

УДК 581.1:632.937

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* В СОЧЕТАНИИ С САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТАМИ НА ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМА ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary И НЕДОСТАТКЕ ВЛАГИ

© 2022 г. Л. Г. Яруллина^а, *, В. О. Цветков^б, В. О. Хабибуллина^б, Е. А. Черепанова^а, Г. Ф. Бурханова^а, Е. А. Заикина^а, Ж. Н. Калацкая^с

^аИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Башкирский государственный университет”, Уфа, Россия

^сИнститут экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 20.12.2021 г.

После доработки 17.01.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2022 г.

Исследовали влияние бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с салициловой (СК) и жасмоновой (ЖАК) кислотами на изменение протеома листьев картофеля при инфицировании *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и недостатке влаги. Растения, выращенные из микроклубней сорта Ранняя Роза, опрыскивали суспензией *B. subtilis* (10^8 клеток/мл) и смесью бактерий с СК (10^{-6} М), ЖАК (10^{-7} М), СК + ЖАК. Через 3 дня после обработки растения инфицировали *P. infestans* (10^5 спор/мл) и культивировали в условиях искусственно создаваемой почвенной засухи путем сокращения полива. При достижении влажности почвы $40 \pm 5\%$ от полной влагоемкости (7 сут после инфицирования) растения фиксировали в жидком азоте для выделения белков и их анализа методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. Выявлено снижение степени пораженности листьев картофеля *P. infestans* при обработке *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖАК. В протеоме листьев показаны различия в содержании 14 белков в диапазоне рI от 4.0 до 9.0 с молекулярными массами от 30 до 125 кДа. Наиболее существенные изменения в спектре растительных белков выявлены в здоровых растениях, обработанных *B. subtilis*, и в инфицированных — в варианте сочетания *B. subtilis* с ЖАК. Качественные и количественные изменения наблюдались для белков, вовлеченных в процессы дыхания и реакции сверхчувствительности (СВЧ), энергетического обмена, синтеза вторичных метаболитов, защитных белков, оказывающих влияние на устойчивость растений к абиотическому и биотическому стрессу. Протеомный анализ выявил важные белки, участвующие в механизме ответных реакций картофеля на обработку *B. subtilis* и инфицирование *P. infestans*, хотя точные функции идентифицированных белков и их потенциальное влияние на устойчивость растений картофеля к *P. infestans* и недостатку влаги еще предстоит выяснить.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, салициловая кислота, жасмоновая кислота, протеом, масс-спектрометрия, индуцированная устойчивость

DOI: 10.31857/S0015330322040212

ВВЕДЕНИЕ

Повышение устойчивости растений к патогенам и неблагоприятным агроклиматическим условиям является актуальной задачей растениеводства,

Сокращения: ЖАК — жасмоновая кислота; ИСУ — индуцированная системная устойчивость; СК — салициловая кислота; СОД — супероксиддисмутаза; СРРБ — стимулирующие рост растений бактерии; СПУ — системная приобретенная устойчивость; GCS — glycine cleavage system; GDC — glycine dehydrogenase (decarboxylating); mARK — mitochondrial amidoxime reducing component; ОЕЕР — oxygen-evolving enhancer protein; RВОН — respiratory burst oxidase homologs; SHMT — serine hydroxymethyltransferase.

поскольку в естественных условиях возделываемые культуры одновременно или последовательно подвергаются воздействию стрессовых факторов различной природы. В дополнение к селекции сортов с долговременной устойчивостью к болезням и вредителям, в настоящее время в системе органического земледелия успешно применяются микробиологические подходы, основанные на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов. Основой биобезопасных препаратов для защиты растений от биотических и абиотических стрессов являются сти-

мулирующие рост растений бактерии (СРРБ) [1]. В этом отношении особенно привлекательны высокоэффективные бактерии рода *Bacillus*, способные длительное время сохранять жизнеспособность и успешно применяемые для защиты продовольственных культур. Рост и развитие картофеля, а также урожайность, сильно зависят от влажности почвы, и эта зависимость выражена гораздо сильнее, чем у других видов сельскохозяйственных культур [2]. Известно, что ризобактерии могут значительно повысить засухоустойчивость растений [3].

Особенностью СРРБ является их способность воздействовать на рост растений непосредственно за счет синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы, таких как ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая, салициловая (СК) и жасмоновая (ЖАК) кислоты [4]. Считается, что обработка растений СРРБ способствует развитию индуцированной системной устойчивости (ИСУ), опосредованной действием жасмоновой кислоты. Однако показано, что формирование устойчивости пшеницы к патогенам под действием бактерий рода *Bacillus* может развиваться и через салицилатный сигналинг по типу системной приобретенной устойчивости (СПУ) [5].

Показано, что экзогенно применяемая СК, помимо повышения устойчивости к патогенам, повышает устойчивость растений к ряду абиотических стрессов, аналогичные данные были получены при обработке жасмонатом [6]. Таким образом, значительный интерес представляет выяснение механизмов индуцирования устойчивости растений к патогенам и абиотическим стрессам под действием бактерий рода *Bacillus* в комплексе с сигнальными молекулами. Подобные исследования являются важными и для патосистемы картофеля — *Phytophthora infestans*, учитывая широкое распространение фитофтороза в России. Одним из информативных подходов для решения данной задачи является изучение протеома растительных тканей, изменения в котором будут отражать результат дифференциальной регуляции бактериями и патогенами содержания белковых молекул, участвующих в формировании защитного ответа растений в стрессовых условиях.

Целью настоящей работы являлось выявление качественных и количественных изменений в протеоме растений картофеля под влиянием бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с салициловой и жасмоновой кислотами при инфицировании *Phytophthora infestans* и недостатке влаги.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В опытах использовали растения картофеля *Solanum tuberosum* (Чишминская опытная станция Башкирского научно-иссле-

довательского института сельского хозяйства, Уфа, Россия), выращенные из микроклубней восприимчивого сорта Ранняя роза. Клубни высаживали в емкости с грунтом ("TerraVita", Норд Палп, торф верховой разной степени разложения, очищенный речной песок, перлит, комплексные минеральные удобрения, биогумус, рН 6.0–6.5) на глубину 3–4 см. Растения выращивали на светоплощадке с фотопериодом 16 ч (освещенность 8000–10000 люкс) при температуре 20–22°C.

Бактерии *B. subtilis* 26Д из коллекции Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия) культивировали в среде LB (Lysogeny Broth) в течение 24 ч, затем суспензию разбавляли дистиллированной водой до необходимой концентрации.

