

## ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus* НА СОДЕРЖАНИЕ $H_2O_2$ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ИНГИБИТОРОВ ГИДРОЛАЗ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary<sup>1</sup>

© 2021 г. Л. Г. Яруллина<sup>а</sup>, \*, В. О. Цветков<sup>б</sup>, Г. Ф. Бурханова<sup>а</sup>, А. В. Сорокань<sup>а</sup>, Е. А. Заикина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Башкирский государственный университет”, Уфа, Россия

\*e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 02.03.2021 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принята к публикации 17.03.2021 г.

Изучено влияние обработки различными штаммами бактерий *Bacillus subtilis* Cohn (штаммы 26Д и 11ВМ) и *B. thuringiensis* Berliner (штаммы В-5351 и В-6066) на содержание пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), активность антиоксидантных (каталазы, пероксидазы) и гидролитических (протеазы и амилазы) ферментов и экспрессию генов ингибиторов гидролаз в растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в связи с устойчивостью к возбудителю фитофтороза – оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Исследования проводили на 15-дневных растениях картофеля восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя Роза, выросших из микроклубней. Растения опрыскивали суспензией различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* ( $10^8$  кл./мл). Спустя 5 суток часть растений инфицировали зооспорами *P. infestans* ( $10^5$  спор/мл). Через 6, 24 и 48 ч после заражения растения фиксировали для оценки биохимических параметров. Выявлено снижение степени пораженности листьев *P. infestans* под влиянием обработки бактериями *B. subtilis* и *B. thuringiensis* в зависимости от штамма. Бактерии повышали устойчивость картофеля к инфицированию *P. infestans* за счет увеличения концентрации  $H_2O_2$  и усиления экспрессии генов ингибиторов протеазы и амилазы. Выявлены различия в степени активации транскрипционной активности генов ингибиторов гидролаз под влиянием бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, что предполагает штамм-зависимые пути формирования устойчивости растений картофеля к возбудителю фитофтороза *P. infestans*.

**Ключевые слова:** *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Solanum tuberosum*, антиоксидантные ферменты, гидролазы, ингибиторы гидролаз, пероксид водорода, экспрессия генов индуцированная устойчивость

DOI: 10.31857/S0015330321060191

### ВВЕДЕНИЕ

Фитофтороз – одно из опаснейших заболеваний картофеля, поражающее практически все части растения: листья, стебли, клубни, цветки и ягоды. Потери от инфицирования выражаются в снижении массы и качества клубней, гибели пораженной ботвы в период клубнеобразования и в массовом гниении клубней во время хранения.

<sup>1</sup> К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизированных пользователей по doi: 10.31857/S0015330321060191

**Сокращения:** PR-белки – патоген-индуцируемые белки, ИП – ингибиторы протеаз, ИСУ – индуцированная системная устойчивость, КАТ – каталаза, ПО – пероксидаза, СВЧ – реакция сверхчувствительности; СРРБ – стимулирующие рост растений бактерии, СПУ – системная приобретенная устойчивость, ФБ – фосфатный буфер.

Возбудитель фитофтороза – оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary является гембиотрофным патогеном, на начальных стадиях болезни проявляющим свойства биотрофа, а позднее переходящим на некротрофный тип питания. Инфицирование происходит путем проникновения зооспор через чечевички, устьица, места повреждения растительных тканей. Зооспорангии способны прорасти гифами, сразу инфицируя растение, либо образуют множество зооспор, каждая из которых способна к прорастанию [1].

Повышение устойчивости растений к патогенам является актуальным вопросом современного растениеводства. В связи с этим наиболее перспективными являются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала растений и почвенных микро-

организмов. Основу экологически безопасных препаратов для защиты растений от стрессов биотической и абиотической природы составляют стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) (или PGPB от Plant Growth Promoting Bacteria) [2]. Особенно привлекательными являются высокоэффективные и сохраняющие в течение длительного времени свою жизнеспособность бактерии рода *Bacillus*. На основе бактерий рода *Bacillus* разработаны многие биопрепараты для защиты растений от фитопатогенов, которые рассматриваются как перспективные агенты биологического контроля болезней и вредителей растений в силу их широко распространенного природного антагонизма ко многим фитопатогенным грибам [3].

