescens</i>	3.30 ± 0.34	3.43 ± 0.29	3.53 ± 0.31
<i>P. putida</i>	3.15 ± 0.38	3.24 ± 0.30	3.34 ± 0.32
<i>P. aureofaciens</i>	3.34 ± 0.45	3.38 ± 0.31	3.49 ± 0.41
<i>A. baumannii</i>	2.38 ± 0.29	3.45 ± 0.27	3.55 ± 0.45
<i>R. erythropolis</i>	3.30 ± 0.43	3.42 ± 0.38	3.49 ± 0.48

* Приведены десятичные логарифмы КОЕ; допустимые значения отклонений в пределах от 0 до 1.0 lgКОЕ/г сырой массы. "—" — не определяли.

питательной среды с селективными антибиотиками в чашках Петри и инкубировали 2 сут при температуре 22–24°C (табл. 2). Через 1 нед. после колонизации томатов бактериями их численность на корнях увеличивалась с 2.4×10^3 до 2.0×10^4 КОЕ/г сырой массы, через 7 нед. с 3.2×10^3 до 3.6×10^4 КОЕ/г сырой массы. В последующих циклах микроразмножения растений содержание бактерий *M. mays*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens*, *A. baumannii* и *R. erythropolis* в корнях сохранялось стабильно практически на одном уровне в течение всего периода вегетации, что указывало на их прочную ассоциацию с растениями.

Влияние колонизации на рост и развитие растений. Растения, колонизированные штаммами *Pseudomonas* и *M. mays*, отличались повышенной скоростью роста по сравнению с контрольными растениями (не колонизированными) (табл. 3). Бутонизация, цветение и плодоношение также начинались раньше у колонизированных растений. К 5 нед. роста в теплице растения, колонизированные *M. mays*, практически все уже были с бутонами (91%), количество бутонов у растений, колонизированных другими штаммами, было от 40 до 75%, а у контрольных растений — 42%. Цветение томатов наблюдали у 5–10% (от общего количества) растений, колонизированных *P. aureofaciens*, *M. mays* и *P. putida* на 6 нед. после высадки в теплицу, в то время как цветение контрольных растений начиналось только на 7 нед. (табл. 4). Колонизация растений положительно влияла на урожайность растений томата. Число плодов на одном колонизированном растении увеличилось в среднем на 10–20%, по сравнению с контрольными неколонизированными растениями (табл. 4). Средняя масса одного плода у контрольных растений составила 80.4 г. У колонизированных растений масса одного плода была в среднем выше на 2.1–17.7%. Растения томатов, колонизированные исследуемыми штаммами превосходили по урожайности контрольные растения на 14.6–45.9% (табл. 5).

Таблица 3. Высота колонизированных растений (см) через 1–7 нед. выращивания в теплице, см

Вариант	Время выращивания, нед						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>M. mays</i>	3.8 ± 0.3	6.8 ± 0.5	11.4 ± 1.0	19.3 ± 1.7	29.7 ± 2.5	40.5 ± 4.1	50.2 ± 5.0
<i>P. fluorescens</i>	4.3 ± 0.4	7.1 ± 0.6	12.2 ± 1.1	21.2 ± 1.9	31.3 ± 3.1	40.3 ± 3.9	48.5 ± 4.5
<i>P. putida</i>	5.1 ± 0.4	12.7 ± 0.9	13.7 ± 1.3	19.1 ± 1.6	25.2 ± 2.4	31.3 ± 3.1	45.6 ± 4.3
<i>P. aureofaciens</i>	4.7 ± 0.3	10.8 ± 1.1	12.9 ± 1.2	14.6 ± 1.3	26.6 ± 2.5	34.7 ± 3.5	43.7 ± 4.2
<i>A. baumannii</i>	3.4 ± 0.4	7.6 ± 0.6	11.4 ± 1.0	15.9 ± 1.5	20.8 ± 2.0	26.0 ± 2.4	35.5 ± 3.1
<i>R. erythropolis</i>	5.9 ± 0.5	14.3 ± 1.2	15.5 ± 1.4	22.1 ± 2.0	27.7 ± 2.7	39.3 ± 3.8	41.4 ± 4.0
Контроль	4.3 ± 0.4	6.7 ± 0.5	10.1 ± 0.8	15.7 ± 1.4	26.4 ± 2.5	35.0 ± 3.3	42.1 ± 4.3

Таблица 4. Бутонизация, цветение и плодоношение томатов (%) при колонизации различными штаммами бактерий

