

ФТАЛАТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ УЧАСТИЕ В ЗАЩИТНОМ ОТВЕТЕ ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕНОВ

Д.Э. Гвильдис, Ю.В. Омеличкина, С.В. Бояркина, Л.А. Максимова, А.А. Семёнов, А.Г. Еникеев, Т.Н. Шафикова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *t-shafikova@yandex.ru*

Аннотация. Обнаружены эндогенные фталаты у растений *in situ* и *in vitro*. В модельных экспериментах выявлено подавление фталатами формирования биопленок бактериального фитопатогена *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* и *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* на фоне стимуляции роста патогенов при концентрации дибутилфталата в среде в диапазоне 10-30 мкг/л. Предполагается, что фталаты имеют функциональное значение и прежде всего участвуют в защитных реакциях растений на воздействие фитопатогенов.

Ключевые слова: эндогенные фталаты; растения; фитопатогены; защитные реакции, биопленки

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-216-220

Фталаты (сложные эфиры *o*-фталевой кислоты) наиболее известны как продукты химической промышленности, и долгое время считались исключительно ксенобиотиками и поллютантами. Однако к настоящему моменту появилось немало сведений о присутствии биогенных фталатов в организмах различных таксономических групп. Эти соединения обнаружены в красных [Chih, 2004] и пресноводных водорослях, цианобактериях [Babu, 2010], в грибах [Lotfy, 2011], а также в растениях различных семейств. Примечательно, что в растениях содержание фталатов имеет качественные и количественные различия, в зависимости от их локализации в различных органах растения [Shafaghat, 2012]. К настоящему времени получены прямые доказательства биосинтеза фталатов из меченых предшественников [Babu, 2010]. В проведенных нами исследованиях, фталаты были обнаружены в растениях, взятых из естественной среды обитания, а также в закрытых экспериментальных системах с контролируемыми условиями роста - в растениях и культурах клеток, выращиваемых *in vitro* (Табл. 1) [Семенов, 2016]. Следует отметить, что растения *in situ* были разных таксономических групп, разных экологических специализаций и произрастали в разных регионах России. Анализ образцов на содержание дибутилфталата (ДФБ) и ди-2-этилгексилфталата (ДЭГФ) проводили методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором с использованием хромато-масс-спектрометра 7000QQQ/7890A Agilent Technologies, (USA).

Таблица 1.

Количественное содержание ортофталатов в культивируемых клетках *A. baicalense*, мг/г сухого вещества. $M \pm m$, $n = 3$.

Сроки сбора биомассы	<i>бис</i> -2R(-)этилгексилфталат	Дибутилфталат
Апрель	0,17± 0,01	0,18± 0,01
Июнь	1,39± 0,08	0,03± 0,00
Сентябрь	1,44± 0,05	0,01± 0,00
Ноябрь	0,21± 0,01	0,02± 0,00

В ряде работ выявлена антимикробная активность фталатов на грамположительные и грамотрицательные патогены человека [Philip, 2011], обнаружены их цитотоксические свойства [Rajamanikyam, 2017]. Кроме того, была

установлена способность клеток в условиях стресса экскретировать фталаты во внеклеточную среду, что также может иметь биологическое значение при взаимодействии различных организмов [Babu, 2010]. Совсем недавно у бактерии *Streptomyces* штамма КХ852460 был выделен и идентифицирован эндогенный ДБФ, обладающий фунгицидной активностью в отношении возбудителя пятнистости листьев табака *Rhizoctonia solani* [Ahsan, 2017]. Вместе с тем, появились экспериментальные данные об участии фталатов в подавлении роста симбионтов растений *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* [Макарова, 2012]. Эти факты дают основание предполагать использование растениями этих веществ в качестве защитных соединений.

Одной из стратегий преодоления механизмов защиты растения и начальным этапом его колонизации бактериями является образование биопленок – сложных структурированных сообществ микроорганизмов, погруженных в полисахаридный матрикс. Известно, что образование биопленок определяет проявление вирулентности фитопатогенов, повышая их устойчивость к факторам резистентности растений, а также блокируя ксилемный ток [Koczan, 2011]. Надо отметить, что ранее влияние фталатов на фитопатогенные бактерии практически не изучалось.