Для заражения растений использовался высокоагрессивный изолят *P. infestans*, выделенный из растений картофеля в Бирском районе Республики Башкортостан (Бирская опытная станция Башкирского НИИ сельского хозяйства, 55°25'47.4" N 55°35'49.9" E) и хранящийся в коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. Оценку агрессивности изолята *P. infestans* проводили по методике [7]. Патоген выращивали на картофельном агаре с декстрозой в течение 7 сут после повторного выделения из инфицированных мини-клубней картофеля для восстановления агрессивности патогена. Поверхность колоний изолята *P. infestans* заливали дистиллированной водой и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Концентрацию спорангиев оценивали с помощью камеры Фукса — Розенталя, суспензию спор разводили до титра 1×10^5 спор/мл.

Обработка растений. На 15 сут после прорастания растений часть из них опрыскивали суспензией из расчета 5 мл бактерий *B. subtilis* 26Д (10^8 клеток/мл) на 1 растение и смесью бактерий с СК (10^{-6} М), ЖАК (10^{-7} М) или СК (10^{-6} М) + ЖАК (10^{-7} М) [8, 9]. В контроле опрыскивали 5 мл дистиллированной воды на 1 растение. На 3 сут после инокуляции *B. subtilis* 26Д растения опрыскивали 5 мл 1×10^5 спор/мл суспензии *P. infestans*. В качестве контрольных использовали растения, не инокулированные бактериями и не инфицированные фитофторой, растущие в условиях оптимального полива (К) и в условиях засухи (Кз).

Дефицит влаги создавали за счет сокращения полива. Через 7 сут после заражения *P. infestans* (влажность почвы $40\% \pm 5$ от полной влагоемкости) [8] листья замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C для выделения белков. О развитии болезни судили по проценту пораженной площади от общей площади листовой пластинки (степень поражения) на 7 сут после заражения растений *P. infestans*. Листья фотографировали,

полученные изображения анализировали в компьютерной программе ImageJ (“NIH”, США).

Выделение белков. 450 мг листьев гомогенизировали в жидком азоте, ресуспендировали в 1 мл буферного раствора (0.7 М сахара, 0.5 М Перес-КОН, pH 7.5, 0.1 М KCl, 2% меркаптоэтанол, 1 мМ этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N, N, N', N'-тетрауксусная кислота, 1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 0.1 мМ ортованадат натрия) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Белки экстрагировали фенольным раствором по методике [10]. К 1 мл фенола, насыщенного трис-NCl, добавляли 1 мл образца белка, полученную смесь инкубировали при –20°C в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 3000 g. Белки из фенольной фазы осаждали четырехкратным объемом 0.1 М ацетата аммония в этаноле при –20°C в течение 10 ч.

Полученный осадок трижды промывали ацетатом аммония и растворяли в лизис-буфере (8 М мочевины, 2 М тиомочевина, 1% 3-[(3-холамидо-пропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (ЧАПС), 30 мМ дитиотреитол, 20 мМ трис, 0.3% раствор амфолитов). 125 мкл лизис-буфера с растворенным белком наносили на стрип для электрофокусирования.

Двумерный электрофорез. Разделение белков и анализ гелей проводили по методике [11] с модификациями. Изоэлектрическое фокусирование осуществляли на приборе Protean IEF (“Bio-Rad”, США). Для разделения белков по изоэлектрической точке использовали готовые 7-сантиметровые стрипы (“Bio-Rad”, США), диапазон pH 3–10. Перед фокусировкой проводили пассивную регидратацию в течение 12 ч при 20°C. Фокусировку проводили при напряжении 4000 В в течение 22 ч, затем напряжение поддерживали на уровне 500 В до конца процесса. После изоэлектрического фокусирования полоски выдерживали в течение 15 мин последовательно в растворах 2% ДТТ и 2.5% йодацетамида в буферных растворах с 25% глицерином, затем промывали в 25 мМ трис-глициновом буфере, pH 8.3.

Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Стрипы и белки-маркеры на фильтровальной бумаге помещали на полиакриламидный гель и проливали 1% раствором агарозы в трис-глициновом буферном растворе. Электрофорез проводили при напряжении 90–120 В, гели окрашивали 0.1% раствором кумасси G-250.

Изображения гелей анализировали в компьютерной программе ImageJ (“NIH”, США). Для количественного определения содержания белков использовали белки-маркеры молекулярных масс, количество которых в геле было стандартизировано.

Масс-спектрометрия. Идентификацию белков проводили на масс-спектрометре MALDI Bruker Ultraflex II. Триптический гидролиз белка в геле проводили в течение 18 ч при 37°C, останавливая добавлением 7 мкл 0.7% раствора трифторуксусной кислоты. Для масс-спектрметрического анализа непосредственно на мишени масс-спектрометра смешивали 0.5 мкл раствора гидролизованного образца и 0.5 мкл 10 мг/мл дигидроксibenзойной кислоты в 50% ацетонитриле и 0.7% трифторуксусной кислоты. Масс-спектры регистрировали в рефлекторном режиме суммированием сигналов, получаемых при 1000 лазерных импульсах.

При необходимости и возможности регистрировали спектры фрагментации отдельных пептидов (MS/MS) с использованием тандемной масс-спектрометрии LIFT [12]. Точность измерения моноизотопных масс – не хуже 70 м.д., точность измерения масс фрагментов – не хуже 1.5 Да. Идентификацию белков проводили с использованием сервиса MASCOT в базе данных белковых последовательностей SWISS-PROT и локального сервиса MASCOT с использованием данных, относящихся к изучаемым таксонам, депонированным в банк данных GenBank NCBI [13].

Статистическая обработка. Эксперименты включали 5 биологических повторностей для молекулярно-биохимических показателей и 15 – для физиологических показателей. На гистограмме показаны выборочные средние и их 95% доверительные интервалы. Различия исследуемых параметров анализировали с помощью теста Краскела – Уоллиса в программе Statistica 8 (Statsoft, США). Для определения степени сходства спектров белков листьев в различных вариантах опыта проводили кластерный анализ данных о содержании отдельных белков (евклидово расстояние, метод объединения групп – UPGMA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ развития возбудителя фитофтороза на листьях картофеля восприимчивого сорта Ранняя Роза выявил различия в скорости роста патогена между контролем и опытными вариантами (рис. 1). Обработка бактериями *B. subtilis*, особенно в сочетании с сигнальными молекулами, способствовала снижению степени пораженности растений патогеном при недостатке влаги. Так, в контрольном варианте степень пораженности листьев составила $64\% \pm 6$, а при предварительной обработке *B. subtilis*, в том числе в смеси с СК и ЖАК, пораженность листьев снижалась на 15–30% (рис. 1). Следует подчеркнуть, что наиболее эффективное действие на повышение устойчивости листьев к инфицированию *P. infestans* оказывала предобработка растений картофеля *B. subtilis* в сочетании с ЖАК (рис. 1, вар. 4). Ранее было показано, что об-

работка ЖАК и *B. subtilis* 26Д снижала развитие *P. infestans* на клубнях картофеля [14].