Колонизация, штамм	Показатель	Время выращивания, нед				
		5	6	7	8	9
<i>M. mays</i>	Бутонизация	91	100	100	100	100
	Цветение	—	10	82	100	100
	Плодоношение	—	—	—	54.5	100
<i>P. fluorescens</i>	Бутонизация	75	85	96	100	100
	Цветение	—	—	76	100	100
	Плодоношение	—	—	—	50	100
<i>P. putida</i>	Бутонизация	71	80	95	100	100
	Цветение	—	10	70	100	100
	Плодоношение	—	—	—	45	100
<i>P. aureofaciens</i>	Бутонизация	65	79	90	100	100
	Цветение	—	5	68	90	100
	Плодоношение	—	—	—	20	92
<i>A. baumannii</i>	Бутонизация	40	55	90	100	100
	Цветение	—	—	29	93	97
	Плодоношение	—	—	—	15	86
<i>R. erythropolis</i>	Бутонизация	41	62	95	100	100
	Цветение	—	—	30	55	88
	Плодоношение	—	—	—	19	90
Контроль	Бутонизация	42	75	100	100	100
	Цветение	—	—	33	41.7	100
	Плодоношение	—	—	—	16.7	91.7

Примечание. “—” — не определен.

Таблица 5. Урожайность томатов при колонизации растений различными штаммами бактерий

Колонизация, штамм	Масса одного плода, г	Количество плодов на 1 растении (15 нед)	Урожай с 1 растения, г	Число семян в 1 плоде
<i>M. mays</i>	90.4 ± 8.3	7.4 ± 0.6	668.9 ± 62	105.3 ± 9.4
<i>P. fluorescens</i>	88.5 ± 7.8	6.1 ± 0.4	539.8 ± 49	129.5 ± 11.2
<i>P. putida</i>	84.4 ± 9.1	6.7 ± 0.5	565.4 ± 57	131.1 ± 10.7
<i>P. aureofaciens</i>	85.6 ± 6.9	6.2 ± 0.4	530.7 ± 51	110.4 ± 11.6
<i>A. baumannii</i>	94.7 ± 9.4	5.9 ± 0.6	558.7 ± 61	99.8 ± 8.7
<i>R. erythropolis</i>	82.1 ± 8.5	6.4 ± 0.4	525.4 ± 48	126.8 ± 13.4
Контроль	80.4 ± 7.6	5.7 ± 0.5	458.2 ± 39	74.36 ± 7.9

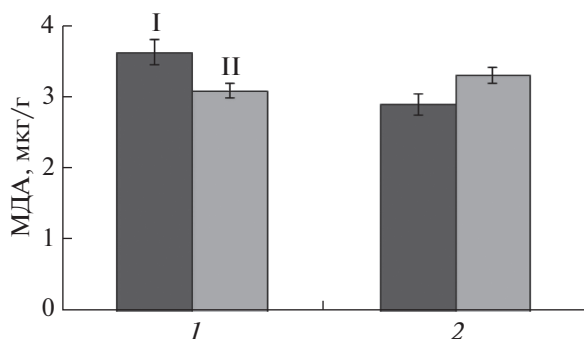


Рис. 1. Влияние нафталина на уровень ПОЛ у контрольных (I) и колонизированных (2) растений при выращивании *in vitro* в течение 1 сут. I — контроль, на среде МС, II — на среде МС с добавлением 50 мг/мл нафталина.

Устойчивость колонизированных растений к нафталину и нефти. В экспериментах по устойчивости растений к нефти и нафталину использовали растения табака. Бактерии штаммов *P. putida* BS3701, *P. fluorescens* 142NF содержали гены салицилатгидроксилазы NahG и NahU, которые играют основную роль в деградации токсичных полициклических ароматических углеводородов. [14, 22].

Контрольные и колонизированные *P. putida* растения были высажены на среды МС с добавлением нафталина 50, 70 и 100 мкг/мл. На среде с концентрацией нафталина 50 мкг/мл растения выращивались в течение месяца. При наблюдении за их ростом было отмечено, что как неколонизированные, так и колонизированные хорошо укоренялись, росли и внешне не отличаются от растений, растущих на среде МС без нафталина. Через 1 сут роста на среде с нафталином в растениях определяли уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ). У контрольных и колонизированных растений, растущих на нафталине, уровень ПОЛ практически не отличался от уровня растений, растущих на среде МС без нафталина (рис. 1).

