ВЛИЯНИЕ *FUSARIUM CULMORUM* И *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* НА СОСТАВ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТАХ ЯЧМЕНЯ

А.И. Шапошников[1], Н.А. Вишневская[1], В.Ю. Шахназарова[1,2], О.К. Струнникова[1], А.А. Белимов[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, *ai-shaposhnikov@mail.ru*

[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия, Россия, *shahnazarova-v@mail.ru*

Аннотация. Изучен состав органических кислот в корневых экзометаболитах стерильных растений ячменя и растений, инокулированных *Fusarium culmorum* 30 и *Pseudomonas fluorescens* SPB2137. Показано, что рост в ризосфере ячменя фитопатогенного гриба и биоконтрольного штамма ризобактерий снижает количество органических кислот в корневых экссудатах.

Ключевые слова: *корневые экссудаты, органические кислоты, ячмень, фузариоз*

Исследование процесса колонизации корней фитопатогенными грибами рода *Fusarium*, в том числе при их взаимодействии с биоконтрольными штаммами ризобактерий, является необходимым шагом в понимании механизмов инфицирования и поиске путей подавления развития фузариозов [Струнникова и др., 2010]. При этом процессы колонизации корней и ризосферы микроорганизмами, приводящие к формированию специфических ризосферных микробных сообществ, во многом обусловлены количественным и качественным составом корневых экзометаболитов [Bais et al., 2006; Broeckling et al., 2008].

Как известно, выделение корнями низкомолекулярных органических кислот играет важную роль в физиолого-биохимических механизмах адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды – высокой кислотности почв, действию токсичных металлов [Пухальская, 2005; Ryan et al., 1995; Haoliang et al., 2007; Magdziak et al., 2011]. В растительно-микробных взаимодействиях органические кислоты корневых экссудатов играют важную роль для успешной колонизации корней ризобактериями и проявления их биоконтрольных механизмов. Показано, что мутант *Pseudomonas fluorescens* WCS365, не способный расти на органических кислотах, плохо колонизировал корни томата [de Weert et al., 2002], а корневая экссудация яблочной кислоты активно индуцировала хемотаксис и подвижность *Bacillus amyloliquefaciens* к корням томата [Tan et al., 2013]. При росте на органических кислотах антифунгальная активность ризосферных штаммов рода *Pseudomonas*, как правило, выше, чем при росте этих же штаммов на сахарах [Кравченко и др., 2003]. Интересный механизм, затрагивающий взаимодействие растений одновременно с полезными и патогенными микроорганизмами, был описан в работе [Rudrappa et al., 2008]. При инфицировании листьев арабидопсиса патогенной бактерией *Pseudomonas syringia* активизировалась корневая экссудация яблочной кислоты. Это существенно повышало колонизирующую способность у ростстимулирующей ризосферной бактерии *Bacillus subtilis*, которая индуцировала в растении системную устойчивость к фитопатогену, что приводило в результате к снижению заболеваемости растений.

Таким образом, органические кислоты могут влиять на процесс конкурентного развития фитопатогенных грибов и биоконтрольных ризобактерий в ризосфере

растений. Цель настоящей работы – оценить влияние фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum* 30 и биоконтрольного штамма *Pseudomonas fluorescens* SPB2137 на качественный состав и интенсивность корневой экссудации низкомолекулярных органических кислот растениями восприимчивого к фузариозу ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Белогорский.

Для получения корневых экссудатов растения выращивали 5 суток в закрытых стерильных сосудах с минеральным питательным раствором. После удаления растений в вариантах с инокуляцией в сосуды вносили суспензии макроконидий *F. culmorum* 30 (10^3/мл), клеток *P. fluorescens* SPB2137 (10^5/мл), или совместно макроконидии гриба и клетки бактерий в тех же концентрациях. Полученные экссудаты концентрировали под вакуумом и состав органических кислот анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Как показал проведенный хроматографический анализ, в корневых экссудатах ячменя присутствуют девять органических кислот – лимонная, пировиноградная, яблочная, аконитовая, янтарная, молочная, фумаровая, пропионовая и пироглутамовая. Суммарная экссудация органических кислот у стерильных растений была в среднем 51 мкг/растение, причем доля яблочной, молочной и пропионовой кислот составляла порядка 80% от общего количества. Для проверки способности *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 утилизировать органические кислоты, входящие в состав корневых экссудатов, микроорганизмы культивировали в минеральной среде, содержащей соответствующие вещества в качестве единственного источника углерода. Ризобактерии активно утилизировала все органические кислоты, кроме пропионовой. Гриб также мог расти на всех органических кислотах, причем наиболее активный рост мицелия отмечался на яблочной, янтарной, пропионовой и пироглутамовой кислотах.