Вероятно, в условиях недостатка влаги в растениях картофеля в формирование защитного ответа к возбудителю фитофтороза под воздействием бактерий вовлекается жасмонатная сигнальная система, что согласуется с данными, полученными на пробирочных растениях *S. tuberosum* [15]. Известно, что в развитии ИСУ под действием ризосферных микроорганизмов вовлекается ЖАК и этилен [14], в результате чего изменяется экспрессия генов защитных белков растения.

Изменение протеома листьев S. tuberosum при обработке бактериями в сочетании с СК и ЖАК и инфицировании P. infestans на фоне засухи.

Одним из подходов к выявлению изменений экспрессии генов в растениях под воздействием обработки биопрепаратами и инфицирования патогенами может служить исследование протеома растительных тканей. Методом двумерного электрофореза белков листьев *S. tuberosum* было идентифицировано 14 белков, наличие которых в листьях различалось в зависимости от варианта опыта (рис. 2, табл. 1). Интересно отметить, что в условиях засухи и инфицирования происходило подавление экспрессии 12 белков. В то же время, у необработанных растений при засухе наблюдалось увеличение содержания белка с pI/MW 6.5/30 и значительное накопление белка с pI/MW 6.6/37. В случае инфицирования *P. infestans* в растениях проявлялись 2 белка с pI/MW 4/37 и 6/80 (табл.1).

Следует отметить, что все рассматриваемые белки являются конститутивными, т.е. постоянно присутствуют в тканях растений. При этом в ряде вариантов опыта те или иные белки не были выявлены в силу недостаточной чувствительности метода, в других вариантах — присутствовали в листьях в большей или меньшей концентрации. Таким образом, в условиях абиотического и биотического стресса, а также обработки *B. subtilis*, СК и ЖАК происходило усиление или подавление экспрессии различных белков, вовлеченных в реализацию устойчивости растений к исследуемым факторам внешней среды.

Согласно результатам кластерного анализа (рис. 3), обработка бактериями *B. subtilis* в условиях недостатка влаги наиболее существенно изменяла спектр белков листьев. В данном варианте опыта выявлялись в сравнительно высокой концентрации наибольшее количество белков и их изоформ (табл. 1). Также значительное количество белков в сравнительно высокой концентрации было выявлено в листьях контрольных растений в условиях нормальной влажности. Присутствие ря-

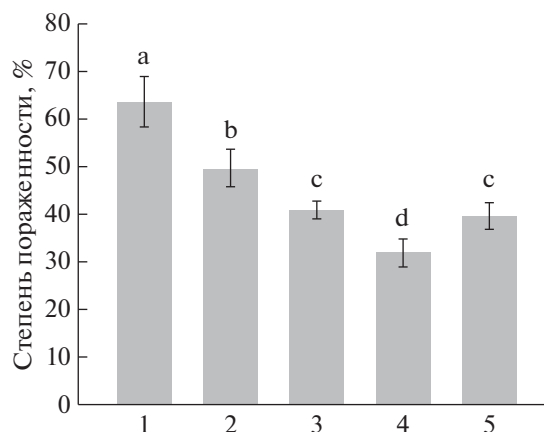


Рис. 1. Влияние обработки *B. subtilis* совместно с сигнальными молекулами на степень пораженности листьев картофеля *P. infestans* (%) в условиях засухи (а): 1 — контроль; 2 — *B. subtilis*; 3 — *B. subtilis* + СК; 4 — *B. subtilis* + ЖАК; 5 — *B. subtilis* + СК + ЖАК. Достоверно различающиеся значения обозначены разными буквами.

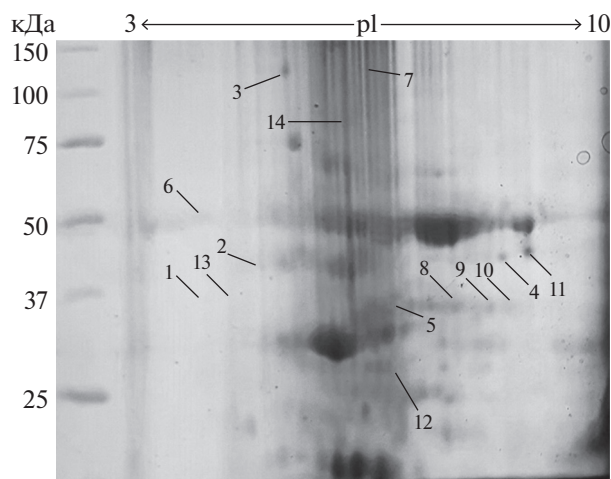


Рис. 2. Двумерный электрофорез белков листьев картофеля (контроль). Числами обозначено положение белков, содержание которых различалось в зависимости от варианта опыта.

да белков (pI/MW 6.5/100, 7.5/40, 8/40) проявлялось только в этих двух вариантах опыта.

Недостаток влаги также оказался одним из факторов, существенно изменяющих спектр растительных белков. Известно, что при недостатке влаги у картофеля изменяется транскрипционная активность множества генов, кодирующих белки теплового шока, сигнальные и регуляторные белки, причем для многих из них показана также связь с устойчивостью к патогенам [16]. В наших экспериментах недостаток влаги приводил к значительному повышению содержания белков с