Особенностью биопрепаратов на основе микроорганизмов является неспецифическая активация защитных механизмов растений. Известна способность некоторых представителей бактерий рода *Bacillus* эндофитно развиваться в тканях растений и подавлять рост и развитие возбудителей болезней посредством секреции гидролитических ферментов и низкомолекулярных липопептидов, запускающих в растениях генерацию пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и оксипиноловую сигнальную защитную систему, регулирующую активность ингибиторов протеиназ [4]. Защитное действие биопрепаратов на основе *Bacillus spp.* может быть обусловлено опосредованным участием  $H_2O_2$  в усилении экспрессии генов PR-белков. Возможно, способствуя генерации АФК, бактерии рода *Bacillus* индуцируют передачу сигналов, запускающих работу других защитных механизмов. Показано, что обработка растений *Bacillus subtilis* способствует развитию индуцированной системной устойчивости (ИСУ), опосредованной действием жасмоновой кислоты [5]. Однако формирование устойчивости растений к патогенам под воздействием бактерий рода *Bacillus* может развиваться и через салицилатный сигнальный путь по типу системной приобретенной устойчивости (СПУ) [6]. Несмотря на наличие большого количества данных о подавлении развития фитопатогенов бактериями рода *Bacillus*, механизмы формирования устойчивости под их воздействием остаются до конца не выясненными. Предполагается, что особенности формирования защитных реакций растений под действием бактерий рода *Bacillus* могут быть связаны с природой организма-продуцента [3].

Цель данной работы – изучение влияния различных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Cohn и *B. thuringiensis* Berliner на содержание пероксида водорода, активности антиоксидантных и гидролитических ферментов, транскрипционную активность генов ингибиторов гидролаз в растениях картофеля в связи с устойчивостью к возбудителю фитофтороза *P. infestans* (Mont.) de Bary.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** В работе были использованы растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.), выросшие из микроклубней восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя Роза. Для получения растений микроклубни высаживали в контейнеры с грунтом “TerraVita” (Норд Палп, Россия), включающим верховой торф различной степени разложения, очищенный речной песок, перлит, комплексное минеральное удобрение и биогумус (рН 6.0–6.5), на глубину 3–4 см. Растения выращивали на светоплощадке в течение 15 суток, затем их инокулировали суспензионной культурой (5 мл/растение, конечный титр  $10^8$  кл/мл) штаммов бактерий *B. thuringiensis* В-6066 и В-5351, полученными из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, *B. subtilis* 26Д – из коммерческого биопрепарата “Фитоспорин-М” (“Башинком”, Россия) и *B. subtilis* 11ВМ – из коллекции Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН.

**Заражение растений и оценка симптомов болезни.** Через 5 дней после обработки бактериями часть растений инфицировали суспензией зооспор ( $10^6$  спор/мл) возбудителя фитофтороза *P. infestans* изолята Башкирский из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН (5 мл/растение). Через 6, 24 и 48 ч после инфицирования контрольные и зараженные растения фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$  до проведения биохимических исследований. Бактерии культивировали на жидкой среде Луриа-Бертани в течение 72 ч, затем суспензия была разбавлена дистиллированной водой до необходимой концентрации.

Развитие симптомов заболевания оценивали через 5 суток после инфицирования по % площади поражения листовой пластинки. Листья фотографировали, и цифровые изображения анализировали в программе ImageJ (“National Institutes of Health”, Bethesda, США).

**Определение содержания  $H_2O_2$ .** Листья гомогенизировали в 0.025 М Na-фосфатном буфере (ФБ), рН 6.2, в соотношении 1 : 3 и центрифугировали 20 мин при 10000 g. Здесь и далее использовали центрифугу Eppendorf 5415R (“Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для определения содержания  $H_2O_2$ . Содержание  $H_2O_2$  определяли с использованием красителя ксиленолового оранжевого [7]. 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) при 560 нм.

**Определение активности каталазы (КАТ).** Для определения активности КАТ (КФ 1.11.1.6) растительную ткань гомогенизировали в 50 мМ растворе ФБ (рН 7.8). Соотношение массы навески к объе-

му буфера составляло 1 : 10. После центрифугирования в течение 10 мин при 12000 g супернатант использовали для анализа активности фермента [8]. Реакцию инициировали добавлением 0.1 мл супернатанта к 0.2 мл 0.03% раствора  $H_2O_2$ . В контрольную пробу вместо супернатанта вносили 0.1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4% раствора молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре Biospek-Mini (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 410 нм. Активность КАТ рассчитывали по формуле:

$$E = (A_k - A_0) / (K \times V \times t),$$

где  $E$  – активность КАТ (мкат/л),  $A_k$  и  $A_0$  – поглощение контрольной и опытной проб, соответственно,  $V$  – объем вносимой пробы, 0.1 мл,  $t$  – время инкубации, 600 с,  $K$  – коэффициент молярного поглощения  $H_2O_2$ , равный  $22.2 \times 10^3$  моль $^{-1}$  см $^{-1}$ .