Инокуляция раствора корневых экссудатов фитопатогенным грибом *F. culmorum* 30 привела к резкому снижению количества яблочной (в 2,3 раза) и молочной (в 6 раз) кислот, а также незначительному уменьшению количества лимонной и пропионовой кислот (рисунок). В присутствии штамма *P. fluorescens* SPB2137 в корневых экссудатах полностью исчезала лимонная кислота, а количества яблочной и молочной кислот уменьшались в 5 и 6 раз соответственно. Вариант с одновременным внесением гриба и бактерий был количественно более близок к варианту с внесением штамма SPB2137 (рисунок). Несмотря на то, что штамм *P. fluorescens* SPB2137 не рос на химически чистой пропионовой кислоте, ее содержание в корневых экссудатах также значительно снижалось как при моноинокуляции ризобактериями, так и при одновременном внесении бактерий и гриба (рисунок), что может быть связано с особенностями метаболизма ризобактерий в ризосфере, в условиях утилизации комплексных питательных субстратов с низкой концентрацией. При совместном культивировании штамм *P. fluorescens* SPB2137 оказывал негативное воздействие на гриб, что было заметно по формированию хламидоспор. Однако, численность бактерий в варианте с двойной инокуляцией была в несколько раз ниже, чем в отсутствии гриба, что говорит о конкурентных взаимоотношениях между фитопатогенным грибом и биоконтрольным штаммом SPB2137.

Таким образом, фитопатогенный гриб *F. culmorum* 30 и биоконтрольный штамм *P. fluorescens* SPB2137 снижает количество органических кислот в корневых экссудатах ячменя. Как гриб, так и бактерии способны использовать органические кислоты корневых экссудатов в качестве источника питания. Тот факт, что основные компоненты фракции органических кислот утилизируются как грибом, так и бактерией показывает, что конкуренция за данные источники питания может вносить определенный вклад в конкурентные взаимоотношения фитопатогенных грибов и ризобактерий. Дальнейший анализ особенностей метаболизма выделяемых корнями

фотосинтатов в системе растение – фитопатогенный гриб – ризобактерии (*in vivo*) позволит изучить влияние микроорганизмов на физиолого-биохимические параметры корневой экссудации и роль корневых экзометаболитов в формировании устойчивых к фитопатогенам растительно-микробных систем.