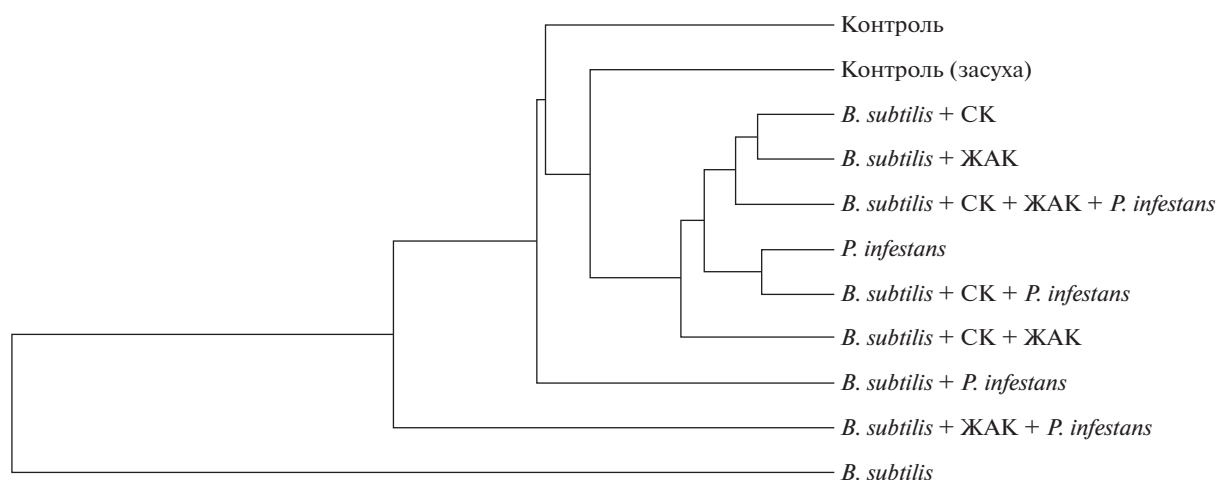


Рис. 3. Кластеризация вариантов опыта в соответствии с присутствием различных белков в листьях.

Таблица 1. Наличие и спектр белков в протеоме листьев картофеля при различных вариантах обработки растений

№	Название белка в соответствии с Uniprot	pI	М.м.	Mascot protein score	Содержание белка, мкг/г сырой массы										
					К	К ₃	Bs	Bs + СК	Bs + ЖАК	Bs + СК + ЖАК	Pi	Pi + Bs	Pi + Bs + СК	Pi + Bs + ЖАК	Pi + Bs + СК + ЖАК
1	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	4	37	146	—	—	10.8	1.8	2.9	0.8	8.3	1.7	4.6	9.7	0.1
2		5	37	83	—	—	18.9	2.0	2.4	—	—	9.1	—	—	—
3		5.5	125	126	7.5	—	7.6	—	—	—	—	11.3	—	—	—
4	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	8.5	45	141	5.0	—	5.7	0.3	—	—	—	—	—	—	—
5	Serine/threonine protein phosphatase	6.6	37	130	—	15.1	14.2	1.0	3.9	5.5	—	—	1.3	—	3.8
6	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	4	55	62	—	—	41.7	2.2	1.1	6.2	—	—	—	24.3	—
7	Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial	6.5	100	88	1.3	—	2.7	—	—	—	—	—	—	—	—
8	Aminomethyltransferase, mitochondrial	7.5	40	107	0.8	—	6.4	—	—	—	—	—	—	—	—
9		8	40	185	0.7	—	4.0	—	—	—	—	—	—	—	—
10		8.5	40	106	—	—	11.2	—	—	1.9	—	—	—	—	—
11		9	45	120	11.0	—	—	0.4	—	3.0	—	—	—	—	—
12	Sesquiterpene synthase	6.5	30	136	1.0	5.6	4.7	0.9	2.1	—	—	—	—	—	3.0
13	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	4.2	37	85	—	—	11.0	2.2	5.4	—	—	7.9	—	—	—
14	Chaperonin 20 kDa, chloroplastic-like	6	80	77	7.0	—	—	—	—	—	4.2	4.1	2.0	3.5	1.1

Примечание: К – контроль (нормальная влажность); К₃ – контроль (засуха, без обработки), Pi – заражение *P. infestans*, Bs – обработка *B. subtilis*, СК – салициловой кислотой, ЖАК – жасмоновой кислотой в условиях засухи. pI – изоэлектрическая точка, М.м. – молекулярная масса, кДа. Номера строк соответствуют обозначениям на рис. 2. “—” – белок присутствует в концентрации, недостаточной для выявления.

pI/MW 6.6/37 и 6.5/30. Остальные белки, присутствовавшие в высокой концентрации в контрольных растениях в условиях нормального увлажнения почвы, при недостатке влаги не выявлялись.

При сочетании *B. subtilis* с СК и ЖАК, как у здоровых, так и у инфицированных растений, спектр выявляемых белков сужался по сравнению с обработкой только бактериями при недостатке влаги (рис. 3, табл. 1). Одно из наиболее значительных отличий в спектре белков наблюдалось у зараженных *P. infestans* растений, обработанных *B. subtilis* в сочетании с ЖАК (рис. 3), что согласуется с максимальным снижением степени пораженности листьев картофеля (рис. 1, вар. 4). Для данного варианта опыта характерна высокая концентрация белка с pI/MW 4/37, предположительно, являющегося фосфорилированной изоформой хлоропластного белка-энхансера, а также белка с pI/MW 4/55 (Н-белка глицин-декарбоксилазного комплекса митохондрий), не выявлявшегося в других вариантах обработки и инфицирования *P. infestans*.

Известно, что воздействие бактерий на физиологические процессы в растениях за счет синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы индуцирует экспрессию генов, связанных с устойчивостью к патогенезу, и синтез множества защитных белков [4]. Можно предположить, что обработка растений бактериями в сочетании с сигнальными молекулами при инфицировании *P. infestans* и недостатке влаги приводила к активации сигнальных путей растений, модифицируя изменения в спектре белков, вызываемые эндофитными бактериями.

Как известно из литературных данных, ответ растений на абиотический и биотический стресс опосредуется сложной сетью сигнальных и метаболических путей, включающих рецепцию гормонов, МАРК-каскады, индукцию генов, синтез белков и низкомолекулярных соединений, причем многие из этих путей на данный момент являются гипотетическими [17]. В настоящем исследовании нами предпринята попытка раскрыть отдельные аспекты реализации ответа растений на заражение патогеном в условиях засухи, основываясь на изменениях содержания отдельных белков и их возможной роли в реализации устойчивости растений.

Среди белков, присутствие и содержание которых изменялось в зависимости от варианта обработки, можно условно выделить белки, вовлеченные в процессы окислительного взрыва, дыхания, синтеза защитных соединений.

Белки окислительного взрыва.