При концентрации нафталина в среде 70 мкг/мл было показано, что колонизация растений микроорганизмами значительно повышала их устойчивость к этому ксенобиотику. Увеличение уровня ПОЛ на 85–86% по сравнению с растениями, растущими без нафталина, отмечали через 4, 7 сут выращивания на нафталине (рис. 2). У колонизированных *P. putida* растений уровень ПОЛ на среде с нафталином незначительно отличался от уровня ПОЛ растений, выращенных на среде МС без нафталина (рис. 2). Через 7 сут культивирования растений на среде с 70 мкг/мл нафталина отмечали пожелтение листьев контрольных растений, в то время как у колонизированных растений листья оставались зелеными. Уровень ПОЛ у контрольных растений на среде с нафталином увеличивал-

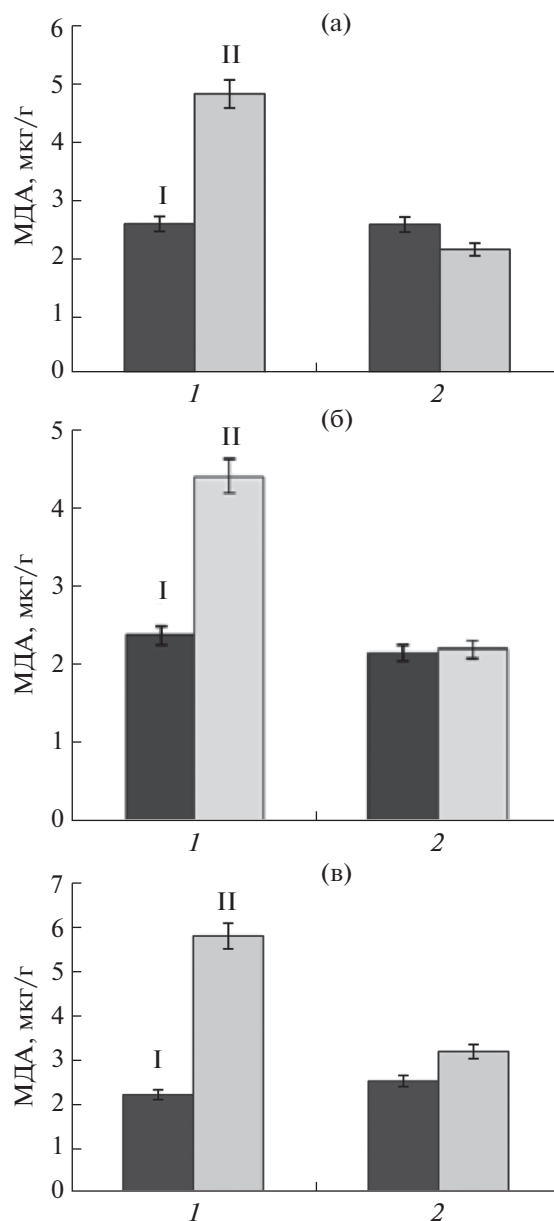


Рис. 2. Влияние нафталина на уровень ПОЛ у контрольных (I) и колонизированных (2) растений *in vitro* после первых (а) четвертых (б) и 7 сут (в) выращивания: I — среда МС; II — среда МС с добавлением 70 мг/мл нафталина.

ся на 160%, что указывало на сильный стресс для этих растений (рис. 2в), в то же время колонизированные растения практически не испытывали абиотический стресс при выращивании на среде МС с 70 мкг/мл нафталина в течение 7 сут.

При повышении концентрации нафталина в среде до 100 мкг/мл наблюдали потерю тургора листьев контрольных растений. Листья колонизированных растений сохраняли тургор и зеленый цвет. Уровень ПОЛ растений определяли через 7 сут

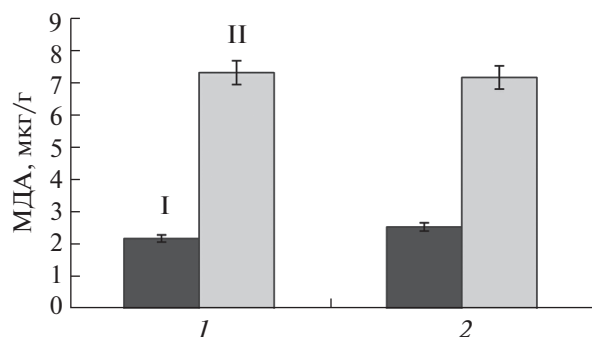


Рис. 3. Влияние нафталина на уровень ПОЛ у контрольных (1) и колонизированных *P. putida* (2) растений *in vitro* при выращивании в течение суток. I — среда МС, II — среда МС с добавлением 100 мкг/мл нафталина.