Для определения действия фталатов на рост бактериальных культур и способность к биопленкообразованию в 50 мл бактериальной суспензии (*Cms* – титр $0,5 \times 10^7$ КОЕ, *Pcc* – титр 1×10^8 КОЕ) вносили предварительно растворенные в этаноле ДБФ (Реахим, Россия) и ди-(2-этилгексил)-*o*-фталат (ДЭГФ) (Sigma-Aldrich, США) в

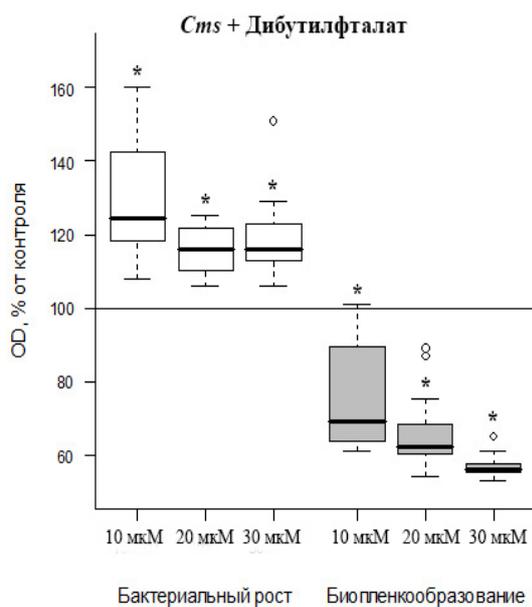


Рис. 1. Действие различных концентраций ДБФ на бактериальный рост и биопленкообразование *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, процент от контроля;
* – достоверное отличие от контроля.

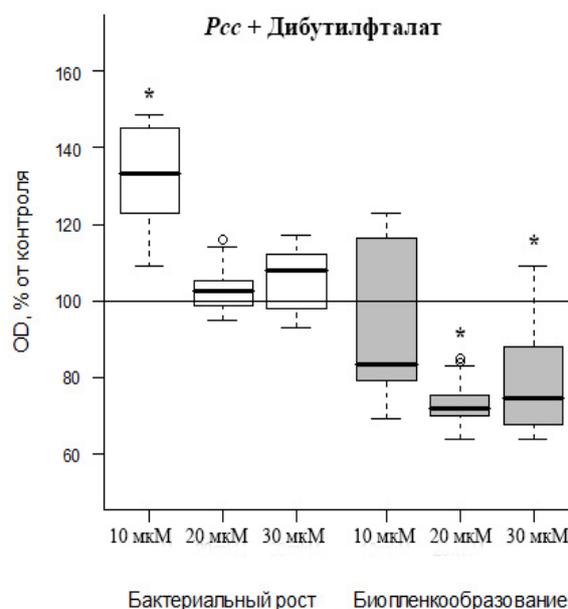


Рис. 2. Действие различных концентраций ДБФ на бактериальный рост и биопленкообразование *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, процент от – контроля ; *–достоверное отличие от контроля.

концентрациях 10 мкМ, 20 мкМ и 30 мкМ. После 48 часов культивирования бактериальную суспензию переносили в 96-луночные планшеты для статического культивирования и определения биопленкообразования с помощью красителя Генциан Виолет по методу, описанному Merritt J.H. с соавт. [Merritt, 2005]. Для изучения действия фталатов на рост бактериальной культуры через каждые 24 часа в течение 3х

суток определяли оптическую плотность среды при 655 nm на планшетном спектрофотометре iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, США). Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Проверку достоверности отличий осуществляли с помощью теста HSD Тьюки в среде R.

Согласно полученным данным, добавление ДБФ в среду культивирования бактерий снижало интенсивность биопленкообразования как у биотрофа *Cms* (рис. 1), так и у некротрофа *Pcc* (рис. 2). Важно отметить тот факт, что при этом наблюдалось усиление роста бактериальных культур. Аналогичным был эффект при использовании ДЭГФ. Его действие также приводило к снижению интенсивности биопленкообразования и также стимулировало рост культур изучаемых фитопатогенов, хотя и в различной степени. На основании полученных данных можно полагать, что фталаты принимают участие в защите растений от инфекций, подавляя процесс биопленкообразования бактериальных фитопатогенов – начальный этап колонизации растений.

Между тем, фталаты были обнаружены в клетках фитопатогенных бактерий (табл. 2).

Таблица 2.

Содержание сложных эфиров орто-фталевой кислоты в бактериях, мкг/г сухого веса

Фталаты	Бактерии			
	<i>Cms</i>	<i>Pcc</i>	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
ДЭГФ	70-121	80-121	60-90	50-80
ДБФ	7-9	35-45	11-20	8-13

При выращивании *Cms* в чашках Петри на минимальной среде с градиентом ДБФ 0-60 мкг/л наблюдался рост бактерий в направлении увеличения концентрации ДБФ (рис. 3-4), что свидетельствует о наличии физиологической реакции бактерий на присутствие фталатов.



Рис. 3. Рост *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* на минимальной среде без ДБФ.