Во всех вариантах обработки, в отличие от контрольных растений, присутствовал белок хлоропластов, вовлеченный в генерацию АФК — выделя-

ющий кислород белок-энхансер (Oxygen-evolving enhancer protein 1, ОЕЕР, табл. 1, №№ 1, 2, 3). Наибольшее его содержание отмечено в растениях, обработанных *B. subtilis*, а также в инфицированных растениях, обработанных *B. subtilis* + ЖАК. Известно, что окислительный взрыв является сигналом для реакции сверхчувствительности, которая тесно связана с ответом растений на контакт с патогеном. Имеются данные о взаимосвязи белка окислительного взрыва RPH1 с устойчивостью *Arabidopsis thaliana* к *Phytophthora brassicae* и картофеля к *Phytophthora infestans* [18]. В растениях, обработанных *B. subtilis* + СК, данный белок присутствовал в меньшем количестве.

ОЕЕ1 и ОЕЕ2 являются важными членами комплекса, который участвует в фотоокислении воды во время световых реакций фотосинтеза. В наших исследованиях у контрольных растений присутствовала в значительном количестве лишь нефосфорилированная форма ОЕЕР (pI 5.5). В растениях, предобработанных *B. subtilis*, выявлялись различные изоформы ОЕЕР (pI 4; 5; 5.5), а при обработке бактериями в сочетании с сигнальными молекулами — только фосфорилированные (pI 4; 5), причем, как в инфицированных *P. infestans*, так и в неинфицированных растениях (табл. 1).

Считается, что комплекс белков-энхансеров проявляет высокую чувствительность к стрессу [19]. Ранее было показано увеличение содержания этих белков в 2.2–5.5 раз в листьях картофеля восприимчивого сорта в условиях засухи [18], а также незначительное уменьшение при заражении патогеном [20], что согласуется с нашими данными.

В белковой последовательности ОЕЕР имеются многочисленные сайты фосфорилирования [21], что предполагает его участие в регуляции активности различных ферментов. Таким образом, сочетание эндофитных бактерий *B. subtilis* с сигнальными молекулами СК и ЖАК позволяет индуцировать в растениях картофеля активность ОЕЕР, интенсифицируя процессы, в которые они вовлечены.

Митохондриальная сериновая гидроксиметилтрансфераза (Serine hydroxymethyltransferase, SHMT, табл. 1, № 4), один из ферментов дыхания растений, является белком, нейтрализующим последствия СВЧ-реакции [22]. Известна ее связь с устойчивостью растений к патогенам и абиотическим стрессам. В наших опытах она присутствовала в значительном количестве в контрольных растениях, при засухе — в незараженных растениях, обработанных *B. subtilis*, и, в значительно меньшем количестве — при обработке бактериями совместно с СК.

Показана связь SHMT с уменьшением выраженности симптомов биотрофного (*Pseudomonas syringae*) и некротрофного (*Alternaria brassicicola*)

поражения *Arabidopsis thaliana*, а также повреждение клеток, вызываемых абиотическими стрессами — ярким светом и засолением [22]. Также описана ее связь с холодоустойчивостью риса [23] и устойчивостью к нематодам соевых бобов [24]. Известно, что SHMT взаимодействует с α - и β -субъединицами АТФ-синтазы, белком теплового шока Hsp70, белком семейства митохондриальных субстратов-носителей, аскорбатпероксидазой 1. По современным представлениям, данные взаимодействия в конечном итоге приводят к минимизации образования АФК, в частности, пероксида водорода, в хлоропластах и уменьшению степени их окислительного повреждения. Более того, хотя генерация АФК является важным компонентом защитной СВЧ-реакции против инфицирования патогенами, чрезмерное накопление АФК снижает эффективность защитного ответа растений [22].

Отсутствие значимых количеств SHMT в растениях картофеля при заражении фитофторой в наших экспериментах можно рассматривать как проявление СВЧ-реакции на заражение. Следует отметить, что подобного же эффекта (относительно данного белка) в неинфицированных растениях на фоне засухи позволяет достичь предобработка растений *B. subtilis* в сочетании с ЖАК, что демонстрирует один из путей сигнальной регуляции устойчивости растений.

Еще один белок, вовлеченный в СВЧ-реакцию, регуляцию активности ферментов и сигнальные пути, активирующиеся при биотическом стрессе [25], серин-треониновая протеин-фосфатаза (Serine/threonine protein phosphatase, табл. 1, № 5), накапливался в большом количестве в здоровых неинфицированных растениях при засухе и в неинфицированных растениях, обработанных *B. subtilis*. При обработке бактериями в сочетании с сигнальными молекулами, а также при заражении фитофторой присутствие протеин-фосфатазы существенно снижалось, от 3 до 15 раз, или не проявлялось вовсе. В целом, сочетание бактерий с сигнальными молекулами оказывало разнонаправленный эффект на содержание этого белка в инфицированных растениях на фоне засухи.

Протеин-фосфатаза считается важнейшим компонентом, контролирующим защитные реакции у различных видов растений. Генетические, протеомные и метаболомные исследования подчеркнули универсальную природу протеин-фосфатазы как регулятора передачи сигналов рецепторов и органелл, экспрессии генов, метаболических путей и гибели клеток, оказывающих существенное влияние на иммунитет растений [17].

Существует по меньшей мере три различных пути развития СВЧ-реакции, в которые вовлечены сигнальные молекулы (СК, ЖАК, этилен), МАРК-каскады, экспрессия генов ядерной ДНК, а также гомологи оксидаз окислительного взрыва

(respiratory burst oxidase homologs, РВОН) — мембранные ферменты, катализирующие превращение кислорода в супероксид-анион с использованием НАДФН в качестве донора электронов. Все известные пути развития СВЧ-реакции включают инактивацию серин-треониновых протеин-фосфатаз.

В наших экспериментах при заражении фитофторой наблюдалось блокирование этого фермента, что, по-видимому, является одним из механизмов развития СВЧ-реакции. В здоровых растениях в условиях засухи наблюдалось высокое содержание этого белка, несущественно снижавшееся при обработке бактериями и значительно — при обработке *B. subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами, особенно с ЖАК. Наблюдаемое разнонаправленное изменение содержания протеин-фосфатазы в зависимости от вариантов экспериментов, по-видимому, является проявлением комплексности процессов активации ее синтеза и множественности ее функций.

Таким образом, в условиях абиотического стресса обработка бактериями, через жасмонат- и салицилат-опосредованные сигнальные пути, активирует СВЧ-реакцию, связанную с ответом на внедрение микроорганизмов в растение. Вероятно, множественность путей активации обуславливает стабильность данного ответа как в инфицированных, так и в неинфицированных растениях, растущих в условиях недостатка влаги.