роста на среде с нафталином. При этом уровень ПОЛ у контрольных растений увеличивался на 230% и у колонизированных на 179%, что означало высокую токсичность его для растений обеих групп (рис. 3).

Влияние нафталина на водный режим растений томата. Для определения водного режима растений листья колонизированных и контрольных растений, выросших *in vivo*, подвергали абиотическому стрессу, выдерживая их в парах нафталина 3–15 мкг/мл в течение 20 ч. Растения, колонизированные *P. putida* были более устойчивы к стрессу, несмотря на действие нафталина и повышение водного дефицита в листьях до 20% (табл. 6). При повышении концентрации нафталина происходило нарушение метаболизма, листья теряли массу и погибали. У контрольных растений нарушение метаболизма наступало уже при концентрации нафталина 3 мкг/мл и измерение водного режима становилось недоступным.

Определение отношения площади листа к сухой массе наглядно показало, что при повышении концентрации стрессового агента происходило нарастание распада веществ как у колонизированных так и контрольных растений (табл. 7). Концентрации нафталина 10–15 мкг/мл оказались токсичными для клеток, и через сутки наблюдалась гибель листьев при таких концентрациях.

Исследование колонизированных растений, растущих на нефти. Для исследования устойчивости колонизированных растений к нефти растения высаживали на среду с различными концентрациями нефти (0.5–0.7%). Через неделю культивирования колонизированных растений на среде с нефтью на корнях обнаруживали рост бактерий *P. putida*. Для этого экстракты корней наносили на поверхность питательной среды с селективными антибиотиками и, после образования колоний через 2 сут, проводили подсчет КОЕ *P. putida*. (Данные не приведены). Предварительно для выполнения эксперимента на поверхность среды МС наносили 0.5–0.7% нефти (от объема среды). На эту среду высаживали контрольные и колонизированные *P. putida* растения, за которыми наблюдали в течение месяца. Стресс, обусловленный влиянием нефти, действовал на обе группы растений, однако колонизированные растения были более жизнеспособны за счет присутствия на корнях бактерий-нефтедеструкторов. На среде с содержанием нефти 0.5% колонизированные растения сохраняли способность к росту и образованию новых почек в течение времени эксперимента — 27 дней (рис. 4а), а повышение концентрации нефти до 0.7% в среде приводило к полной гибели контрольных растений и частичной гибели колонизированных растений, при этом верхушечные листья колонизированных растений оставались зелеными (рис. 4б).

Таблица 6. Водный режим листьев томата, колонизированных *Pseudomonas putida*

Концентрация нафталина, мкг/мл	Водоемкость	Водообеспечение	Водный дефицит
Листья растений, колонизированные <i>Pseudomonas putida</i>			
3	90.26 ± 9.7	81.42 ± 8.0	18.57 ± 1.7
5	90.10 ± 8.8	73.05 ± 7.2	20.18 ± 2.2
10			
15			
Вода	87.67 ± 8.7	89.00 ± 8.6	9.64 ± 0.7
Листья контрольных растений			
3	—	—	—
5	—	—	—
10	—	—	—
15	—	—	—
Вода	88.55 ± 8.6	90.92 ± 9.1	9.07 ± 0.7

