

ИНДУКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ *LACTUCA SATIVA L.* К ЗАСОЛЕНИЮ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГРИБНОГО ЭКЗОГЕННОГО ЭЛИСИТОРА

Е. А. КРЮКОВ, В. С. ЗАЯЦ, И. В. НАЛЕТОВ

ЗАО «Струнные технологии»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220089,
e-mail: v.zayats@unitsky.com, e.kryukov@unitsky.com, i.naletov@unitsky.com

(Поступила в редакцию 12.06.2023)

Солевой стресс является одним из самых разрушительных экологических стрессов, который вызывает ионную токсичность, осмотический стресс и окислительный стресс одновременно. Солеустойчивость, или адаптация к солевому стрессу, ассоциирована с целым рядом адаптивных механизмов, и большинство из них связано с ионным транспортом. Накопление K^+ и элиминация Na^+ являются основными ключевыми факторами, вовлечёнными в толерантность к солевому стрессу. Засоленность признана угрозой, поскольку она ухудшает сельскохозяйственную продуктивность почвы и приводит к снижению урожайности. Предполагается, что 20 % всех возделываемых земель и почти половина всех орошаемых земель подвержены солевому стрессу, что снижает производство ниже генетического потенциала. Солевой стресс влияет на модели роста и процессы развития растений. В статье предложено применение элиситоров на основе сапротрофного гриба *Ganoderma lucidum* для повышения адаптации растений к солевому стрессу. Индукция абиотического стресса производилась на модельной культуре салата латук (*Lactuca sativa L.*). Молодые растения салата-латука (*Lactuca sativa L.*), с уже сформированной розеткой, выращивались в условиях гидропоники на жидкой MS-среде с добавлением элиситора и соли NaCl в концентрации 90 ммоль/л. Элиситоры вносились в концентрации от 0,0005 мл/л до 0,05 мл/л. Экзогенный элиситор из гриба рейши (*Ganoderma lucidum*) был получен выщелачиванием из сухой массы гриба. В ходе вегетации салата латук проводились замеры скорости роста, высота и длина корней, по окончании эксперимента была определена сухая и сырая биомасса зелёной части растений.

Ключевые слова: элиситоры; органические удобрения; рост растений; рейши; *Lactuca sativa*.

Salt stress is one of the most devastating environmental stresses, causing ionic toxicity, osmotic stress and oxidative stress simultaneously. Salt tolerance or adaptation to salt stress is associated with a number of adaptive mechanisms, and most of them are related to ion transport. K^+ accumulation and Na^+ elimination are the main key factors involved in salt stress tolerance. Salinity is recognized as a threat because it impairs agricultural productivity of the soil and leads to lower yields. It is estimated that 20 % of all cultivated land and nearly half of all irrigated land is subject to salt stress, which reduces production below genetic potential. Salt stress affects growth patterns and plant development processes. This article proposes the use of elicitors based on the saprotrophic fungus *Ganoderma lucidum* to enhance plant adaptation to salt stress. Induction of abiotic stress was performed on a model crop of lettuce (*Lactuca sativa L.*). Young plants of lettuce (*Lactuca sativa L.*) with already formed rosette were grown under hydroponics conditions on liquid MS medium with the addition of elicitor and NaCl salt at a concentration of 90 mmol/l. Elicitors were added at concentrations ranging from 0.0005 ml/l to 0.05 ml/l. The exogenous elicitor from the reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) was obtained by leaching from the dry mass of the mushroom. During the growing season of lettuce, the growth rate, height and length of roots were measured; at the end of the experiment, the dry and wet biomass of the green part of the plants was determined.

Key words: elicitors; organic fertilizers; plant growth; reishi; *Lactuca sativa*.