Белки энергетического обмена.

В зараженных *P. infestans* растениях, предобработанных *B. subtilis* в сочетании с ЖАК, наблюдалось крайне высокое (более 20 мкг/г массы) содержание Н-белка глицин-декарбоксилазного комплекса митохондрий (Glycine cleavage system Н protein, табл. 1, № 6). Известно, что повышенная экспрессия данного белка в генетически-трансформированных растениях табака [26] вызывает интенсификацию процессов фотосинтеза и накопление биомассы, перераспределение углерода между растворимыми углеводами и крахмалом, а также изменяет липоилирование ферментов пируватдегидрогеназы и альфа-кетоглутаратных комплексов. Глицин-декарбоксилазный комплекс (glycine cleavage system, GCS) является важнейшим путем деградации глицина до углекислого газа, аммония и метиленовой группы у растений, животных и бактерий [27]. GCS также способен катализировать обратимую реакцию синтеза глицина с использованием НАДФ.

Интересно, что данный белок присутствовал в зараженных *P. infestans* растениях, предобработанных *B. subtilis* совместно с ЖАК, но не выявлялся в других вариантах опыта с зараженными растениями, как и в контроле, однако присутствовал в значительно большем количестве в неинфицирован-

ных растениях, обработанных *B. subtilis*. По-видимому, обработка бактериями в условиях недостатка влаги вызывает жасмонат-опосредованную активацию экспрессии данного белка, которая блокируется при поражении фитопатогеном. Выявленная способность комплекса *B. subtilis* + ЖАК индуцировать данный защитный механизм коррелирует с повышением устойчивости листьев картофеля к поражению *P. infestans* при дефиците почвенной влаги (рис. 1).

Митохондриальная глицин-дегидрогеназа – декрбоксилаза (Glycine dehydrogenase (decarboxylating), GDC, табл. 1, № 7) является одним из ключевых ферментов дыхания растений. Митохондриальная мультиферментная глициндекарбоксилаза катализирует тетрагидрофолатзависимое превращение глицина с образованием 5,10-метилентетрагидрофолата и побочных продуктов NADH, CO₂ и NH₃. Эта реакция является частью фотореспираторного цикла одноуглеродного метаболизма [28]. Известно, что активность данного фермента может подавляться бактериальными молекулами – элиситорами семейства харпинов через индукцию образования АФК и NO, причем, оксид азота способен модулировать активность GDC путем нитрозилирования остатков цистеина. Бактериальное подавление активности GDC и последующая цепь реакций приводит к окислительному взрыву и запрограммированной гибели клеток растения-хозяина [29]. В наших экспериментах данный белок присутствовал в листьях контрольных растений, а при недостатке влаги – в неинфицированных растениях, обработанных *B. subtilis*.

Митохондриальная аминотрансфераза (табл. 1, №№ 8, 9, 10, 11) также является частью глицин-декрбоксилазного комплекса. Показана вовлеченность данного фермента в процессы энергетического обмена, активирующиеся в растениях в условиях засухи, а также в повышение устойчивости растений к абиотическим стрессам [30]. В наших экспериментах данный белок был представлен четырьмя изоформами, присутствовавшими только в неинфицированных растениях. Согласно информации, содержащейся в биологических банках данных [<https://www.uniprot.org/uniprot/P48728>], изоформы митохондриальной аминотрансферазы различаются по аминокислотной последовательности и образуются за счет отсутствия отдельных участков полипептидной цепи по сравнению с канонической последовательностью, характеризующейся наибольшей молекулярной массой (44 кДа). Расчет значений изоэлектрических точек, проведенный нами, показал, что изоформа 9/44 в наших экспериментах присутствует в немодифицированной форме, тогда как более низкие значения изоэлектрической точки у других изоформ не могут быть объяснены только отличиями в аминокислотной последовательности. Согласно данным [[\[teinAction.action?id=1285601\]\(#\)\], у митохондриальной аминотрансферазы имеется несколько сайтов фосфорилирования в N-концевой области молекулы, а также сайты ацетилирования в C-концевой области.](https://www.phosphosite.org/pro-</p></div><div data-bbox=)

Активированные формы аминотрансферазы, как и глицин-дегидрогеназа, были выявлены в протеоме листьев неинфицированных растений, обработанных *B. subtilis*. В инфицированных растениях, предобработанных бактериями *B. subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами, данные изоформы практически полностью отсутствовали (табл. 1). В то же время, изоформа без фосфорилирования или ацетилирования, напротив, присутствовала в вариантах с обработкой *B. subtilis* + СК и *B. subtilis* + СК + ЖАК. По-видимому, обработка растений бактериями индуцирует процессы синтеза и активации этого фермента, воздействие сигнальных молекул подавляет образование его активных изоформ, а заражение фитотрофой – синтез любых изоформ.

Защитные белки.

Одним из белков, содержание которого значительно варьировало в различных вариантах опыта, была сесквитерпен-синтаза (табл. 1, № 12) – фермент синтеза вторичных метаболитов, выполняющих защитную функцию в растениях. Имеются многочисленные литературные данные о связи активности данного фермента с устойчивостью растений к патогенам и фитофагам [31]. Сесквитерпены способны ингибировать прорастание спор патогенов. При воздействии организмов-фитофагов в растениях, как правило, синтезируются новые, не конститутивные, формы терпеноидов, которые играют многочисленные функциональные роли в первичном и вторичном метаболизме [32]. Показано, что экспрессия генов терпенсинтаз в листьях картофеля усиливалась в ответ как на бактериальную (*Pseudomonas syringae*), так и на грибковую (*Alternaria solani*) инфекцию, а также на обработку метилжасмонатом [33].

Наибольшее содержание сесквитерпен-синтазы в условиях засухи отмечено в необработанных и в неинфицированных растениях, обработка бактериями незначительно его снижала, а сочетание *B. subtilis* с сигнальными молекулами, как и заражение фитопатогеном, приводило к значительному снижению или полному отсутствию. Очевидно, что синтез вторичных метаболитов является одним из главных конститутивных и неспецифических механизмов устойчивости растений к биотическим стрессам, и, по-видимому, у фитотрофы имеется мощный механизм его подавления.