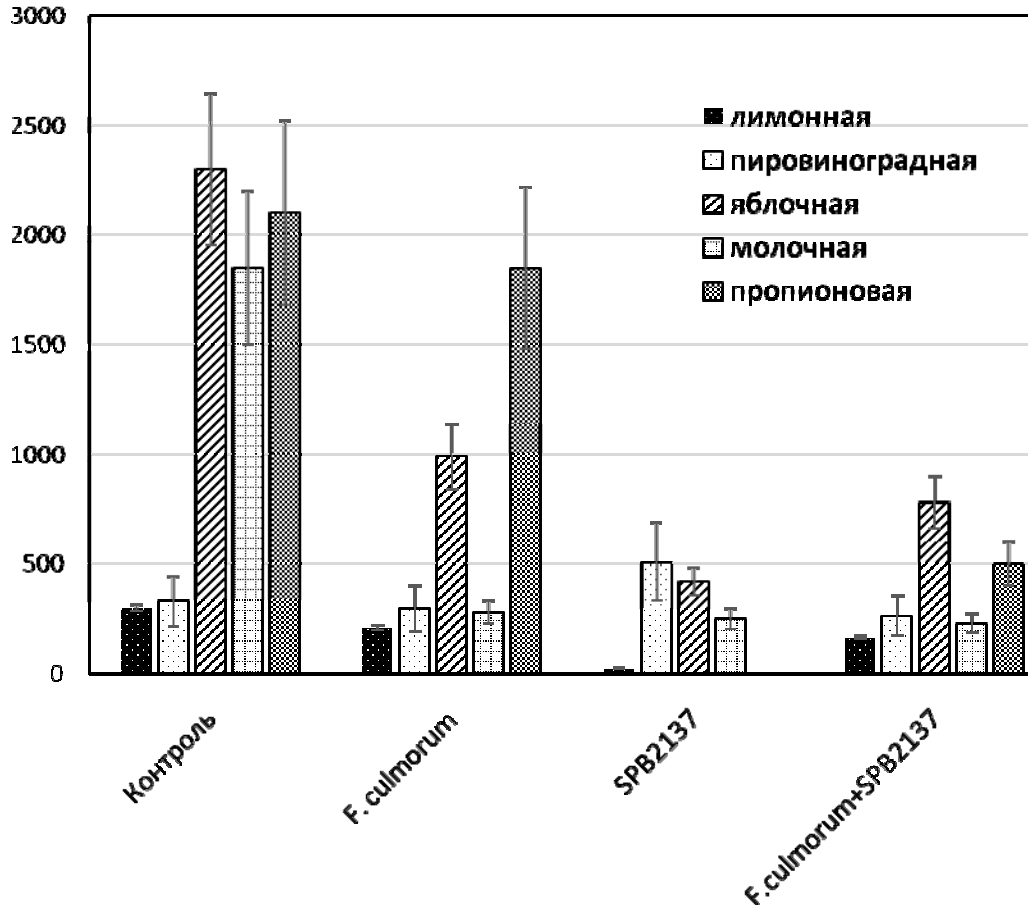


Рисунок. Низкомолекулярные органические кислоты в корневых экссудатах ячменя. Контроль – корневые экссудаты стерильных растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-016-00111.

Литература

Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Леонова-Ерко Е.И., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Тихонович И.А. Корневые выделения томатов и их влияние на рост и антифунгальную активность штаммов *Pseudomonas* // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 1. – С. 48–53.

Пухальская Н.В. Проблемные вопросы алюминиевой токсичности // Агрохимия. – 2005. – № 8. – 70–82.

Струнникова О.К., Вишневская 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.

Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // Annual Review of Plant Biology. – 2006. – V. 57. – P. 233–266.

Broeckling C.D., Broz A.K., Bergelson J., Manter D.K., Vivanco J.M. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – V. 74, No. 3. – P. 738–744.

de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H.M., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V., Vanderleyden J., De Mot R., Lugtenberg B.J.J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* // MPMI. – 2002. – V. 15. – P. 1173–1180.

Haoliang L., Chongling Y., Jingchun L. Low-molecular-weight organic acids exuded by Mangrove (*Kandelia candel* (L.) Druce) roots and their effect on cadmium species change in the rhizosphere // Environmental and Experimental Botany. – 2007. – V.61. – P. 159–166.

Magdziak K., Kozlowska M., Kaczmareck Z., Mleczek M., Chadzinikolau T., Drzewiecka K., Golinski P. Influence of Ca/Mg ratio on phytoextraction properties of *Salix viminalis* II. Secretion of low molecular weight organic acids to the rhizosphere // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2011. – V. 74. – P. 33–40.

Rudrappa T., Czymmek K.J., Pare P.W., Bais H.P. Root-secreted malic aid recruits beneficial soil bacteria // Plant Physiology. – 2008. – V. 148. – P. 1547–1556.

Ryan P.R., Delhaize E., Randall P.J. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots // Planta. – 1995. – V. 196. –P. 103–110.

Tan S., Chunlag Y., Xinlan M., Shengyuan S., Waseem R., Qirong S., Yangchun Y. The effect of organic acids from tomato exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 // Applied Soil Ecology. – 2013. – V. 64. – P. 15–22.

INFLUENCE OF *FUSARIUM CULMORUM* AND *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ON THE COMPOSITION OF ORGANIC ACIDS IN ROOT EXUDATES OF BARLEY

A.I. Shaposhnikov[1], N.A. Vishnevskaya[1], V.Yu. Shakhnazarova[1,2], O.K. Strunnikova[1], A.A. Belimov[1]

[1]All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia, *ai-shaposhnikov@mail.ru*

[2]Saint-Petersburg State University, Department of Agrochemistry, Saint-Petersburg, Russia, *shahnazarova-v@mail.ru*

Abstract. The composition of organic acids in the root exudates of sterile barley plants and plants inoculated with *Fusarium culmorum* 30 and *Pseudomonas fluorescens* SPB2137 was studied. It is shown that the growth of the phytopathogenic fungi and the biocontrol rhizobacterial strain in the rhizosphere reduces the amount of organic acids in root exudates.

Keywords: *root exudates, organic acids, barley, fusariosis*