Введение

На протяжении долгих лет, одной из важнейших проблем ведения растениеводства является засоленность почв, значительно снижающая рост и урожайность широкого ряда сельскохозяйственных культур. Различные виды абиотических стрессов, в особенности засоление, вызывают многочисленные негативные прямые и косвенные воздействия на растения тем или иным образом. Засоление характеризуется высокой концентрацией растворимых солей, которая может быть спровоцирована естественными причинами, например, при нерациональном орошении. В следствии чего, под воздействием капиллярного эффекта, происходит перемещение солей в верхние, корнеобитаемые слои почвы, где происходит их аккумуляция [1].

Повреждающий эффект засоления проявляется как в виде осмотических эффектов, так и токсическим действием отдельных ионов. Сильнее всего засоление подавляет рост клеток растяжением и в меньшей степени влияет на их деление. Избыточное засоление способствует накоплению промежуточных продуктов азотного обмена (аминов, диаминов, аммиака), которые оказывают сильное токсическое действие на растения. Засоление приводит к нарушению баланса при поглощении натрия, калия и магния [2]. Влияние избытка натрия объясняется его накоплением в листьях растения, что вызывает повреждения в тканях, прогрессирующие в некроз. В результате преждевременного отмирания снижается максимально возможная продуктивность листа в виде синтеза органических веществ в процессе фотосинтеза, что сказывается на урожайности сельскохозяйственной культуры. Чрезмерное поглощение Na^+ препятствует транспорту K^+ и Mg^{2+} в клетки. Недостаток K^+ характеризуется уменьшением количества хлорофилла, снижению эффективности работы фотосинтетического аппарата, что приводит к ограничению накопления биомассы [3]. При дефиците Mg^{2+} нарушается образование пластид, происходит

деградация хлоропластов и разрушение каротиноидов на молодых листьях, что ведет к развитию хлороза и некроза тканей [1].

Однако растения обладают рядом специальных клеточных механизмов, в основе действия которых лежит формирование системной устойчивости. Вещества биогенного и абиогенного происхождения, индуцирующие устойчивость, которые вызывают те самые множественные защитные реакции в ответ на действия паразита были названы элиситорами. Ноэлем Т. Кином в 1972 году. Элиситоры растений вносят весомый вклад в выживаемость и приспособляемость растений, помогая формированию химических и физических барьеров и механизмов. Согласно последним исследованиям к биогенным элиситорам относят белки [4], гликопротеины, олигосахариды [5] и липиды. Важным преимуществом применения элиситоров является возможность использования в органическом земледелии [6].

В отделе биотехнологий Unitsky String Technologies стояла цель получения и изучения элиситорного действия препарата на основе сапротрофного гриба *Ganoderma lucidum*. Мы предположили, что он может быть способен индуцировать устойчивость к засолению, в связи с чем была проведена оценка его элиситорной активности в отношении растений *Lactuca Sativa L.* при солевом стрессе.

К настоящему времени идентифицировано значительное количество веществ, которые относят к элиситорам. Для систематизации всей имеющейся информации их принято делить на биогенные и абиогенные, специфические и неспецифические, экзогенные и эндогенные.

Элиситорами являются вещества как биогенного, так и абиогенного происхождения. К биогенным элиситорам можно отнести продукты метаболизма и фрагменты клеточных стенок насекомых, патогенных и непатогенных микроорганизмов, растений. Абиогенные элиситоры включают в себя физические влияния (ультрафиолетовые лучи, магнитные поля, радиационное излучение и пр.), химические вещества (например, оксиды тяжёлых металлов).

Среди биогенных элиситоров выделяют консервативные молекулярные лиганды неспецифических элиситоров (MAMPs), характерные для патогенов, но отсутствующие в растительной клетке. Они распознаются ей как чужеродные и индуцируют запуск первичного иммунного ответа (PTI) не только у растений подверженных к данному патогену, но и у множества других видов. Трансмембранные паттерн-распознающие рецепторы (PRRs) обуславливают запуск неспецифических механизмов физиологического ответа [7]. Взаимодействие PRRs растений с грибным MAMPs (различные белки, ксиланаза, полимер N-ацетил-D-гликозамин и другие) ведет к активации первичного иммунного барьера PTI (рис. 1).

