ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2020, том 67, № 3, с. 329–336

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1:632.937

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus* НА АКТИВНОСТЬ ПАТОГЕНИНДУЦИРУЕМЫХ БЕЛКОВ И УСТОЙЧИВОСТЬ ПШЕНИЦЫ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ТВЕРДОЙ ГОЛОВНИ *Tilletia caries* (DC.) TULL

© 2020 г. Л. Г. Яруллина[a, b, *], Г. Ф. Бурханова[a], В. О. Цветков[b]

[a] *Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия*

[b] *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный университет, Уфа, Россия*

**e-mail: yarullina@bk.ru*

Поступила в редакцию 19.07.2019 г.
После доработки 07.10.2019 г.
Принята к публикации 09.10.2019 г.

Изучено влияние предпосевной обработки семян бактериями *Bacillus subtilis* Cohn и *B. thuringiensis* Berliner на рост проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. и *Tr. timopheevii* Zhuk., генерацию в них пероксида водорода (H_2O_2) и активность патогениндуцируемых белков (PR-белков) (оксалатоксидазы (ОхО), пероксидазы (ПО), ингибитора протеиназы (ИП), хитиназы) при инфицировании возбудителем твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tull. Выявлено снижение негативного влияния *Til. caries* на рост проростков и степень их пораженности патогеном под влиянием бактерий *Bacillus* spp. Повышение устойчивости растений к *Til. caries* было опосредовано их стимулирующим действием на концентрацию H_2O_2 и активность ОхО и ПО, усилением транскрипционной активности гена хитиназы *TaChiI*. Выявлены различия в активации транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы *TaPI* в проростках мягкой пшеницы под воздействием штаммов *B. subtilis, B. thuringiensis* и их смеси, что свидетельствует о различных путях формирования устойчивости пшеницы к *Til. caries*, которые могут быть связаны с природой организма-продуцента.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Triticum timopheevii*, *Tilletia caries*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, патогениндуцируемые белки, транскрипционная активность генов, системно индуцированная устойчивость

DOI: 10.31857/S0015330320030215

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные болезни растений ежегодно наносят значительный ущерб продуктивности сельскохозяйственных культур. Особенно велики потери урожая от грибных болезней. Среди головневых грибов мягкую пшеницу поражает в основном *Tilletia caries* (DC.) Tul. *Til. caries* проникает в растение главным образом через колеоптиль в течение нескольких суток после прорастания инфицированной зерновки. До начала налива зерна болезнь развивается бессимптомно, а гифы патогена в тканях растения-хозяина встречаются крайне редко, что весьма затрудняет исследование защитных механизмов к патогену и поиск индукторов устойчивости [1]. Известно, что в тканях устойчивых растений в ранние сроки онтогенеза мицелия головневых грибов наблюдается недоразвитость мицелия, вакуолизация, нарушение строения клеточной стенки и лизис [2].

Основным требованием современного растениеводства является использование для защиты растений от болезней и вредителей экологически безопасных препаратов, основу которых составляют стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) (или PGPB от Plant Growth Promoting Bacteria). Особо привлекательными в связи с этим являются высокоэффективные, нетребовательные к средам культивирования и сохраняющие в течение длительного срока свою жизнеспособность бактерии-эндофиты из рода *Bacillus*. При этом бактерии рода *Bacillus*, на основе которых разработаны препараты Фитоспорин и Битоксибациллин (БТБ), рассматриваются как перспективные агенты биологического контроля болезней и вредителей растений в силу их широко распро-

Сокращения: PR-белки – патогениндуцируемые белки; ИП – ингибиторы протеиназ; ПО – пероксидаза; ОО – оксалатоксидаза; СИУ – системная индуцированная устойчивость; СРРБ – стимулирующие рост растений бактерии.

страненного природного антагонизма ко многим фитопатогенным грибам [3]. Действующей основой БТБ является комплекс, состоящий из спор, белковых кристаллов дельта-эндотоксина и термостабильного экзотоксина микробной культуры *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Основа Фитоспорина – клетки и споры *B. subtilis*, штамм 26Д. Особенностью биопрепаратов на основе живых микроорганизмов является неспецифическая активация защитных механизмов растений [4]. Системная индуцированная устойчивость (СИУ), вызываемая СРРБ, эффективна против грибов, оомицетов, бактерий, вирусов и насекомых-вредителей [5]. Защитное действие препаратов на основе *B. thuringiensis* определяется наличием инсектицидных белков – δ-эндотоксинов (Cry и Cyt) [6]. Показана способность некоторых штаммов этого вида бактерий эндофитно развиваться в тканях растений [7] и подавлять рост и развитие возбудителей болезней посредством лизиса грибного мицелия [8].

Несмотря на наличие большого количества данных о подавлении развития патогенов бактериями рода *Bacillus*, механизмы развития защитного ответа в растительных тканях под их воздействием остаются до конца не выясненными. Высказывается предположение, что некоторые штаммы *Bacillus* влияют на развитие головневых, в том числе на *Til. caries* [9].