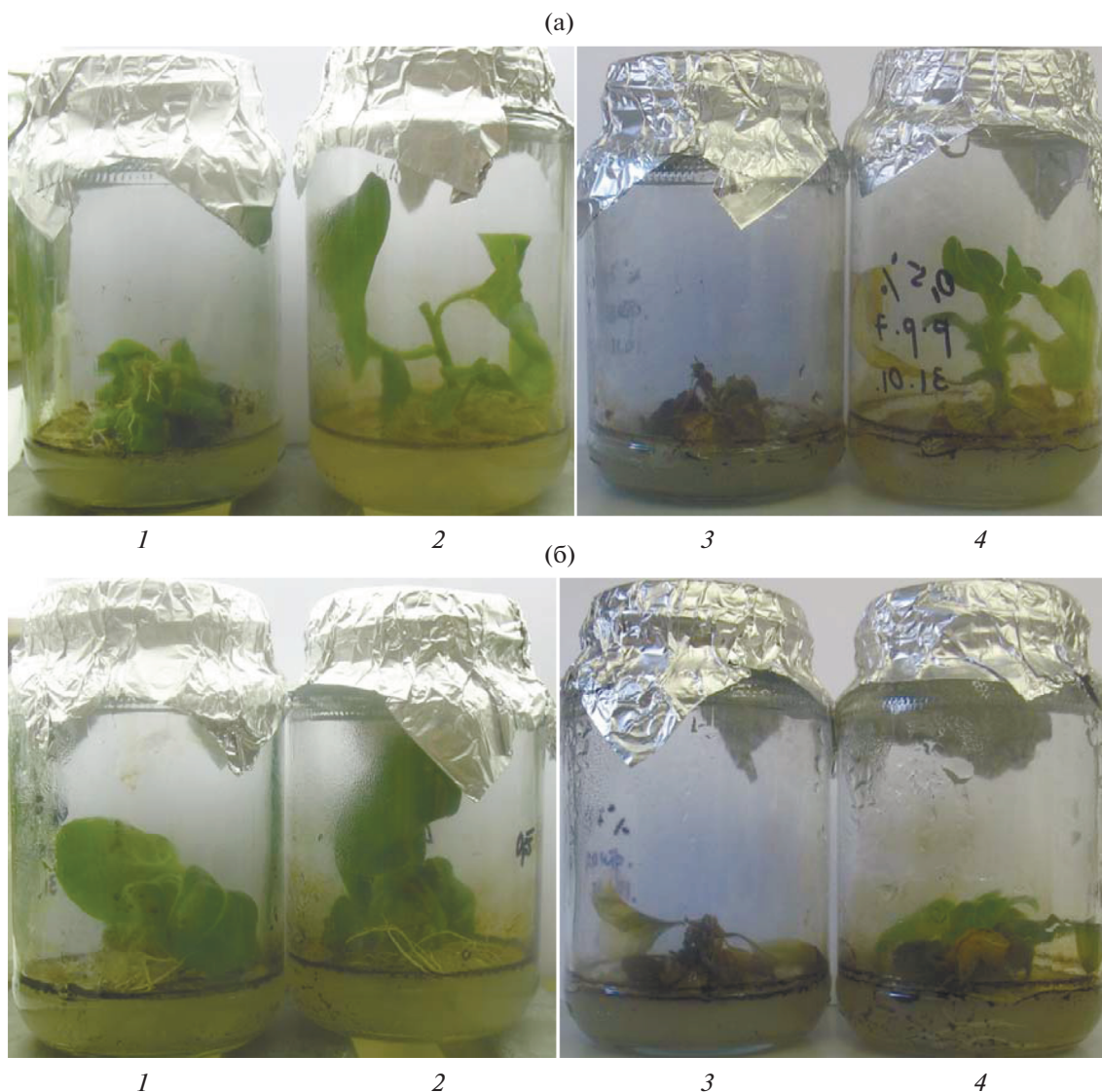


Рис. 4. Растения табака, культивируемые на среде с 0.5 (а) и 0.7%-ным (б) содержанием нефти. Растения в момент высадки (1, 2) и через 27 сут выращивания (3, 4). 1, 3 – контрольные растения; 2, 4 – растение, колонизированное *P. putida*

Устойчивость колонизированных растений к фитопатогенам. Уже через 1 сут после инокуляции на контрольных листьях, зараженных бактериальным штаммом *E. carotovora*, отмечали разрушение ткани мезофилла. К концу 2 сут поражение площади контрольных листьев составляло 100%. При заражении растений *P. syringae* признаки повреждения наблюдались через 4–5 сут – листья желтели и покрывались бурными пятнами. В то же время листья растений, колонизированных *P. aureofaciens* и *M. mays*, оставались без признаков повреждения (рис. 5а). Аналогичные симптомы болезни наблюдались при заражении целых растений. Колонизированные растения оставались неповрежденными в течение всего времени эксперимента, в то время как контрольные растения полностью погибали (рис. 5б).