Основным индуктором синтеза терпеноидов в растениях является жасмоновая кислота, регулирующая транскрипцию множества генов, вовле-

ченных в синтез вторичных метаболитов [34]. Салициловую кислоту обычно не рассматривают как индуктор синтеза терпеноидов, однако в наших экспериментах лишь совместная обработка растений *B. subtilis* + СК + ЖАК приводила к значимому повышению количества сесквитерпеноидов в растениях. Показано, что СК-регулируемые гены оказывают влияние на активность антиоксидантных ферментов и содержание эндогенных гормонов, стимулируя биосинтез терпеновых трилактонов *Ginkgo biloba* L. с вовлечением путей системной приобретенной устойчивости в этот процесс [35].

Митохондриальный компонент, восстанавливающий амидоксим (Mitochondrial amidoxime reducing component 2, mARK, табл. 1, № 13) относится к ферментам электрон-транспортной цепи и катализирует реакции восстановления N-гидроксильрованных соединений. Описана его защитная роль, заключающаяся в нейтрализации токсичных и мутагенных азотистых оснований [36]. mARK способен оказывать влияние на энергетические пути, также показано его участие в защите клеток от апоптотических эффектов [37]. Роль данного белка в реализации устойчивости растений в настоящее время не описана. В наших экспериментах mARK присутствовал в значительном количестве в растениях, обработанных *B. subtilis*, в том числе при заражении фитофторой. В неинфицированных растениях картофеля, предобработанных смесью *B. subtilis* с сигнальными молекулами, его содержание значительно снижалось, и совсем не проявлялось при последующем заражении фитофторой. Механизм защитного действия mARK в растениях, а также пути его регуляции, предстоит выяснить в более детальных экспериментах.

Во всех растениях, зараженных *P. infestans*, в отличие от незараженных растений, нами был выявлен **хлоропластный 20 кДа-шаперонин** (табл. 1, № 14), относящийся к группе HSP-подобных белков. Типичным представителем шаперонинов в растениях является Сrp-10 (10 кДа). 20 кДа-шаперонин представляет собой два tandemных Сrp10-подобных повтора, соединенных “головой к хвосту”, и имеет повторяющиеся участки последовательности в областях, соответственно, 50–150 и 150–250 аминокислотных остатков [https://www.uniprot.org/uniprot/Q8LK52]. Шаперонины хлоропластов представляют собой структурно- и функционально-разнообразную и гибкую систему, способную адаптироваться к конкретным субстратам при различных внешних условиях посредством регуляции как на трансляционном, так и на посттрансляционном уровнях [38]. Одним из механизмов такой адаптации, характерным для хлоропластов, является образование гетеро-олигомеров шаперонинов [39]. Это делает шаперонины способными работать не только с растительными белками, но и с белками симбионтов или

патогенов растений. Также имеются данные о связи шаперонинов с увеличением активности супероксиддисмутазы (СОД) [https://www.uniprot.org/uniprot/Q8LK52].

Многочисленные литературные данные [40] свидетельствуют об исключительной важности шаперонинов для развития инфекционного процесса, вызываемого бактериями или патогенными грибами. По-видимому, повышенное содержание шаперонина в экспериментальных растениях является проявлением успешного развития патогена и демонстрирует восприимчивость растений к патогенезу. Предобработка зараженных растений *B. subtilis* не приводила к заметному изменению содержания данного белка, тогда как совместная обработка бактериями и сигнальными молекулами (особенно в сочетании СК + ЖАК) существенно снижала его количество, способствуя повышению устойчивости растений.

Таким образом, протеомный анализ листьев картофеля при обработке эндофитными бактериями *B. subtilis* в сочетании с салициловой и жасмоновой кислотами, инфицировании *P. infestans* и недостатке влаги выявил изменения в содержании белков, вовлеченных в синтез защитных соединений, нейтрализацию токсичных веществ, процессы энергетического обмена, СВЧ-реакцию и другие процессы, оказывающие влияние на устойчивость растений к абиотическому и биотическому стрессу. Показано, что содержание ряда белков регулируется действием бактерий, сигнальных молекул, патогеном *P. infestans* или сочетанием перечисленных факторов. В то же время, для части исследованных белков показана разнонаправленность воздействия факторов на исследованные белки, что требует более детальных исследований в этой области для разработки эффективных и экологически-безопасных подходов к комплексной защите культурных растений от абиотических и биотических стрессов.

Работа выполнялась частично по теме Государственного задания (№ гос. 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, с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Протеом человека” (ИБМХ).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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 im-

- pect for crop improvement. In: Singh D.P., Singh H.B., Prabha R. (eds.). Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives. Singapore: Springer. 2017. P. 543.
2. Burton W.G. Challenges for stress physiology in potato // Am. Potato J. 1981. V. 58. P. 3.
 3. Coleman-Derr D., Tringe S.G. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance // Front Microbiol. 2014. V. 5. P. 283. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00283>
 4. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biot. 2009. V. 84. P. 11. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
 5. Burkhanova G.F., Veselova S.V., Sorokan A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 346. <https://doi.org/10.18699/VJ19.561>
 6. 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. <https://doi.org/10.1038/ng.798>
 7. Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Малюченко О.П., Алексеев Я.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Фитопатологическая и молекулярная характеристика изолятов *Phytophthora infestans*, собранных с устойчивых и восприимчивых генотипов картофеля // Микол. фитопатол. 2016. Т. 50. № 3. С. 175.
 8. Batool T., Ali S., Seleiman M.F., Naveed N.H., Ali A., Ahmed K., Abid M., Rizwan M., Shahid M.R., Alotaibi M., Al-Ashkar I., Mubushar M. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>
 9. Vasyukova N.I., Chalenko G.I., Gerasimova N.G., Valueva T.A., Ozeretskovskaya O.L. Activation of elicitor defensive properties by systemic signal molecules during the interaction between potato and the late blight agent // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. V. 44. P. 213. <https://doi.org/10.1007/s10438-008-2015-x>
 10. Vincent D., Wheatley M., Cramer G. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry // Electrophoresis. 2006. V. 27. P. 1853. <https://doi.org/10.1002/elps.200500698>
 11. Fedina E.O., Karimova F.G., Tarchevsky I.A., Toropygin I.Y., Khrupach V.A. Effect of epibrassinolide on tyrosine phosphorylation of the Calvin cycle enzymes // Rus. J. Plant Phys. 2008. V. 55. P. 193. <https://doi.org/10.1007/s11183-008-2005-0>
 12. Suckau D., Resemann A., Schuerenberg M., Hufnagel P., Franzen J., Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 376. P. 952. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2057-0>
 13. Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // Electrophoresis. 1999. V. 20. P. 3551. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991201\)20](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20)
 14. Yarullina L.G., Kasimova R.I., Ibragimov R.I., Akhatova A.R., Umarov I.A., Maksimov I.V. 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>
 15. 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 Phys. 2011. V. 52. P. 299. <https://doi.org/10.1134/S1021443711010109>
 16. Gervais T., Creelman A., Li X., Bizimungu B., De Koeber D., Dahal K. Potato response to drought stress: physiological and growth basis // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 1360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.698060>
 17. Máthé C., Garda T., Freytag C., M-Hamvas M. The Role of serine-threonine protein phosphatase PP2A in plant oxidative stress signaling—facts and hypotheses // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. Article 3028. <https://doi.org/10.3390/ijms20123028>
 18. Belhaj K., Lin B., Mauch F. The chloroplast protein RPH1 plays a role in the immune response of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae* // Plant J. 2009. V. 58. P. 278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03779.x>
 19. Zdražník T., Moen A., Šuštar-Vozlič J. Chloroplast proteins involved in drought stress response in selected cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // 3 Biotech. 2019. V. 9. Article 331. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1862-x>
 20. Li D., Feng Y., Lu Q., Yan D., Liu Z., Zhang X. Comparative proteomic analysis of plant – pathogen interactions in resistant and susceptible poplar ecotypes infected with *Botryosphaeria dothidea* // Phytopathology. 2019. V. 109. P. 2009. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0452-R>
 21. Ali A., Goswami S., Kumar R.R., Singh K., Singh J.P., Kumar A., Sakhrey A., Ra G.K., Praveen S. Wheat oxygen evolving enhancer protein: identification and characterization of Mn-binding metalloprotein of photosynthetic pathway involved in regulating photosystem II integrity and network of antioxidant enzymes under heat stress // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2018. V. 7. P. 177. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.02>
 22. Moreno J.I., Martin R., Castresana C. Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress // Plant J. 2005. V. 41. P. 451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02311.x>
 23. Fang C., Zhang P., Li L. Serine hydroxymethyltransferase localised in the endoplasmic reticulum plays a role in scavenging H₂O₂ to enhance rice chilling tolerance // BMC Plant Biol. 2020. V. 20. Article 236. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02446-9>