Цель данной работы – изучение влияния бактерий рода *Bacillus* на рост растений пшеницы различной устойчивости, на генерацию в них H_2O_2 и на изменение активности патогениндуцируемых белков при инфицировании возбудителем твердой головни, эндофитным биотрофным грибом *Tilletia caries*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе были использованы растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Салават Юлаев (Башкирский государственный аграрный университет) и вид *Triticum timopheevii* Zhuk. к-58666 (коллекция ВИР РАН), иммунный к твердой головне (для сравнительной оценки). Семена перед посадкой обрабатывали полусухим способом из расчета 20 мкл суспензии клеток на 1 г семян с конечным титром 10^8 кл./мл штаммов *B. thuringiensis* B-60606 и B-5689, полученных из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), и штамма *B. subtilis* 26Д из коммерческого биопрепарата Фитоспорин-М (“Башинком”, Россия), а также их смеси в соотношении 2 : 1 : 1 (*B. subtilis* 26Д : *B. thuringiensis* B-60606 : *B. thuringiensis* B-5689). Часть наклюнувшихся семян через 24 ч опудривали сухими спорами *Til. caries* из расчета 1 г спор на 100 семян. Инфекционный материал был получен из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. Семена после заражения и посева в вазоны с вермикулитом выдерживали 72 ч во влажной камере при температуре 10–12°C. Через 7 суток после инокуляции оценивали степень пораженности проростков и ростовые показатели. Для окраски грибов по Граму использовали краситель генциановый фиолетовый, приготовленный с применением анилина. Контролем служили незараженные и зараженные *Til. caries* растения *Tr. aestivum*.

Определение содержания H_2O_2. 7-дневные проростки гомогенизировали в 0.025 М фосфатном буфере, pH 6.2, в соотношении 1 : 3, центрифугировали 20 мин при 10000 *g* на центрифуге (“Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для определения содержания H_2O_2. Содержание H_2O_2 оценивали при 560 нм с использованием ксиленолового оранжевого. Реагент содержал 0.074% соли Мора в 5.81% серной кислоты и 0.009% ксиленолового оранжевого в 1.82% сорбита (в соотношении 1 : 100). Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на спектрофотометре Biospek-Mini (“Shimadzu”, Япония).

Определение активности оксалатоксидазы (ОхО). Цитоплазматическую фракцию фермента выделяли с использованием 0.05 М сукцинатного буфера, pH 3.8 (СБ). Для этого проростки гомогенизировали в СБ, при соотношении массы навески листьев к объему СБ (1 : 3). Экстракт центрифугировали 20 мин при 12000 *g* (“Eppendorf”, Германия). Реакционная смесь для определения активности ОхО содержала 100 мкл СБ, 0.0025 М щавелевую кислоту (“АО Реахим”, Россия), 50 мкл ферментной вытяжки и коммерческой пероксидазы хрена (“Диаэм”, Россия) в концентрации 15 ед./мл и 0.08% хромогенный субстрат *o*-фенилендиамин (ОФД) (“АО Реахим”, Россия).

Определение активности пероксидазы (ПО). Для выделения цитоплазматической фракции ПО отрезки листьев гомогенизировали в 0.01 М Na-фосфатном буфере, pH 6.2, отношение массы навески листьев к объему фосфатного буфера 1 : 3. Экстракт центрифугировали 25 мин при 12000 *g* (“Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для анализа активности ПО. Активность ПО и ОхО определяли микрометодом по окислению субстрата ОФД при 490 нм на приборе для иммуноферментного анализа Benchmark Microplate Reader (“Bio-Rad”, США).

Оценка транскрипционной активности генов патогениндуцируемых белков. РНК из растений выделяли с помощью тризола (“Molecular Research Center, Inc.”, США). Для получения кДНК на основе мРНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика. Полимеразную цеп-

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для оценки транскрипционной активности PR-белков

Белок/Ген	Номер из GenBank	Нуклеотидная последовательность
PR-3 (хитиназа)/*TaChiI*	AB029935.1	F 5'-cga-tgc-cga-aga-tgt-cac-aa-3' R 5'-ccc-ggg-tat-ggt-gtc-atc-ac-3'
PR-6 (ингибитор протеиназы)/*TaPI*	EU293132.1	F 5'-ggg-ccc-tgc-aag-aag-tac-tg-3' R 5'-aca-cgc-ata-ggc-acg-atg-ac-3'
β-Тубулин/ген домашнего хозяйства	DQ 435668.1	F 5'-cac-aca-gca-gat-gtg-gga-ct-3' R 5'-gtg-gag-ttg-cca-atg-aag-at-3'

ную реакцию (ОТ-ПЦР) проводили в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-"Терцик" ("ДНК-Технология", Россия). После амплификации фрагменты ДНК фракционировали методом электрофореза в 1–2% агарозном геле или 7% ПААГ в электрофоретической камере S2 ("Хеликон", Россия). В качестве положительного контроля использовали ПЦР гена, кодирующего конститутивно экспрессирующийся тубулин (табл. 1). С помощью программы "Primer Select" (https://www.dnastar.com/) были подобраны высокоспецифичные праймеры к генам хитиназы *TaChiI* (PR-3) и ингибитора протеиназ *TaPI* (PR-6), фланкирующие фрагменты ДНК размером 121, 106 п.н., соответственно. Экспериментальным путем были подобраны условия проведения ПЦР. Компьютерный анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene ("DNASTAR, Inc.", США).