Таблица 7. Изменение отношения площади листа к сухому весу в зависимости от концентрации нафталина

Вариант	Концентрация нафталина, мкг/мл	$S_{\text{листа}}/\text{сухой вес}$
Колонизированные <i>Pseudomonas putida</i>	3 нафталина	1.01×10^{-3}
	5	0.91×10^{-3}
	10	0.57×10^{-3}
	15	0.47×10^{-3}
	Вода	0.9×10^{-3}
Неколонизированные (контроль)	3	0.92×10^{-3}
	5	0.84×10^{-3}
	10	0.7×10^{-3}
	15	—
	Вода	1.15×10^{-3}

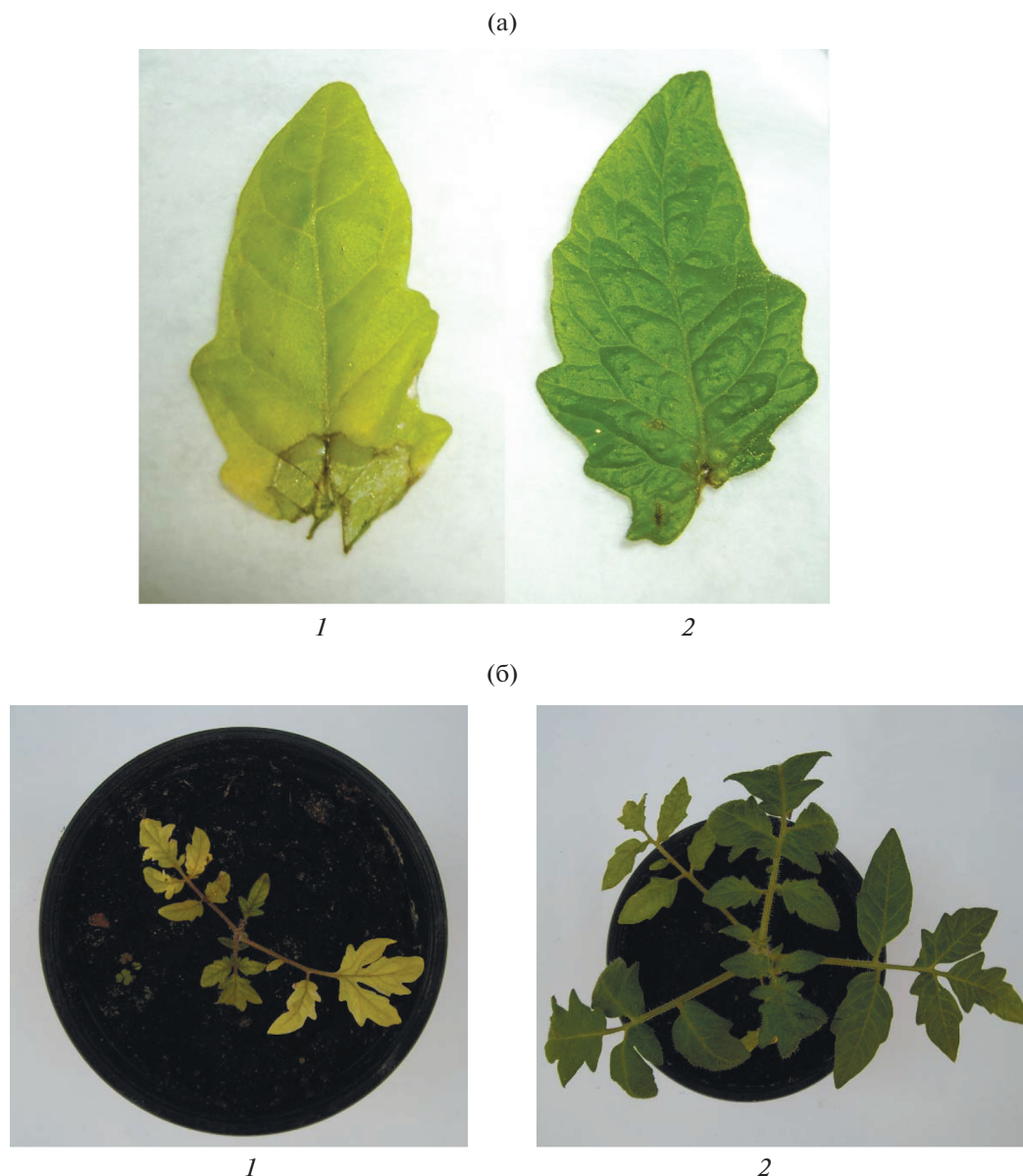


Рис. 5. Устойчивость отдельных листьев колонизированных *P. aureofaciens* растений томата к *Erwinia carotovora* (a) и *P. syringae* (б). 1 – лист контрольного растения – пожелтение и некроз ткани; 2 – лист колонизированного растения – полное сохранение первоначальных плотности и цвета.