**Определение активности пероксидазы (ПО).** Для выделения цитоплазматической фракции ПО (КФ 1.11.1.7) отрезки листьев гомогенизировали в 0.01 М ФБ, pH 6.2. Отношение массы навески листьев к объему ФБ составляло 1 : 3. Экстракт центрифугировали 25 мин при 12000 g и супернатант использовали для анализа активности ПО. Активность ПО определяли микрометодом [9] по окислению субстрата – ортофенилендиамина. Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре для иммуноферментного анализа Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США) при 490 нм. За единицу ферментативной активности принимали изменение оптической плотности за 1 мин.

**Оценка транскрипционной активности генов ингибиторов протеазы и амилазы картофеля.** Тотальную РНК из растений выделяли с помощью тризола, согласно протоколу фирмы-поставщика (“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 (“Синтол”, Россия). Анализ накопления транскриптов генов ингибитора амилазы (номер в GenBank XM006351484) и ингибитора протеазы (номер в GenBank JX683427) (Дополнительные материалы, таблица 1) проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе “iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System” (“Bio-Rad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Изменения в транскрипционной активности генов (оценка числа копий мРНК для каждого гена) определяли на основании вычисления уровня нормализованной экспрессии с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США). На

гистограммах представлены значения экспрессии генов по отношению к исходной точке (контроль без обработки).

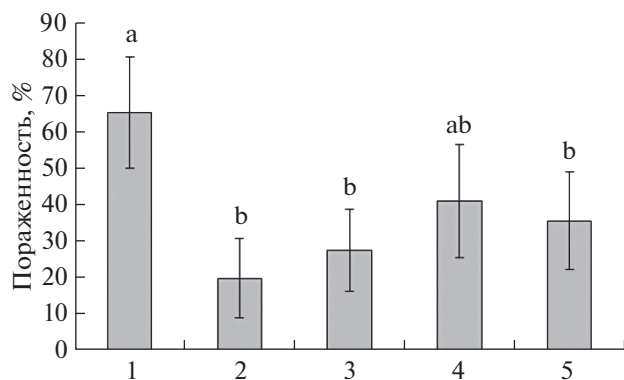
**Активность амилаз и протеаз** определяли по гидролизу иммобилизованных крахмала и БСА, соответственно [10]. Субстраты ферментов с конечной концентрацией 1% иммобилизовали в 4% ПААГ. Растворы, обладающие ферментативной активностью, наносили на ПААГ, выдерживали 20 мин при 37°C, затем окрашивали раствором Люголя или Кумасси G-250. Активность ферментов определяли методом денситометрии по калибровочным кривым, построенным с использованием стандартных препаратов амилазы *Aspergillus niger* и бычьего трипсина (“Sigma”, США). Ферментативную активность выражали в мкмоль субстрата/(г белка мин). Содержание растворимого белка в образцах определяли по методу Брэдфорд.

**Статистическая обработка данных.** Опыты проводили в 5-кратной биологической повторности. Биохимические параметры и транскрипционную активность измеряли не менее трех раз. На гистограммах показаны выборочные средние, а в качестве показателя погрешности показан 95% доверительный интервал. Для оценки достоверности различий выборочных средних проводили дисперсионный анализ ANOVA и последующий многограновый тест Дункана в программе Statistica 13 (уровень надежности 95%). Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Влияние различных штаммов бактерий B. subtilis и B. thuringiensis на устойчивость растений картофеля к инфицированию P. infestans*

Сравнительный анализ развития возбудителя фитофтороза на растениях картофеля восприимчивого сорта Ранняя Роза выявил различия в степени пораженности листьев *P. infestans* между контролем и вариантами с обработкой бактериями *B. subtilis* и *B. thuringiensis* (рис. 1). В контроле степень поражения листьев составляла  $65 \pm 15\%$ . Предобработка растений бактериями значительно снижала пораженность листьев: в вариантах опыта со штаммами *B. subtilis* 26Д и 11ВМ – до  $20 \pm 11\%$ , и  $28 \pm 11\%$ , а с обработкой штаммами *B. thuringiensis* В-6066 и В-5351 – до  $36 \pm 13\%$  и  $41 \pm 15\%$  соответственно. Результаты показали, что все исследуемые штаммы бактерий повышали устойчивость растительных тканей к инфицированию возбудителем фитофтороза, но в различной степени. Наиболее эффективное защитное действие на растения картофеля к инфицированию *P. infestans* оказывали бактерии *B. subtilis* 26Д, что согласуется с данными, полученными на клубнях *S. tuberosum* [11] и в культуре *in vitro* [12].