Статистическая обработка данных. Эксперименты включали не менее трех биологических повторностей при анализе биохимических показателей и не менее 15 повторностей при анализе транскрипционной активности. На диаграммах показаны выборочные средние и их доверительные интервалы. Для оценки достоверности различий выборочных средних проводили дисперсионный анализ и последующий многоранговый тест Дункана в программе Statistica 13 (уровень надежности 95%). Достоверно различающиеся значения обозначены на диаграммах разными буквами (a–g).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние бактерий Bacillus ssp. на ростовые параметры проростков пшеницы и устойчивость их к Tilletia caries

Инфицирование *Til. caries* подавляло рост надземной части проростков мягкой пшеницы *Tr. aestivum* (на 15–20%), но практически не оказывало существенного влияния на рост проростков *Tr. timopheevii* (рис. 1, 2). Показано, что заражение восприимчивой пшеницы твердой головней вызывает существенное повышение уровня АБК [10]. Высокий уровень АБК в растениях, с одной стороны, является реакцией на стресс, с другой – приводит к торможению ростовых процессов.

В вариантах опыта с предобработкой растений *Tr. aestivum* бактериями *B. subtilis* 26Д с последующим их инфицированием рост побега замедлялся примерно на 15% в сравнении с вариантом с предобработкой, но без инфицирования. Вместе с тем, предобработанные *B. thuringiensis* B-5689 инфицированные побеги росли быстрее, чем необработанные и зараженные. Таким образом, предпосевная обработка семян пшеницы бактериями *B. thuringiensis* B-5689 снижала негативное воздействие инфицирования головней на рост надземной части проростков, однако в смеси 3 штаммов это свойство бактерий *B. thuringiensis* не проявлялось (рис. 1). Достоверного положительного влияния бактерий на рост корней в условиях заражения выявлено не было.

Вероятно, это происходит как за счет значительных изменений содержания фитогормонов [11], так

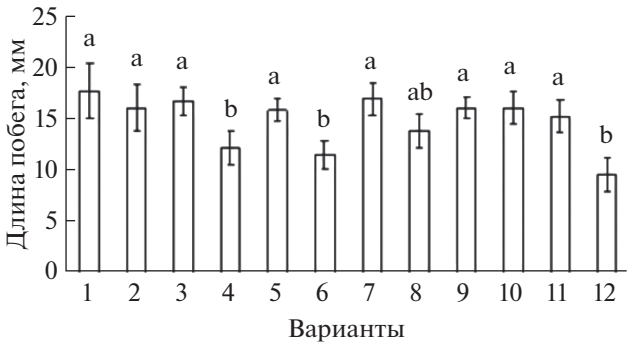

Рис. 1. Влияние бактерий *Bacillus* ssp. на рост надземной части проростков пшеницы различной устойчивости при инфицировании *Til. caries*. 1 – *Tr. timopheevii*, 2 – *T. timopheevii* + *Til. caries*, 3 – *Tr. aestivum*, 4 – *Tr. aestivum* + *Til. caries*, 5 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д, 6 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *Til. caries*, 7 – *Tr. aestivum* + + *B. thuringiensis* B-6066, 8 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-6066 + *Til. caries*, 9 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689, 10 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689 + + *Til. caries*, 11 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* B-6066 + *B. thuringiensis* B-5689, 12 – *Tr. aestivum* + + *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* B-6066 + *B. thuringiensis* B-5689 + *Til. caries*. Достоверно различающиеся значения подписаны разными буквами.

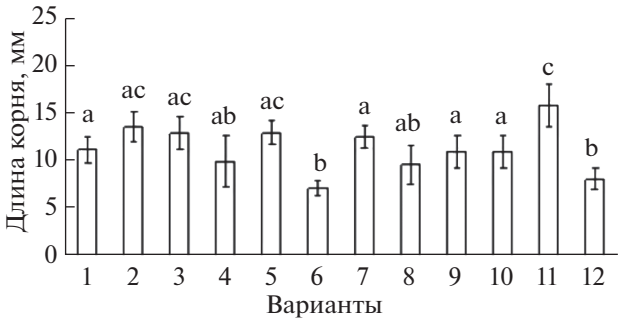

Рис. 2. Влияние бактерий *Bacillus* ssp. на длину корней проростков пшеницы различной устойчивости при инфицировании *Til. caries*. 1 – *Tr. timopheevii*, 2 – *T. timopheevii* + *Til. caries*, 3 – *Tr. aestivum*, 4 – *Tr. aestivum* + *Til. caries*, 5 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д, 6 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *Til. caries*, 7 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-6066, 8 – *Tr. aestivum* + + *B. thuringiensis* B-6066 + *Til. caries*, 9 – *Tr. aestivum* + + *B. thuringiensis* B-5689, 10 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689 + *Til. caries*, 11 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* B-6066 + *B. thuringiensis* B-5689, 12 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* B-6066 + *B. thuringiensis* B-5689 + *Til. caries*. Достоверно различающиеся значения подписаны разными буквами.