24. Kandoth P.K., Liu S., Prenger E., Ludwig A., Lakhssassi N., Heinz R., Zhou Z., Howland A., Gunther J., Eidson S., Dhroso A., LaFayette P., Tucker D., Johnson S., Anderson J., Alaswad A., et al. Systematic mutagenesis of serine hydroxymethyltransferase reveals an essential role in nematode resistance // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 1370.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00553>
25. Durian G., Rahikainen M., Alegre S., Brosché M., Kangasjärvi S. Protein phosphatase 2A in the regulatory network underlying biotic stress resistance in plants // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Article 812.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00812>
26. López-Calcagno P.E., Fisk S., Brown K.L., Bull S.E., South P.F., Raines C.A. Overexpressing the H-protein of the glycine cleavage system increases biomass yield in glasshouse and field-grown transgenic tobacco plants // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 141.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12953>
27. Zhang X., Li M., Xu Y., Ren J., Zeng A.-P. Quantitative study of H protein lipoylation of the glycine cleavage system and a strategy to increase its activity by co-expression of LplA // *J. Biol. Eng.* 2019. V. 13. Article 32.
<https://doi.org/10.1186/s13036-019-0164-5>
28. Engel N., van den Daele K., Kolukisaoglu U., Morgenthal K., Weckwerth W., Parnik T., Keerberg O., Bauwe H. Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions // *Plant Physiol.* 2007. V. 144. P. 1328.
<https://doi.org/10.1104/pp.107.099317>
29. Palmieri M.C., Lindermayr C., Bauwe H., Steinhauser C., Durner J. Regulation of plant glycine decarboxylase by s-nitrosylation and glutathionylation // *Plant Physiol.* 2010. V. 152. P. 1514.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.152579>
30. Merewitz E.B., Gianfagna T., Huang B. Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 5311.
<https://doi.org/10.1093/jxb/err166>
31. Pu Q., Liang J., Shen Q., Fu J., Pu Z., Liu J., Wang X., Wang Q. A Wheat β -patchoulene synthase confers resistance against herbivory in transgenic *Arabidopsis* // *Genes.* 2019. V. 10. Article 441.
<https://doi.org/10.3390/genes10060441>
32. Liu G., Yang M., Fu J. Identification and characterization of two sesquiterpene synthase genes involved in volatile-mediated defense in tea plant (*Camellia sinensis*) // *Plant Physiol. Biochem.* 2020. V. 155. P. 650.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.004>
33. Dwivedi V., Rao S., Bomzan D.P., Kumar S.R., Shanmugam P.V., Olsson S.B., Nagegowda D.A. Functional characterization of a defense-responsive bulnesol/elemol synthase from potato // *Physiol. Plant.* 2021. V. 171. P. 7.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13199>
34. Singh B., Sharma R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications // *3 Biotech.* 2015. V. 5. P. 129.
<https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2>
35. Ye J., Mao D., Cheng S., Zhang X., Tan J., Zheng J., Xu F. Comparative transcriptome analysis reveals the potential stimulatory mechanism of terpene trilactone biosynthesis by exogenous salicylic acid in *Ginkgo biloba* // *Industrial Crops and Products.* 2020. V. 145. Article 112104.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112104>
36. Rixen S., Havemeyer A., Tyl-Bielicka A., Pysniak K., Gajewska M., Kulecka M., Ostrowski J., Mikula M., Clement B. Mitochondrial amidoxime-reducing component 2 (MARC2) has a significant role in N-reductive activity and energy metabolism // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. P. 17593.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007606>
37. Pliżko B., Havemeyer A., Kunze T., Clement B. The pivotal role of the mitochondrial amidoxime reducing component 2 in protecting human cells against apoptotic effects of the base analog N6-hydroxylaminopurine // *Cell biology.* 2015. V. 290. P. 10126.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640052>
38. Zhao Q., Liu C. Chloroplast chaperonin: an intricate protein folding machine for photosynthesis // *Front. Mol. Biosci.* 2018. V. 4. Article 98.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00098>
39. Tsai Y.C., Mueller-Cajar O., Saschenbrecker S., Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Chaperonin cofactors, Cpn10 and Cpn20, of green algae and plants function as hetero-oligomeric ring complexes // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 20471.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365411>
40. Ranford J.C., Henderson B. Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments // *Mol. Pathol.* 2002. V. 55. P. 209.
<https://doi.org/10.1136/mp.55.4.209>