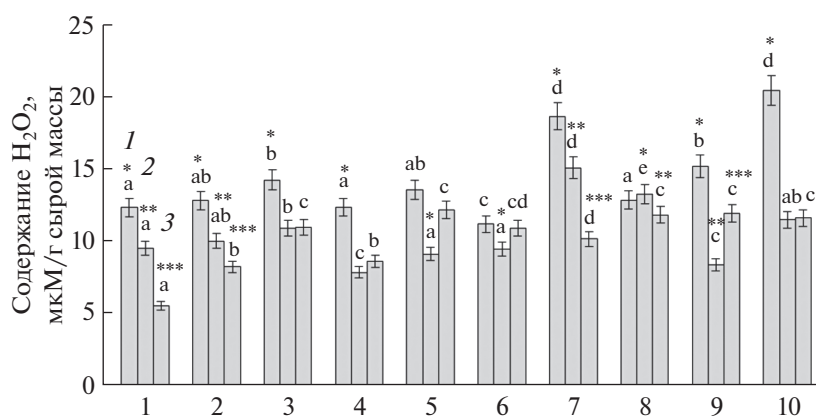
**Рис. 1.** Влияние различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* на степень поражения листьев картофеля возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans* (1 – контроль, 2 – *Bacillus subtilis* 26D, 3 – *Bacillus subtilis* 11BM, 4 – *Bacillus thuringiensis* B-5351, 5 – *Bacillus thuringiensis* B-6066). Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения.

#### Влияние различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* на содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях картофеля при инфицировании *P. infestans*

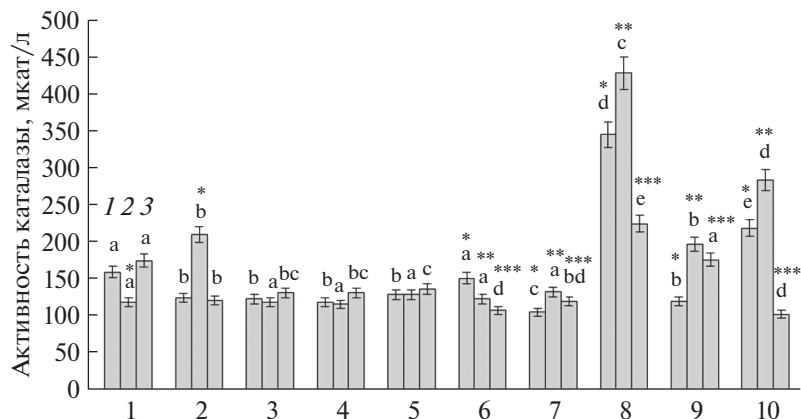
Некоторые механизмы повышения устойчивости картофеля к инфицированию *P. infestans* под влиянием бактерий рода *Bacillus* могли быть связаны с изменением концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в растительных тканях. Исследования показали, что в обработанных бактериями *B. subtilis* неинфицированных растениях накопление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> происходило постепенно (рис. 2). Наиболее значимые различия по содержанию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> между инокулированными *B. subtilis* 11BM и *B. thuringiensis* B-6066 и контрольными растениями выявлялись через 48 ч после инфицирования (рис. 2).

Возможно, это обусловлено антистрессовым воздействием метаболитов бактерий *B. subtilis*. Известно, что под воздействием эндофитных бактерий рода *Bacillus* индуцируется активность антиоксидантных ферментов [13]. В то же время, в листьях предобработанных бактериями растений при инфицировании *P. infestans* уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> заметно повышался на раннем этапе (6 ч) инфекционного процесса, особенно под воздействием бактерий *B. subtilis* 26D и *B. thuringiensis* B-6066 (рис. 2). Однако через 48 ч после инфицирования концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в растениях, обработанных различными штаммами бактерий рода *Bacillus*, не отличалась от контрольных инфицированных растений (рис. 2).