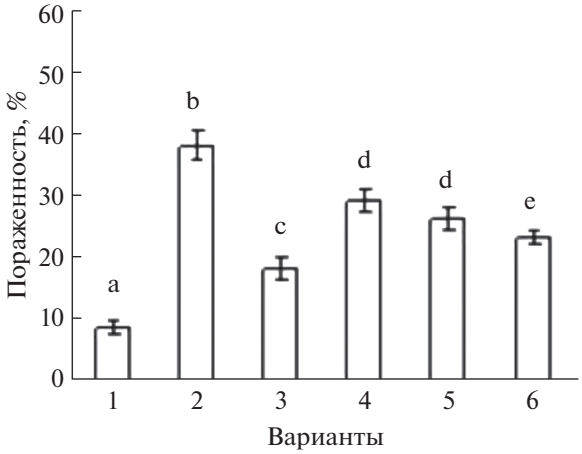

Рис. 3. Влияние бактерий *Bacillus* ssp. на устойчивость пшеницы к возбудителю твердой головни *Til. caries*. 1 – *Tr. timopheevii* + *Til. caries*, 2 – *Tr. aestivum* + + *Til. caries*, 3 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *Til. caries*, 4 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-6066 + *Til. caries*, 5 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689 + *Til. caries*, 6 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* B-6066 + + *B. thuringiensis* B-5689 + *Til. caries*. Достоверно различающиеся значения подписаны разными буквами.

и за счет уменьшения количества заболевших растений *Tr. aestivum* (рис. 3).

Особенностью эндофитных бактерий является их способность воздействовать на рост растений непосредственно за счет синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы, таких как ауксины, цитокинины [12, 13], гиббереллины, абсцизовая, салициловая и жасмоновая кислоты [14].

Влияние бактерий Bacillus ssp. на содержание H_2O_2 в проростках пшеницы при инфицировании Tilletia caries

Некоторые механизмы повышения устойчивости *Tr. aestivum* к *Til. caries* под влиянием бактерий *Bacillus spp.* могли быть связаны с изменением концентрации H_2O_2 в растительных тканях. Так, в инфицированных проростках устойчивого вида пшеницы *Tr. timopheevii* отмечено повышение уровня H_2O_2 (рис. 4а). Усиление продукции АФК в условиях инфицирования культивируемых клеток растений наблюдали и другие исследователи [15] растений пшеницы, инфицированных возбудителем мучнистой росы, и большого числа растений при поражении возбудителем серой гнили [16].

Предобработка бактериями *Bacillus* spp. стимулирует повышение концентрации пероксида водорода в здоровых растениях, но особенно при инфицировании (рис. 4а). По типу ответа на заражение *Til. caries* восприимчивые обработанные растения мягкой пшеницы *Tr. aestivum* становятся похожими на растения устойчивого вида *Tr. timopheevi*. (рис. 4а).

H_2O_2 можно рассматривать в качестве важнейшей молекулы, вовлеченной в передачу внутриклеточных сигналов, регулирующих экспрессию генов и активность защитных систем [17], включая увеличение концентрации в цитозоле ионов кальция, выполняющего важную роль в процессах передачи сигнальной информации в геном растений [17]. Показано, что H_2O_2 принимает участие в активации экспрессии генов стрессовых белков [18]. Вероятно, способствуя генерации АФК, эндофитные бактерии рода *Bacillus* индуцируют передачу сигналов, запускающих работу других защитных механизмов.

Влияние бактерий Bacillus ssp. на активность защитных белков в растениях пшеницы при инфицировании Tilletia caries

Изменение концентрации H_2O_2 в растительных тканях при патогенезе может происходить в результате многих метаболических процессов, но в большей степени это происходит в результате изменения активности оксидоредуктаз. Одним из важных ферментов, наряду с НАДФ · Н-оксидазой и аминооксидазой, активация которого повышает уровень H_2O_2 в растениях при инфицировании, является оксалатоксидаза, относящаяся к 16 классу PR-белков [19].

Результаты исследований показали, что в предобработанных бактериями проростках *Tr. aestivum* активность ОхО превышала показатель контрольных растений (рис. 4б). В ответ на инфицирование *Til. caries* в растениях *Tr. timopheevii* повышалась активность ОхО на 35% (рис. 4б). Сходную реакцию на заражение возбудителем

твердой головни проявляли растения мягкой пшеницы *Tr. aestivum,* обработанные *B. thuringiensis* B-6066 и *B. thuringiensis,* что могло быть одним из механизмов повышения концентрации H_2O_2 в растениях.