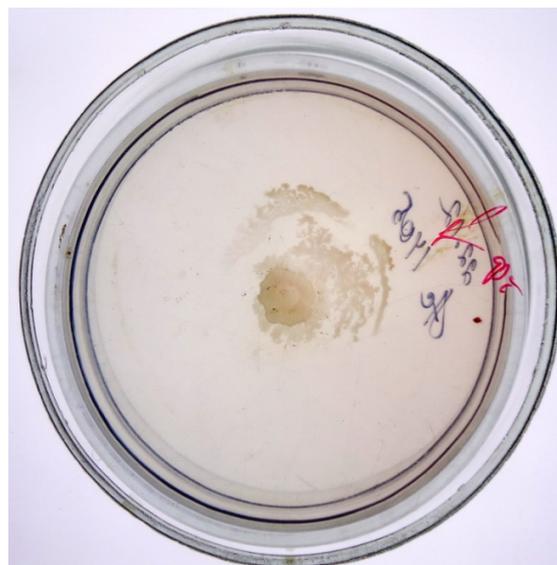


Рис. 4. Рост *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* на минимальной среде с градиентом ДБФ 0-60 мкг/л.

Стимулирование пролиферации в клетках печени крыс [Buckner, 2018] экзогенным ди-*N*-октилфталатом и активация роста *Cms* и *Pss* на среде с ДБФ, возможно, имеют аналогичный механизм возникновения. Весьма неоднозначные результаты говорят о том, что физиолого-биохимическая роль фталатов может оказаться гораздо более сложной, и не ограничиваться только участием в защитном ответе растительных организмов.

Литература

Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. Роль аллелопатических соединений в регуляции и формировании бобоворизобияльного симбиоза // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 394–402.

Семенов А.А., Еникеев А.Г., Снеткова Л.В., Пермяков А.В., Соколова Н.А., Дударева Л.В. Сложные эфиры ортофталевой кислоты из культуры *Aconitum baicalense* Turcz ex Rapaics 1907 // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 471, № 3. – С. 366–367.

Ahsan T., Chen J., Zhao X., Irfan M., Wu Y. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf // AMB Expr. – 2017. – V. 7, № 54. – P. 17–64.

Babu B., Wu J.-T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria // Science of The Total Environment. – 2010. – V. 408, № 21. – P. 4969–4975.

Buckner S.L., Pruitt A.N., Thomas C.N., Amin M.Y., Miller L.L., Wiley F.E., Sabbatini M.E. Di-*N*-octylphthalate acts as a proliferative agent in murine cell hepatocytes by regulating the levels of TGF- β and pro-apoptotic proteins // Food and Chemical Toxicology. – 2018. – V. 111. – P. 166–175.

Chih Yu Chen. Biosynthesis DEHP и DBP from red alga // Water Res. – 2004. – V. 38, № 4. – P. 1014–1018.

Koczan J.M., Lenneman B.R., McGrath M.J., Sundin G.W. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora* // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77, № 19. – P. 7031–7039.

Lotfy M.M., Hassan H.M., Hetta M.H., El-Gendy A.O., Mohammed R. Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori* // Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. – 2018. – in press.

Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and Analyzing Static Biofilms. // Curr. Protoc. Microbiol. – 2005. – Chapter 1: Unit 1B.1.

Philip D., Kaleena P.K., Valivittan K. GC-MS analysis and antibacterial activity of chromatographically separated pure fractions of leaves of *Sansevieria roxburghiana* // Asian J. Pharm. Clin. Res. – 2011. – V. 4, № 4. – P. 130–133.

Rajamanikyam M., Vadlapudi V., Parvathaneni S.P. et al. Isolation and characterization of phthalates from *Brevibacterium mcbrellneri* that cause cytotoxicity and cell cycle arrest.// EXCLI J. – 2017. – V. 16. – P. 375–387.

Shafaghat A., Salimi F., Amani-Hooshyar V. Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms // Journal of Medicinal Plants Research. – 2012. – V 6, № 3. – P. 455–460.

PHTHALATES OF PLANT AND ITS INVOLVMENT IN DEFENCE RESPONSE AGAINST PHYTOPATHOGENS

D.E. Gvildis, Y.V. Omelichkina, S.V. Boyarkina, L.A. Maksimova, A.A. Semenov,
A.G. Enikeev, T.N. Shafikova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry the Siberian Branch of the
Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia, *t-shafikova@yandex.ru*

Abstract. Endogenic phthalates are widely spread among plants *in situ* and *in vitro*. Phthalates are supposed to have complex physiological functions and also take part in plant defence response. It was revealed that phthalates suppress the biofilm formation of phytopathogene *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* and *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* at 10-30 mkg/L in medium but stimulate the growth of ones in the same conditions.

Key words: *endogenic phthalates, phytopathogens, plant defence reactions, biofilms*