Как известно, устойчивость картофеля к возбудителю фитофтороза *P. infestans* во многом определяется развитием реакции сверхчувствительности (СВЧ). Это предполагает изменения концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в растительных тканях в ответ на внедрение патогена. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> можно рассматривать в качестве важнейшей молекулы, вовлеченной в передачу внутриклеточных сигналов, регулирующих экспрессию генов и активацию защитных систем растения. Повышение уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает увеличение концентрации в цитозоле ионов кальция, выполняющих важную роль в процессах передачи сигнальной информации в геном растения [14]. Возможно, бактерии *B. subtilis* и *B. thuringiensis* способствуют ранней генерации АФК, индуцируют передачу сигналов, запускающих работу других защитных механизмов. Показано, что бактерии рода *Bacillus* повышают устойчивость растений к патогенам не только посредством секреции антибиотиков, но и в результате индукции накопления в зоне инфицирования фенолов и



**Рис. 2.** Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11BM, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11BM + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному времени эксперимента. Звездочками обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному варианту обработки, но различающиеся временем эксперимента.



**Рис. 3.** Активность каталазы в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11ВМ, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11ВМ + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному времени эксперимента. Звездочками обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному варианту обработки, но различающиеся временем эксперимента.

ферментов про-/антиоксидантной системы [15]. Вероятно, СРРБ вызывают сенсбилизацию, то есть повышают чувствительность растительных тканей к проникновению патогенов и подготавливают защитную систему растений к последующим ранним ответным реакциям.

#### Влияние различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* на активность антиоксидантных ферментов в листьях картофеля при инфицировании *P. infestans*

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 антиоксидантных ферментов. Важнейшим антиоксидантным ферментом является КАТ [16]. Активность КАТ в отсутствие заражения достоверно повышалась лишь в растениях, обработанных штаммом *B. subtilis* 26D (рис. 3). В необработанных растениях при заражении фитотрофой выявлено снижение активности КАТ в ходе инфекционного процесса. Существенное повышение активности КАТ проявлялось на протяжении 24 ч в инфицированных растениях, предобработанных штаммом *B. thuringiensis* B-6066, но особенно, штаммом *B. subtilis* 11ВМ (рис. 3).

Активность КАТ может существенно модифицироваться с участием сигнальных молекул.  $H_2O_2$  является не только сигнальной молекулой, но и субстратом КАТ. В то же время ее воздействие на активность КАТ у растений неоднозначно. Например, в проростках пшеницы  $H_2O_2$  в зависимости от концентрации либо ингибировала [17], либо сти-

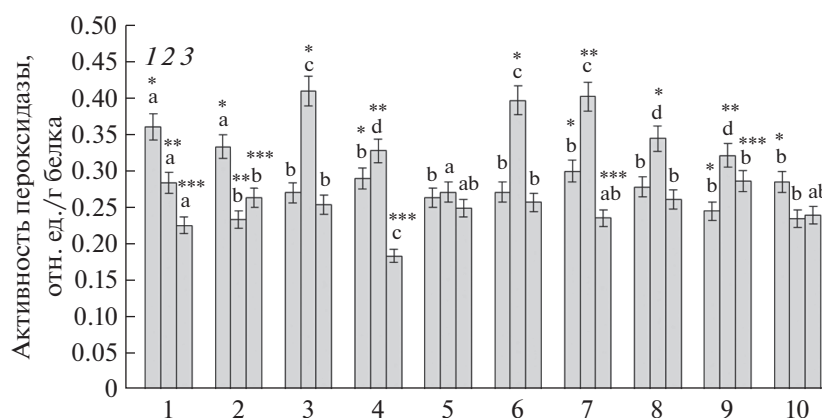
мулировала [18] активность КАТ. Способностью к ингибированию КАТ обладает и салициловая кислота, что является одним из механизмов развития СВЧ-реакции. Ингибирование фермента под действием салициловой кислоты может приводить в дальнейшем к активации экспрессии гена КАТ и усилению синтеза фермента [19].

Ферментом, вовлеченным как в систему генерации, так и утилизации  $H_2O_2$ , является пероксидаза (ПО). Основной функцией ПО является защита растительного организма от воздействия АФК и непосредственное участие в процессах дифференциации тканей и органов высших растений.

В незараженных растениях только обработка штаммом *B. subtilis* 11ВМ приводила к повышению активности ПО по сравнению с контрольными растениями (рис. 4). Активность ПО в зараженных растениях по сравнению с незараженными повышалась через 24 ч после инфицирования *P. infestans*. Можно отметить, что в инфицированных растениях все исследованные штаммы бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* вызывали повышение активности ПО по сравнению с контролем, подобно заражению фитотрофой.