Анализ жирнокислотного состава масла семян томатов. Семена томатов являются основным побочным продуктом при изготовлении томатной пасты в промышленности, которые составляют около 71–72% от общего производства отходов [23]. Масло семян томатов является отличным источником ценных жирных кислот (**ЖК**), которое используется в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности [24].

Исследовано влияние колонизации растений микробными штаммами на жирнокислотный состав семян томатов. Результаты относительного содержания индивидуальных ЖК к массе всех

ЖК семян приведены в табл. 8. Анализ показал увеличение процентной доли насыщенных ЖК стеариновой (C18:0) от 4.3% в контроле до 5.0–6.3% в опыте (колонизированные растения) и олеиновой (C18:1) от 18.5% в контроле до 19.7–20.1% в опыте, в зависимости от штамма. Суммарное содержание ЖК в биомассе семян (вес./%) было выше у семян колонизированных растений.

Известно, что липиды являются интегральными компонентами клеточных мембран. Среди групп липидов важное место занимают стерины, которые стабилизируют мембраны и контролируют их проницаемость. В растениях стерины в больших

Таблица 8. Состав и относительное содержание (%) жирных кислот липидов семян контрольных и колонизированных растений томата (*Lucopersicon esculentum* Mill.)*

Жирная кислота**	Контроль	<i>P.aureofaciens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>R.erythropulis</i>	<i>A.baumannii</i>	<i>M. mays</i>
Пальмитиновая (C16:0)	13.5	12.9	13.6	13.1	13.2	13.0	14.3
Стеариновая (C18:0)	4.29	6.11	4.62	5.33	4.95	6.25	5.14
Олеиновая (цис-9-октадеценовая, C18:1)	18.5	19.7	18.5	19.7	19.6	20.1	20.1
Линолевая (октадекадиеновая, C18:2 _ ω6)	61.2	56.5	60.1	58.3	58.3	53.7	57.0
α-Линоленовая (октадекатриеновая, C18:3 _ ω3)	2.51	2.45	3.38	2.54	2.63	2.35	2.40
Арахидовая (эйкозановая, C20:0)	0.34	0.44	0.35	0.38	0.41	0.46	0.46
Суммарное весовое содержание ЖК в биомассе семян, вес/%	26.2	26.9	26.6	28.8	29.5	30.8	26.4

* Приведены средние арифметические величины 3 аналитических измерений из 3 биологических повторностей. Во всех случаях величина стандартного отклонения не превышала 3% от среднего. ** В липидах растений содержались также пальмитиновая кислота (цис-9-гексадеценовая, C16:1-цис-9) и гондоиновая (цис-11-эйкозеновая) (C20:1), концентрация каждой из которых составляла ≤2%.

Таблица 9. Содержание кислот (мг/100 г сырого веса) и сахаров в зрелых плодах колонизированных растений томатов

Штамм, используемый для колонизации растений	Яблочная кислота	Лимонная кислота	Фруктоза, г/кг	Глюкоза г/кг
<i>M. mays</i>	60.0 ± 6.4	55.8 ± 5.6	12.5 ± 1.2	9.5 ± 0.9
<i>P. fluorescens</i>	65.9 ± 6.2	90.4 ± 8.7	10.9 ± 1.3	7.7 ± 0.8
Контроль	66.0 ± 7.1	62.1 ± 6.3	11.4 ± 1.1	8.0 ± 0.6

количествах обнаруживались в тех органах и тканях, которые интенсивно функционируют и содержат большое число делящихся клеток: меристема, хлоропласты, семена [25]. При стрессовых воздействиях на растение, таких как низкая температура уровень стерина повышается и тем самым стабилизирует состояние растительного органа [26]. В состав стерина входит олеиновая кислота. В экспериментах доля олеиновой кислоты в семенах повышалась после колонизации, что указывало на мобилизацию некоторых защитных систем растений.

Анализ сахаров и оксикислот в томатном соке. В томатном соке растений, колонизированных штаммами *M. mays* и *P. fluorescens*, обнаружены углеводы — фруктоза и глюкоза, оксикислоты — яблочная и лимонная (табл. 9). Различия в количестве сахаров и оксикислот в колонизированных томатах и контрольных практически не наблюдали.

Таким образом, методы создания стабильной ассоциации растений с микроорганизмами, способными стимулировать их рост, эффективно

конкурировать с фитопатогенами и вызывать деградацию чужеродных соединений в окружающей среде, перспективны для восстановления микробных биоценозов и поддержания естественного плодородия почв.