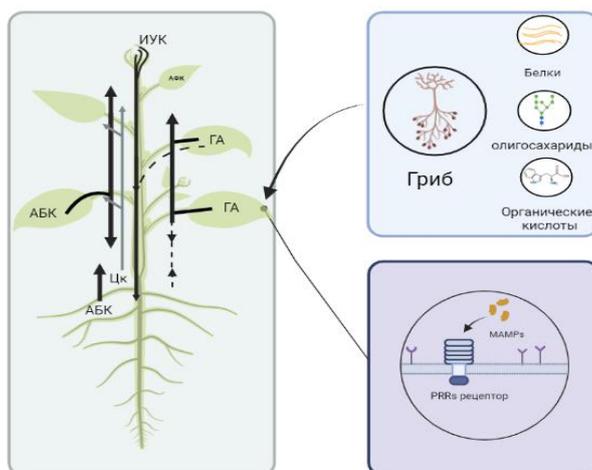


Рис. 1. Общая схема взаимодействия PRRs растений с MAMPs гриба. Активация PTI.

В ответ на контакт с MAMPs происходит повышение концентрации ионов Ca^{2+} , выделение активных форм кислорода (АФК), азота, продукция фитоалексинов, активация транскрипционных факторов, продукция хитиназы, гликоназы, этилена, жасмоновой и салициловой кислот, образование ауксиновых, цитокининовых и гиббереллиновых форм [8].

Эволюционное развитие патогенов позволило им сформировать тактики обхода защиты PTI. Это может достигаться или путем развития мутаций в генах, которые обеспечивают патогенам не распознаваемость PRRs, или ингибированием активности рецепторов. Второй блокадой защиты растений, развившейся в ходе коэволюции с патогенами, является специфический иммунитет (ETI), обусловленный взаимодействием R-генов (генов растения) с эффекторами Avr-генов (генов патогена). Результатом R/Avr-взаимодействия является реакция сверхчувствительности, которая в большинстве случаев приводит к продуцированию клетками фитоалексинов, что влечёт к смерти зараженные клетки (рис. 2).

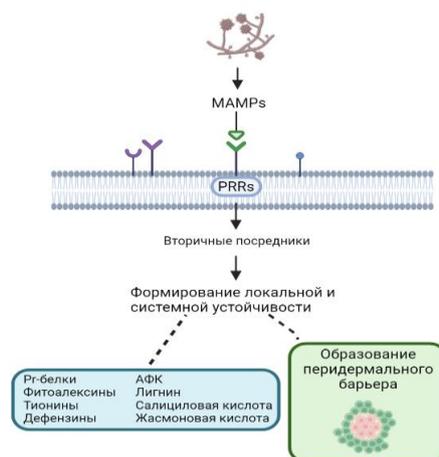


Рис. 2. Упрощённая схема протекания реакции сверхчувствительности

Гибель клеток сопровождается быстрым образованием барьера из перидермы, что подавляет паразита и останавливает его распространение. Процессы, индуцируемые РТ1 и ЕТ1, отличаются разностью концентраций синтезируемых гормонов, скорости иммунного ответа, различия в сигнальных путях. Конечным результатом ЕТ1 является отбор высокоспецифичных R-белков, быстро подавляющих развитие болезни.

Основная часть

В качестве объекта исследования были использованы корни и листья 7-дневных растений салата – латука (*Lactuca sativa* L.). Данный тест-объект был задействован исходя из его хозяйственной ценности, короткого жизненного цикла и отзывчивости на засоление субстрата.

В качестве действующего вещества был получен экзогенный элиситор из гриба *Ganoderma lucidum*. Семена проращивались отдельно до формирования трёх настоящих листочков. После проросшие растения отбирались и переносились в конические колбы со средой по Мурасиге-Скугу + элиситор. В качестве контроля выступала чистая MS-среда. Макро- и микроминеральный состав соответствуют составу стандартной питательной среды (MS) с исключением гормонов и витаминов.