Важной особенностью ПО является ее способность переключаться на каталазную активность, предотвращая образование избытка  $H_2O_2$ . Такое явление, в частности, зарегистрировано для нескольких форм апопластных пероксидаз [20]. Обширное мультигенное семейство классических ПО растений класса III участвует также в укреплении клеточных стенок за счет окислительных реакций между белками и фенолами, катализируя процесс отложения лигнина, что повышает их





**Рис. 4.** Активность пероксидазы в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11ВМ, 4 – *B. thuringiensis* В-5351, 5 – *B. thuringiensis* В-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11ВМ + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* В-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* В-6066 + *P. infestans*): 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному времени эксперимента. Звездочками обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному варианту обработки, но различающиеся временем эксперимента.

устойчивость к действию гидролаз патогенов. Вероятно, регуляция содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в растениях картофеля под действием бактерий рода *Bacillus* может происходить различными путями: через снижение активности КАТ и путем модулирующего воздействия на активность ПО.

#### Влияние различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* на транскрипционную активность генов ингибиторов протеазы и амилазы и активность ферментов в растениях картофеля при инфицировании *P. infestans*

Важнейшим компонентом оценки воздействия патогена на растения являются продуцируемые ими гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки растений и обеспечивающие его проникновение в ткани [21]. Ответная защитная реакция растений сопровождается синтезом ингибиторов этих ферментов [22].

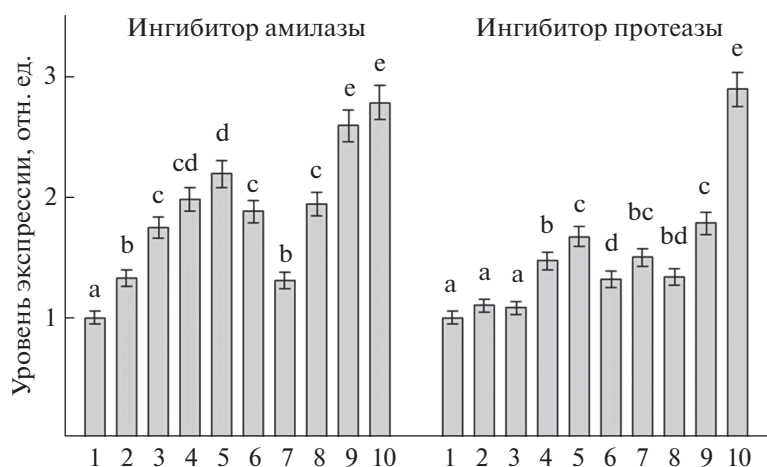
Обработка всеми исследованными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, как и инфицирование *P. infestans*, стимулировала накопление транскриптов гена ингибитора амилазы в растениях картофеля по сравнению с контрольными растениями. Обработка штаммами бактерий *B. thuringiensis* В-5351 и *B. thuringiensis* В-6066 приводила к достоверному повышению уровня транскрипции гена ингибитора амилазы в инфицированных растениях по сравнению с неинфицированными. Следует отметить, что наибольший уровень транскрипционной активности гена ингибитора протеазы наблюдался при обработке картофеля штаммом бактерий *B. thuringiensis* В-6066 как в неинфицированных, так и в инфицированных растениях (рис. 5). Вероятно, в ответ

на инфицирование *P. infestans* в растениях картофеля могут синтезироваться *de novo* ингибиторы ферментов, которые способны подавлять активность амилаз и протеиназ. Повышение содержания ингибиторов гидролаз в растении происходит, как правило, не за счет увеличения концентрации конститутивных соединений, а за счет синтеза новых форм ингибиторов [23]. Наиболее распространенными в растениях являются ингибиторы протеаз и амилаз [20].

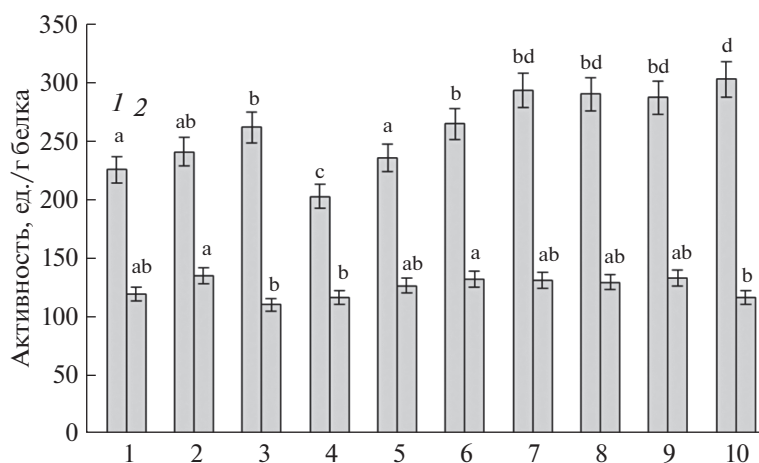
Известно, что амилолитическая активность характерна для представителей большинства таксономических групп возбудителей болезней растений, и почти всегда эти ферменты представлены конститутивными белками. Однако амилаза отсутствует у оомицетов, в частности у представителей рода *Phytophthora*, которые используют для расщепления крахмала ферменты картофеля, активируя их биосинтез в пораженных тканях [24]. Можно предположить, что повышение уровня транскрипционной активности высокоспецифичных ингибиторов амилаз под действием бактериальных метаболитов препятствует росту и развитию *P. infestans* в растительных тканях.