Основной функцией ОхО в растениях является участие в деградации щавелевой кислоты, которая у многих патогенных грибов является эффективным фактором вирулентности [20]. Активность фермента высока в проростках однодольных, но в ходе их роста и развития снижается и практически не обнаруживается в зрелых растениях [15]. Однако она может проявляться под влиянием инфицирования. Это предполагает участие оксалатоксидазы в регуляции модификации клеточной стенки при прорастании семян и в защите в это время проростков от фитопатогенов. В связи с этим, ее причисляют к группе *germin*-белков [19]. В ризосфере растений арабидопсиса были обнаружены бактерии, вырабатывающие оксалат-разрушающие ферменты, посредством которых в прилежащей к корням зоне генерировались антимикробные концентрации H_2O_2, повышающие на 70% степень защиты их от патогенов [21]. Возможно, что посредством активации оксалатоксидазы в клетках, прилежащих к зоне инфицирования, формируется защитная зона с высокой концентрацией H_2O_2.

Другим ферментом, вовлеченным как в систему генерации, так и утилизации H_2O_2, является пероксидаза [22]. Эти функции пероксидазы тесно связаны с катализом полимеризации фенольных мономеров в лигнин, суберин и кутин. В то же время пероксидазы апопласта могут проявлять оксидазную активность и генерировать супероксидный радикал или перекись водорода при сдвиге физиологических pH [23].

Исследования показали, что инфицирование растений устойчивой пшеницы *Tr. timopheevii* приводит к повышению активности пероксидазы в 2 раза, в то время как в восприимчивой пшенице *Tr. aestivum* заметной активации фермента не наблюдалось (рис. 4в). В растениях, предобработанных *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* B-6066, при инфицировании активность пероксидазы превышала ее уровень в контроле (рис. 4в). Однако в предобработанных смесью 3 штаммов проростках *B. thuringiensis* B-5689 наблюдалось снижение активности данного фермента относительно зараженного контроля (рис. 4в).

Пероксидаза является ферментом двойного назначения. Основной функцией пероксидазы является защита растительного организма от вредного воздействия АФК и непосредственное участие в процессах дифференциации тканей и органов высших наземных растений. Одной из причин снижения пероксидазной активности могло быть высокое содержание H_2O_2, индуцируемое обработкой смесью 3 бактерий *Bacillus* ssp. (рис. 4а), и переключение ее на каталазную активность. Такое явление, в частности, зарегистрировано для нескольких форм апопластных пероксидаз, которые при высоких концентрациях H_2O_2 проявляли каталазную активность [23]. Переключение пероксидазной активности на ката-

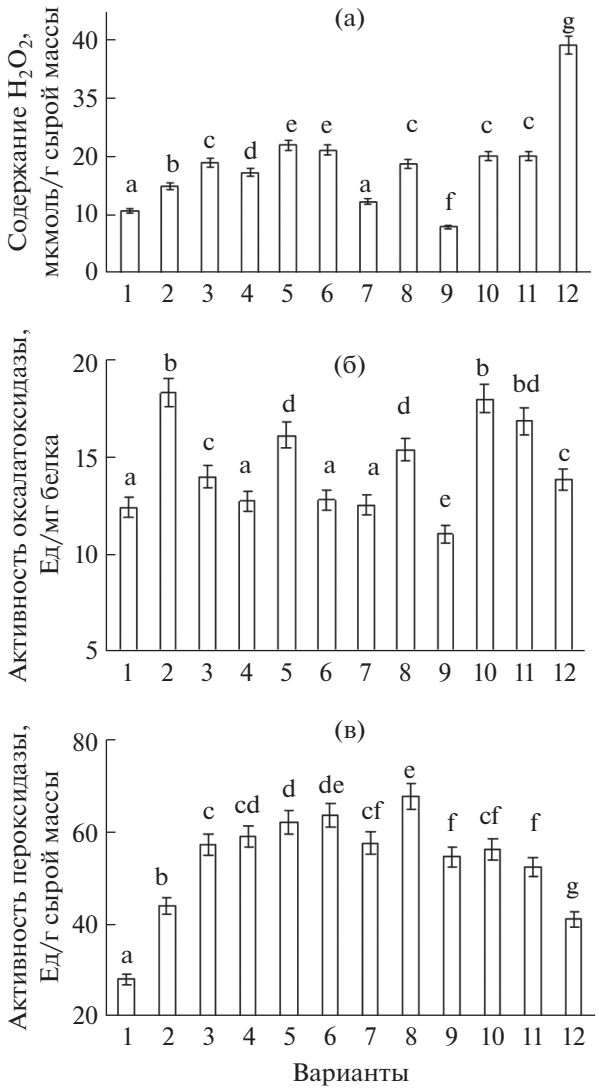

Рис. 4. Влияние бактерий рода *Bacillus* ssp. на содержание H_2O_2 (а), активность оксалатоксидазы (б) и пероксидазы (в) в 7-дневных проростках пшеницы *Tr. timopheevii* и *Tr. aestivum* при инфицировании *Til. caries*. 1 – *Tr. timopheevii*, 2 – *T. timopheevii* + + *Til. caries*, 3 – *Tr. aestivum*, 4 – *Tr. aestivum* + *Til. caries*, 5 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д, 6 – *Tr. aestivum* + + *B. subtilis* 26Д + *Til. caries*, 7 – *Tr. aestivum* + + *B. thuringiensis* B-6066, 8 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-6066 + *Til. caries*, 9 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689, 10 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689 + + *Til. caries*, 11 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + + *B. thuringiensis* B-6066 + *B. thuringiensis* B-5689, 12 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* B-6066 + + *B. thuringiensis* B-5689 + *Til. caries*. Достоверно различающиеся значения подписаны разными буквами.