Работа выполнена по Госзаданию № 0101-2014-0046, РК 01201352439 и при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 19.08.00375, 18-08-00752, 19-08-00299

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haas D., Defago G. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. № 4. P. 307–319.
2. Lugtenberg B., Kamilova F. // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 541–556.
3. Glick B.R. // Hindawi Publishing Corporation Scientific. 2012. V. 2012. Article ID 963401, 15 p. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
4. Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Пунтус И.Ф., Филов А.Е., Боронин А.М. // Биотехнология. 2009. № 4. С. 82–90.

5. Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Кошелева И.А., Боронин А.М. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 1–7.
6. Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Васильчиков А.Г., Жуков В.А., Кожемяков А.П., Наумкина Т.С., Штарк О.Ю., Яхно В.В., Чеботарь В.К. // Зернобобовые и крупяные культуры. 2012. № 3. С. 11–17.
7. Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Кочетков В.В., Чепурнова М.А., Дьяченко О.В., Лебедева А.А., Захарченко А.В., Пунтус И.Ф., Боронин А.М., Бурьянов Я.И. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 89–98.
8. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 133–143.
9. Кожемяков А.П., Белоброва С.Н., Орлова А.Г. // Сел.-хоз. биология. 2011. С. 112–115.
10. Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005. 166 с.
11. Knoblich M., Anderson B., Latshaw D. // J. Sci. Food Agric. 2005. V. 85. P. 1166–1170.
12. Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant., 1962, V. 15. № 3. P. 473–497.
13. Hol W.H.G., Bezemer T.M., Biere A. // Front. Plant. Sci. 2013. V. 10. № 4. P. 81.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00081>
14. Анохина Т.О., Сиунова Т.В., Сизова О.И., Захарченко Н.С., Кочетков В.В. // Агрохимия. 2018. № 10. С. 54–66.
15. Доронина Н.В., Кудинова Л.В., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 712–716.
16. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C. // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. № 3. С. 282–290.
17. Sambrook J., Fritsch E.E., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
18. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. // Физиология растений. М.: "Высшая школа", 2005. 742 с.
19. Uchiyama M. // Analytic. Biochem., 1978. V. 86. P. 287–297.
20. Griffiths M.J., van Hille R.P., Harrison S.T. // Lipids. 2010. V. 11. № 45. P. 1053–1060.
21. Knapp D.R. Handbook of Analytical Derivatization Reactions. USA: Wiley–Interscience Publication, 1979. 553 p.
22. Пунтус И.Ф., Рязанова Л.П., Звонарев А.Н., Фунтикова Т.В., Кулаковская Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 198–205.
23. Fahimdanesh M., Bahram M.E. // J. Nutr. Food Sci. 2013. V. 3. № 3.
<https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000206>
24. Botinestean C., Gruia A.T., Jianu I. // J. Material Cycles and Waste Management. 2015. V. 17. № 1. P. 118–124.
25. Grunwald C. // Plant Physiol., 1970. V. 45. № 4. P. 663–666.
26. Девятловская А.Н., Журавлева Л.Н., Алашкевич Ю.Д. Химия растительного сырья. 2014. № 2. С. 195–198.

Effects of Associative Microorganisms on Plant Growth and Resistance to Xenobiotics and Phytopathogens

S. V. Pigoleva^a, N. S. Zakharchenko^{a,*}, O. V. Furs^a, S. V. Tarlachkov^{a,b}, T. V. Funtikova^b,
A. E. Filonov^{b,d}, A. V. Aripovskii^c, O. V. Dyachenko^a, Y. I. Buryanov^a, and T. V. Shevchuk^a

^aShemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

^bSkryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia

^cCompany "A-BIO", Pushchino, 142290 Russia

^dTula State University, Tula, 300012 Russia

*e-mail: znata_2008@mail.ru

The *in vivo* and *in vitro* interactions between tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and bacteria *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas putida*, *Methylovorus mays*. Stable associations of these microorganisms with plants are demonstrated, colonized plants were characterized by accelerated growth, yield and better adaptation to *in vivo* conditions. Colonized plants were characterized enhanced resistance to bacterial phytopathogens *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas syringae*. Plants colonized by bacteria resistant to naphthalene can grow steadily on the medium containing this compound. The results obtained indicate a promising usage of beneficial associative microorganisms for the development of technologies for plant protection against biotic and abiotic stressors.

Keywords: associative microorganisms, phytopathogens, colonization