Наши исследования показали, что в обработанных *B. thuringiensis* В-5351 неинфицированных растениях активность амилаз была достоверно ниже, чем в контроле, в то же время обработка картофеля *B. subtilis* 11ВМ приводила к заметному повышению этого показателя (рис. 6). Активность протеаз в зараженных растениях достоверно понижалась при обработке *B. thuringiensis* В-6066.

Высокая протеолитическая активность в зараженных тканях не только обеспечивает аминокислотами рост и развитие патогенного микроорганиз-



**Рис. 5.** Транскрипционная активность генов ингибиторов амилазы и протеазы в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11BM, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11BM + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному гену.



**Рис. 6.** Активность амилаз (1) и протеаз (2) в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11BM, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11BM + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному ферменту.

ма, но и может нейтрализовать защитные белки картофеля, такие как лектины – ингибиторы гидролаз. Так, показано, что экстрацеллюлярная металлопротеиназа фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* (Jones) Waldee расщепляет лектин картофеля, принимающий участие в защите растений [25]. Повышение транскрипционной активности гена ингибитора протеазы направлено на подавление активности ингибиторов экзогенных протеаз и способствует повышению устойчивости картофеля. Ключевую роль в инициации образования ингибиторов протеаз защитной реакции иг-

рает мембранный рецептор системин, белок с молекулярной массой около 160 кДа [26]. Реагируя на повреждение, он вызывает деполяризацию мембраны, что приводит к открытию ионных каналов и резкому повышению уровня внутриклеточного содержания ионов кальция. В результате активируются MAP-киназы и фосфолипазы, и в ходе ряда реакций образуется жасмоновая кислота, которая, вероятно, и служит активатором транскрипции генов защитных белков [27].

Предполагается, что у СРРМ существуют индивидуальные для каждого штамма соединения, вы-

рабатываемые и секретируемые во внеклеточную среду. Например, пептиды с антибиотическими свойствами, а также универсальные сигнальные молекулы — этилен, салициловая и жасмоновая кислоты [28]. Например, в формирование устойчивости растений перца к бактериальной гнили *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* под влиянием штамма *B. cereus* BS107 вовлекались гены защитных PR-белков, активируемых при патогенезе, часть которых, например, PR-1, индуцировались салициловой кислотой, часть (PR-4, PR-10) — жасмоновой кислотой и этиленом, а часть — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [29]. Показано, что инокуляция растений томата штаммом *B. subtilis* BEB-DN приводила к усилению экспрессии ряда генов ИСУ, среди которых наибольшей активностью характеризовались гены ингибиторов протеаз и ферментов синтеза лигнина [30].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что механизм активации защитных систем в растениях картофеля различными штаммами бактерий рода *Bacillus* связан с накоплением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, повышением активности антиоксидантных ферментов и ингибиторов гидролаз. Выявленные различия в степени активации транскрипционной активности генов ингибиторов гидролаз под влиянием бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* предполагают штамм-зависимые пути формирования устойчивости картофеля к *P. infestans*.