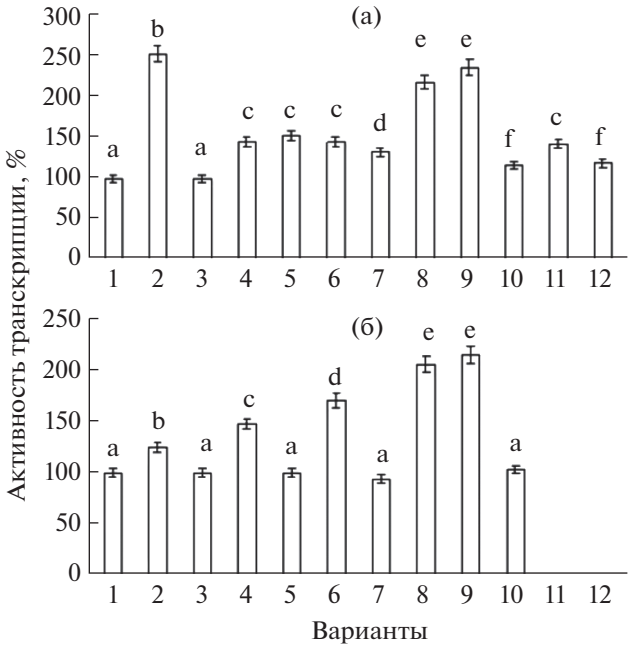

Рис. 5. Влияние бактерий рода *Bacillus* ssp. на уровень транскрипционной активности гена хитиназы *TaChiI* (а) и гена ингибитора протеиназы *TaPI* (б) в 7-дневных проростках пшеницы *Tr. timopheevii* и *Tr. aestivum* при инфицировании *Til. caries.* 1 – *Tr. timopheevii*, 2 – *T. timopheevii* + *Til. caries*, 3 – *Tr. aestivum*, 4 – *Tr. aestivum* + *Til. caries*, 5 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д, 6 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *Til. caries*, 7 – *Tr. aestivum* + + *B. thuringiensis* B-6066, 8 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-6066 + *Til. caries*, 9 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689, 10 – *Tr. aestivum* + *B. thuringiensis* B-5689 + + *Til. caries*, 11 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + + *B. thuringiensis* B-6066 + *B. thuringiensis* B-5689, 12 – *Tr. aestivum* + *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* B-6066 + + *B. thuringiensis* B-5689 + *Til. caries*. За 100% принята активность гена тубулина. Достоверно различающиеся значения подписаны разными буквами.

лазную имеет защитное значение, направленное на предотвращение образования избытка H_2O_2. Это обширное мультигенное семейство классических ПО растений класса III, включенных в семейство PR-9, участвует в упрочении клеточных стенок за счет окислительных реакций между белками и фенолами, катализирует процессы отложения лигнина на клеточных стенках, что также повышает их устойчивость к действию гидролаз патогенов.

Влияние бактерий Bacillus ssp. на транскрипционную активность генов хитиназы TaChiI и ингибитора протеиназы TaPI в растениях пшеницы при инфицировании Tilletia caries

Системная устойчивость растений к болезням, являющаяся неспецифичной, основана на экспрессии множества защитных генов. Считается, что развитие СПУ происходит при детекции растением биотрофного патогена, приводящей к синтезу PR-белков генов с участием салициловой кислоты (СК) и ее производных [24, 25]. Действие же некротрофных патогенов, фитофагов и эндофитов приводит к усиленному биосинтезу жасмоновой кислоты (ЖК) и этилена, также регулирующих экспрессию PR-белков, и к развитию СИУ [26]. Однако это разделение весьма условно и не является окончательным. В последние годы появляются данные о наличии других возможных альтернативных индукторов и участников процессов формирования устойчивости к патогенам [27]. Необходимо отметить, что патогенные микроорганизмы приспособились оказывать влияние на защитные сигнальные пути клеток. Например, в ответ на инфицирование бактерией *Pseudomonas syringae,* которая по типу питания является биотрофом, должен развиваться защитный ответ через СК-индуцируемый сигнальный путь. Однако, посредством синтеза структурного миметика ЖК, *Pseudomonas syringae* запускает в растительных тканях активацию ЖК-зависимых сигнальных ответов, что ведет к подавлению СК-зависимых защитных ответов [28]. Значительный интерес представляет выяснение возможных путей индукции защитного ответа у пшеницы к биотрофному патогену *Til. caries* под воздействием бактерий рода *Bacillus.* Инфицирование и обработка бактериями *Bacillus* ssp. стимулировали накопление траскриптов гена хитиназы в растениях пшеницы (рис. 5а). Так, в инфицированных растениях устойчивой пшеницы *Tr. timopheevii* и под воздействием *B. thuringiensis* B-5689 содержание транскриптов гена *TaChiI* возрастало в постинфекционный период в 2 раза по сравнению с контролем.