Молодые растения салата-латука (*Lactuca sativa* L.), с уже сформированной розеткой, выращивались в условиях гидропоники на жидкой MS-среде с добавлением элиситора и соли NaCl в концентрации 90 ммоль/л (рис. 3).

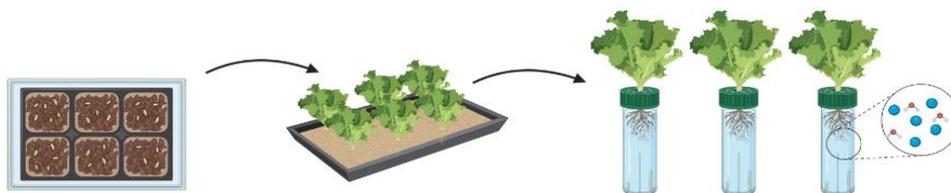


Рис. 3. Схема постановки эксперимента по воздействию элиситора различной концентрации на ростовые и физиологические показатели растений (*Lactuca sativa* L) на жидком субстрате под влиянием 90 ммоль/л NaCl

Для определения влияния элиситора были выбраны следующие концентрации: $5 \cdot 10^{-2}$ мл/л; $2 \cdot 10^{-2}$ мл/л; $1 \cdot 10^{-2}$ мл/л и $5 \cdot 10^{-4}$ мл/л. Каждый эксперимент с концентрацией воспроизводили в трёхкратной повторности. Впоследствии конические колбы с растениями переносили в камеру роста с температурой 25 °С, интенсивностью освещения 6000 люкс и 14-часовым фотопериодом. Питательная среда добавлялась по мере необходимости. В таких условиях колбы выдерживали на протяжении всего времени эксперимента. Корни салата-латука не были ничем прикрыты, и, таким образом, были подвержены световому воздействию. Спустя 3 суток регистрировали первые изменения. Измерения роста листьев и корней проводились каждые 3–4 суток.

Биогенный элиситор оказал положительное влияние на развитие вегетативной и корневой массы растений начиная с концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ мл/л по отношению к контролю (табл. 1). Вариативность полученных данных визуализирована на диаграмме (рис. 4).

Таблица 1. Результаты роста и развития растений на жидком субстрате под влиянием грибного элиситора.

Варианты, мл/л	Высота растений, см	Длина корней, см	Скорость прироста растений, см/сутки	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г
Контроль	5,26	5,49	0,66	2,00	0,16
$5 \cdot 10^{-2}$ мл/л	4,08	3,00	0,51	1,18	0,08
$2 \cdot 10^{-2}$ мл/л	8,70	5,38	1,09	10,33	0,70
$1 \cdot 10^{-2}$ мл/л	9,26	9,33	1,16	21,30	1,15
$5 \cdot 10^{-4}$ мл/л	9,96	8,29	1,24	19,70	1,06

Гистологические показатели тканей были в норме, ксилема и флоэма без бактериальной (патогенной) нагрузки, рост апикальных меристем без патологий.

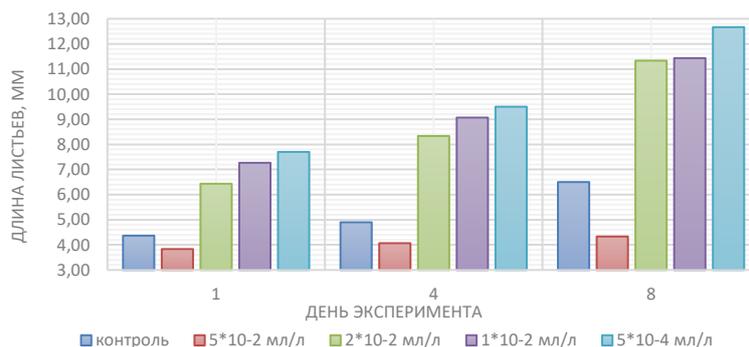


Рис. 4. Влияние грибного элиситора на рост листьев на протяжении 8 экспериментальных дней в сравнении с контролем