Работа выполнялась частично по теме госзадания (номер государственной регистрации АААА-А21-121011990120-7), при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-516-00005, 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. Новотельнова Н.С., Пыстина К.А., Голубева О.Г. Фитофторовые грибы (Сем. *Phytophthora* spp.). Л.: Наука, 1974. 208 с.
2. Verma P., Yadav A.N., Kumar V., Singh D.P., Saxena A.K. Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement // Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives / Eds. Singh D.P., Singh H.B., Prabha R. Singapore: Springer, 2017. P. 543.
3. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах. Москва: Наука, 2007. 148 с.
4. 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* // Agricultural Sciences. 2014. V. 5. P. 906. <https://doi.org/10.4236/as.2014.510098>
5. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Jasmonic acid: biosynthesis, functions and role in plant development // Series Plant Science Research and Practices / Ed. Morrison L. USA: Nova Science Publishers, 2015. P. 33.
6. Cawoy H., Mariutto M., Henry G., Fisher C., Vasilyeva N., Thonart P., Dommes J., Ongena M. Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. P. 87. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
7. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoptotic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca<sup>2+</sup> // New Phytol. 2001. V. 151. P. 185. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x>
8. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И., Цветков В.О., Яруллина Л.М., Шпирная И.А. Цитохимические и биохимические методы исследования микроорганизмов — возбудителей болезней растений: учебное пособие. Уфа: РИЦ БашГУ, 2016. 92 с.
9. Maksimov I.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Abizgildina P.P. Regulation of peroxidase activity under the influence of signaling molecules and *Bacillus subtilis* 26D in potato plants infected with *Phytophthora infestans* // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. P. 173. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020136>
10. Цветков В.О., Шпирная И.А., Максимова В.О., Ибрагимов Р.И. Определение активности амилазы и протеаз с использованием субстратов, иммобилизованных в полиакриламидном геле // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3—5. С. 81.
11. Yarullina L.G., Akhatova A.R., Kasimova R.I. Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant-pathogen interactions // Rus. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 193. <https://doi.org/10.1134/S1021443716020151>
12. Yarullina L.G., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Tsvetkov V.O. Signal regulation of activity of protective proteins in potato plants *in vitro* with the defeat potato late blight // Theoretical and Applied Ecology. 2019. № 4. P. 136. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-136-141>
13. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. P. 11. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
14. 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. № 5. P. 421.  
<https://doi.org/10.1038/ng.798>
15. White J.F., Torres M.S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? // *Physiol. Plant.* 2010. V. 138. P. 440.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01332.x>
  16. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. № 9. P. 405.  
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
  17. Bakalova S., Nikolova A., Wedera D. Isoenzyme profiles of peroxidase catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds // *J. Plant Physiol.* 2004. V. 30. P. 64.
  18. Колупнаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа. 2010. 352 с.
  19. Guan L.M., Scandalios J.G. Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 28. № 8. P. 1182.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00212-4)
  20. 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 & Environment.* 2009. V. 32. P. 497.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x>
  21. Maksimov I.V., Sorokan' A.V., Cherepanova E.A., Surina O.B., Troshina N.B., Yarullina L.G. Effects of salicylic and jasmonic acids on the components of pro/antioxidant system in potato plants infected with late blight // *Rus. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 299.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443711010109>
  22. Yarullina L.G., Kasimova R.I., Akhatova A.R., Maksimov I.V., Ibragimov R.I., Umarov I.A. Qualitative and quantitative changes of potato tuber proteome under the influence of signal molecules and infection with *Phytophthora infestans* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52. P. 71.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683816010154>
  23. Lastochkina O.V., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat // *Wheat Production in Changing Environments. Responses, Adaptation and Tolerance* / Eds. Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain A. Singapore: Springer, 2019. P. 579.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-6883-7\\_23](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6883-7_23)
  24. Gappa-Adachi R., Yano I.K., Takeuchi S., Morita Y., Uematsu S. Phytophthora blight of southern star (*Oxyptalum caeruleum*) caused by *Phytophthora palmivora* in Japan // *J. Gen Plant Pathol.* 2012. V. 78. P. 39.  
<https://doi.org/10.1007/s10327-011-0351-9>
  25. Feng T., Nyffenegger C., Hojrup P., Vidal-Melgosa S., Yan K., Ulrik Fangel J., Meyer A.S., Kirpekar F. Characterization of an extension-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 24. P. 10077.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5877-2>
  26. Gancheva M.S., Malovichko Y.V., Poliushkevich L.O., Dodueva I.E., Lutova L.A. Plant peptide hormones // *Rus. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 171.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443719010072>
  27. Vasyukova N.I., Ozeretskorskaya O.L. Jasmonate-dependent defense signaling in plant tissues // *Rus. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 581.  
<https://doi.org/10.1134/S102144370905001X>
  28. Schoonbeek H.J., Jacquat-Bovet A.C., Mascher F., Métraux J.P. Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007. V. 20. № 12. P. 1535.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-12-1535>
  29. Yang J.W., Yu S.H., Ryu C.-M. Priming of defense related genes confers root-colonizing Bacilli-elicited induced systemic resistance in pepper // *Plant Pathol. J.* 2009. V. 25. P. 389.  
<https://doi.org/10.5423/PPJ.2009.25.4.389>
  30. Valenzuela-Soto J.H., Estrada-Hernández M.G., Laclette E.I., Délano-Frier J.P. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development // *Planta.* 2010. V. 231. P. 397.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-1061-9>