Хитиназы, обладающие антифунгальным действием, относятся к PR-белками и образуются в ответ на поражение растений различными патогенами. Они расщепляют хитин – неветвящийся гомополимер β-1,4-связанных сахаров N-ацетилглюкозаминов, являющийся одним из основных структурных компонентов клеточной стенки грибных патогенов. В ответ на заражение вирусами, грибами и бактериями в межклеточной жидкости растительных тканей происходит накопление, в основном, ферментов третьего типа (PR-3). Хитиназы характеризуются высокой молекулярной гетерогенностью, и в тканях растений выявляется несколько компонентов (изоферментов), обладающих различным компонентным составом и свойствами. Высокая степень гетерогенности ферментов существенно расширяет возможности растительного организма к гибкому реагированию на действие различных патогенов.

Как известно, развитие СИУ, опосредованной СРРБ, обуславливается ранним и быстрым накоплением АФК. Такой механизм индукции защитного ответа мог сформироваться в процессе коэволюции системы растение – эндофит – патоген.

Механизм защитного действия биопрепаратов на основе эндофитных бактерий может быть обусловлен усилением продукции H_2O_2 и опосредованным ее участием в усилении экспрессии генов PR-белков, в том числе антиоксидантных ферментов и хитиназ. Обнаружено, что бактерии рода *Bacillus* вырабатывают в культуральную среду хитиназы и глюканазы, гидролизирующие пептидогликаны, которые являются важным компонентом клеточной стенки микроорганизмов, а также индуцируют образование других защитных соединений [4, 12].

Как видно из рис. 5б, в инфицированных растениях устойчивой пшеницы *Tr. timopheevii* выявлялось незначительное накопление транскриптов гена ингибитора протеиназы *TaPI*, возможно, это объясняется низкой степенью ее поражения *Til. caries* и отсутствием инфекционных структур в тканях пшеницы, а также особенностями биологии патогена. Повышение содержания ингибиторов протеиназ в растении происходит, как правило, не за счет увеличения концентрации конститутивных соединений, а за счет синтеза новых форм ингибиторов. Биотрофные патогены обладают более низким разнообразием и концентрацией токсичных для растения метаболитов, в частности, гидролитических ферментов, по сравнению с некротрофами. Так, у возбудителя мучнистой росы ячменя *Erysiphe graminis* гидролитические ферменты выделяются из кончика инфекционной гифы, и их активность проявляется только на расстоянии 0.1 мкм от гифы. Кроме того, некоторые ферменты, губительно действующие на растительную ткань, могут и вовсе исчезать. Например, у биотрофа *Uromyces fabae* не выявлена активность ряда ферментов, участвующих в деградации углеводов клеточной стенки растений: эндополигалактуроназы, эндопектатлиазы, целлюлазы. В то время как некротроф *Verticillium albo-atrum* характеризуется достаточно высокой активностью вышеназванных ферментов [15].

Инфицирование *Til. caries* мягкой пшеницы *Tr. aestivum* приводило к повышению транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы *TaPI* на 50% относительно контроля (рис. 5б). В предобработанных *B. thuringiensis* B-6066 и инфицированных проростках мягкой пшеницы транскрипционная активность гена *TaPI* повышалась в 2 раза, как и под воздействием *B. thuringiensis* B-5689 в здоровых растениях (рис. 5а). Интересно, что в предобработанных смесью трех штаммов *Bacillus* spp. растениях *Tr. aestivum* транскрипты гена ингибитора протеиназы не накапливались, в то время как каждый штамм по отдельности оказывал стимулирующее действие на транскрипционную активность гена *TaPI* (рис. 5б).

Считается, что обработка растений СРРБ способствует развитию СИУ, опосредованной действием жасмоновой кислоты, маркером развития которой является индукция экспрессии защитного белка PR-6 [29]. Однако показано, что формирование устойчивости пшеницы к патогенам может развиваться и через салицилатный сигналинг (по типу СПУ) [30]. Можно предположить, что при обработке смесью трех штаммов бактерий рода *Bacillus* сигнальные пути формирования защитного ответа в растениях пшеницы к биотрофному возбудителю твердой головни перекрываются.

Защита растений от патогенов путем их симбиотической бактеризации представляет один из наиболее перспективных и экологически безопасных методов повышения урожайности и качества сельскохозяйственной продукции. При умелом использовании биопрепаратов можно добиться значительных результатов в борьбе с патогенами, что может служить успешной альтернативой пестицидам. Вероятно, механизм индуцирования защитных систем растения эндофитными бактериями рода *Bacillus* опосредован накоплением H_2O_2 и последующей модуляцией активности PR-белков. Выявленные различия в активации генов индивидуальных PR-белков свидетельствовали о дифференциальном механизме воздействия бактерий рода *Bacillus* на защитный потенциал растений пшеницы при инфицировании *Til. caries*, который, вероятно, связан с природой организма – продуцента.