При оценке накопления биомассы опыт с $1 \cdot 10^{-2}$ мл/л позволил получить 21,30 г сырого вещества. Относительно похожий результат наблюдался при концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ мл/л. Скорость прироста у всех вариантов наблюдалась разная: от 0,51 до 1,24 см/сут. Именно под действием концентраций $1 \cdot 10^{-2}$ мл/л и $5 \cdot 10^{-4}$ мл/л была получена наибольшая вегетативная масса, что является предпосылкой большей устойчивости к абиотическим факторам окружающей среды. Физиологические показания при концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ мл/л были выше контрольных на 8 сутки, но розетка листьев была более кустистой при концентрациях $1 \cdot 10^{-2}$ мл/л и $5 \cdot 10^{-4}$ мл/л. Элиситор в концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ мл/л проявлял ингибирующее действие и стимулировал рост патогенности, что отмечалось в торможении роста растения и развитии корневой плесени. Ростовые показатели меньше по сравнению с контролем в 1,69 раза, о чем свидетельствуют показания сырой биомассы: 2 г в контроле и 1,18 г при концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ мл/л.

Заключение

Разработанная нами методика позволила получить элиситор из гриба *Ganoderma lucidum*, оказывающий стимулирующее влияние на рост и развитие вегетативной массы растения (*Lactuca Sativa* L.) при влиянии лимитирующего фактора в виде засоления 90 ммоль/л NaCl при действующих концентрациях равным $1 \cdot 10^{-2}$ мл/л, $5 \cdot 10^{-4}$ мл/л и $2 \cdot 10^{-2}$ мл/л. Наилучшие показатели по отношению к контролю были зафиксированы для концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ мл/л, конечная биомасса для которого составила 19,7 г к контрольным 2 г. В концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ мл/л было зарегистрировано ингибирующее действие, также вызывающее рост патогенной нагрузки на растение.

Полученные данные объясняются тем, что неспецифические элиситоры могут играть ведущую роль в индукции иммунного потенциала у разных видов растений. Эти вещества функционально необходимы грибу (глюканы, хитин грибов, липиды, аминокислота, белки), а результатом взаимодействия их с PRRs-рецепторами является запуск каскада защитных реакций, обусловленных развившимся в ходе коэволюции узнаванием их определёнными рецепторами растений. В результате возможной продукции этилена, жасмоновой и салициловой кислот, образования ауксиновых, цитокининовых и гиббереллиновых форм в ответ на взаимодействие с элиситором, растение получает стимул для сопротивления неблагоприятным факторам за счёт своего природного генного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранова, Е. Н. Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода в решении вопросов устойчивости растений к засолению (обзор) / Е. Н. Баранова // Сельскохозяйственная биология. – 2006. – Т. 41. – №. 1. – С. 39–56.
2. Белова, Т. А. Физиологические основы адаптации растений к воздействию солевого стресса / Т.А. Белова // Auditorium. – 2018. – №. 1 (17). – С. 6.
3. Taiz, L. Plant physiology and development / L. Taiz [et al.] // Sinauer Associates Incorporated, 2015. – №. Ed. 6. – 761 p.
4. Zhao, J. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture / J. Zhao [et al.] // Enzyme and Microbial Technology. – 2001. – Vol. 28. – №. 7–8. – P. 666–672.
5. Бекмаханова, Н. Е. Элиситоры как индукторы устойчивости растений к болезням / Н. Е. Бекмаханова, О. Н Шемшур // КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ. – 2014. – Т. 2224. – С. 70.
6. Колмыков А. В., Авдеев А. Н. Современные аспекты ведения органического сельского хозяйства // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – №. 2. – С. 182–187.
7. Дьяков Ю. Т. Грибные элиситоры // Материалы VII всероссийской микологической школы-конференции с международным участием «Биотические связи грибов: мосты между царствами». Сб. докладов и тезисов, 2015. 232 с. – 2015. – С. 18.
8. Gómez-Gómez L., Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis* // Molecular cell. – 2000. – Т. 5. – №. 6. – С. 1003–1011.