Работа выполнялась по теме госзадания, № гос. регистрации АААА-А16-116020350027-7 на оборудовании Центра коллективного пользования “Биомика” (Отделение биохимических исследований и нанобиотехнологии Регионального центра коллективного пользования “Агидель”) и Уникальной научной установки “КОДИНК”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Монастырский О.А.* Состояние и перспективы развития биологической защиты растений в России // Защита и карантин растений. 2008. Вып. 12. С. 41.
2. *Yadeta K.A., Thomma B.P.H.J.* The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. № 97. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097
3. *Мелентьев А.И.* Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах. Москва: Наука, 2007. 148 с.
4. *Surette M.A., Sturz A.V., Lada R.R., Nowak J.* Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth // Plant Soil. 2003. V. 253. P. 381.

5. *Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М.* Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 763.
6. *Rais A., Jabeen Z., Shair F., Hafeez F.Y., Hassan M.N.* *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae* // PLoS One. 2017. V. 12: e0187412. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187412
7. *Nicolaev A.N., Nicolaeva S.I., Maximova I.I.* Comparative antifungal activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* isolates *in vitro* // Studia Universitatis Moldaviae. 2015. V. 1. № 81. P. 12.
8. *Chen F., Wang M., Zhang Y., Luo J., Yang X., Wang X.* Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579 // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 675.
9. *Kollmorgen J.F., Jones L.C.* The effects of soil-borne micro-organisms on the germination of chlamydospores of *Tilletia caries* and *T. foetida* // Soil Biol. Biochem. 1975. V. 7. P. 407.
10. *Yarullina L.G., Kasimova R.I., Kuluev B.R., Surina O.B., Yarullina L.M., Ibragimov R.I.* Comparative study of bunt pathogen resistance to the effects of fungicides in callus co-cultures *Triticum aestivum* with *Tilletia caries* // Agric. Sci. 2014. V. 5. P. 906.
11. *Maksimov I., Troshina N., Surina O., Cherepanova E.* Salicylic acid increases the defense reaction against bunt and smut pathogens in wheat calli // J. Plant Interact. 2014. V. 9. P. 306.
12. *Chen F., Wang M., Zhang Y., Luo J., Yang X., Wang X.* Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579 // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 675.
13. *Мерзаева О.В., Широких И.Г.* Образование ауксинов эндофитными актинобактериями озимой ржи // Прикл. биохим. микробиол. 2010. Т. 46. С. 51.
14. *Berg G.* Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biotehnol. 2009. V. 84. P. 11.
15. *Shafikova T.N., Omelichkina Y.V.* Molecular-genetic aspects of plant immunity to phytopathogenic bacteria and fungi // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 571.
16. *O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S.* Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism // Planta. 2012. V. 236. P. 765.
17. *Galvez-Valdivieso G., Fryer M.J., Lawson T., Slattery K., Truman W., Smirnoff N., Asami T., Davies W.J., Jones A.M., Baker N.R.* The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2143.
18. *Pfannschmidt T., Bräutigam K., Wagner R., Dietzel L., Schröter Y.* Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: Approaches towards better understanding // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 599.
19. *Hu Y., Guo Z.* Purification and characterization of oxalate oxidase from wheat seedlings // Acta Physiol. Plant. 2009. V. 31. P. 229.
20. *Карпун Н.Н., Янушевская Э.Б., Михайлова Е.В.* Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе // С.-х. биол. 2015. Т. 50. С. 540–549.
21. *Schoonbeek H.-J., Jacquat-Bovet A.-C., Mascher F., Metraux J.-P.* Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea* // Mol. Plant Microbe Interact. 2007. V. 20. P. 1535.
22. *Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И.* Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. химии. 2006. Т. 46. С. 303.
23. *Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R.P., Luthje S., Vylegzhanina N., Buck F., Bottger M.* Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. P. 497.
24. *Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М.* Салицилат-индуцированная модификация протеомов у растений // Прикл. биохим. микробиол. 2010. Т. 46. С. 263–275.
25. *Glazebrook J.* Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. 2005. V. 43. P. 205.
26. *Durrant W.E., Dong X.* Systemic acquired resistance // Annu. Rev. Phytopathol. 2004. V. 42. P. 185.
27. *Chanda B., Xia Y., Mandal M.K., Sekine K.T., Gao Q.M., Selote D.* Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants // Nat. Genet. 2011. V. 43. P. 421.
28. *Яковлева В.Г., Егорова А.М.* Взаимоотношения между салицилатным и жасмонатным сигнальными путями. Клеточная сигнализация. Казань: ФЭН, 2010. С. 68.
29. *Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V.* Role of jasmonic acid in interaction of plants with plant growth promoting rhizobacteria during fungal pathogenesis // Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development / Ed. Morrison, L. New York: Nova Sci. Publ., 2015, Ch. 3, P. 33.
30. *Бурханова Г.Ф., Веселова С.В., Сорокань А.В., Благова Д.К., Нужная Т.В., Максимов И.В.* Бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к *Septoria nodorum* Berk // Прикл. биохим. микробиол. 2017. Т. 53. С. 308.