



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ЛИПОПЕПТИДЫ ЭНДОФИТОВ И ФИТОИММУНИТЕТ: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Максимов И.В., Черепанова Е.А.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, пр. Октября, 71, Уфа, 450054, Россия

Резюме

В сообщении обсуждаются механизмы регуляции иммунных процессов в растениях с участием стимулирующих рост растений эндофитных штаммов бактерий. Обсуждаются механизмы влияния липопептидов, секретируемых бактериями-эндосимбионтами растений на защитные сигнальные пути растений. Развитие механизма прайминга в тканях растений под влиянием липопептидов бактерий в связке с их прямыми противомикробными свойствами позволяют использовать активные штаммы для создания современных биопрепаратов для защиты растений от вредных организмов и стимулирования продуктивных свойств.

Ключевые слова: растения, системная индуцированная устойчивость (СИУ), эндофитные микроорганизмы, биопрепараты

Цитирование - Максимов И.В., Черепанова Е.А. Липопептиды эндофитов и фитоиммунитет: перспективы практического использования. *Биомика*. 2018. 10(1). С. 57-61. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-13

LIPOPEPTIDES OF ENDOPHYTES AND PHYTOIMMUNITY: PROSPECTS FOR PRACTICAL USE

Maksimov I.V., Cherepanova E.A.

Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia

Resume

In the report, the mechanisms of regulation of immune processes in plants with participation of endophytic strains of the bacteria stimulating growth of plants are considered. The mechanisms of effect of the endophytic bacteria lipopeptides on the protective signaling pathway of plants are discuss. The mechanisms of the effect of the lipopeptides secreted by bacterial endophytes on signaling pathway of plant defence mechanisms. The mechanism of priming in plant tissues under the influence of bacteria lipopeptides and their direct antimicrobial properties make it possible to use active strains to create modern biological products to protect plants from pathogens and stimulate productive properties.

Keys words: plants, systemic acquired resistance (SAR), endophytes, biopesticides

Citation - Maksimov I.V., Cherepanova E.A. Lipopeptides of endophytes and phytoimmunity: prospects for practical use. *Biomics*. 2018. 10(1). P. 57-61. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-13 [In Russian]

Химические средства защиты растений пока главный инструмент в фитозащитных мероприятиях. Их эффективность достаточно высока, но существуют проблемы экологического характера, включающие формирование устойчивых к ним патогенов, накопление в окружающей среде вследствие низкой биоразлагаемости и высокую токсичность для высших организмов (Bassil et al., 2007). Этим проблемам можно избежать путем создания средств защиты растений (СЗР), индуцирующих фитоиммунитет (Yakhin et al., 2017), а также на основе технологий РНК-интерференции и активного геномного редактирования (Ji et al., 2015; Zhang et al., 2016). Другим подходом к защите растений может быть подбор штаммов микроорганизмов, характеризующихся антагонизмом к вредным организмам и вызывающим у них болезни. Уникальной составляющей биологических СЗР могут стать эндофиты - микроорганизмы, определяемые как «способные жить в тканях растений, не вызывая у них болезней» (Compant et al., 2016; Socq et al., 2017). Создание таких СЗР позволяет в перспективе снизить число фитозащитных мероприятий. Yang (2013) показал, что обработка хлопчатника композицией штаммов *Paenibacillus xylanilyticus*, *Paenibacillus polymyxa* и *Bacillus subtilis* была более эффективна против патогена *Verticillium dahliae*, чем их действие по отдельности. Хороший результат также дала обработка растений банана композицией штаммов *P. fluorescens* Pf1, *Bacillus* sp. EPB10 и *Bacillus* sp. EPB56, снижающая пораженность грибом *F. oxysporum* на 18,5% (Kavino et al., 2016).

К сожалению, на рынке СЗР число препаратов на основе эндофитных штаммов ограничено и используются они не достаточно широко, особенно в России (Михайликова, Стребкова, 2015). Так, фитозащитные свойства доказаны для штамма *B. subtilis* 26Д основы препарата Фитоспорин-М (Башинком, Россия), для *Bacillus amyloliquefaciens* FSB-24 - RhizoPlus (AbiTer GmbH, ФРГ) и Taegro (Novozyme, Дания), *B. amyloliquefaciens* IN937a - BioYield® (Gustafson, США), *B. pumilus* QST 2808 - Ballad+ (AgraQuest Inc., USA). Некоторые производители для усиления фитозащитных свойств биопрепаратов используют смеси бактериальных штаммов: *B. subtilis* GB03, *B. licheniformis* and *B. megaterium* – в препарате Companion (Growth Products Ltd, США); *B. nigrum* 132, *B. subtilis* MBI600 и *Bradyrhizobium japonicum* – в препаратах Бактрил (Биофарматек, Россия), SPHiStick N/T, Sublitez, Pro-Mix (Becker Underwood, США и Premier Horticulture Inc., Канада) (Maksimov, Khairullin, 2016).

Эндофиты производят широкий спектр биологически активных молекул, таких, как

сидерофоры, биосурфактанты, цианистый водород, гидролазы, повышающих их конкуренцию с патогенами ради подходящей ниши для колонизации. Как только учёные обнаружили, что ряд бактерий, в том числе *B. subtilis*, способны синтезировать поверхностно-активные вещества (биосурфактанты), они стали активно исследовать их природу. Так был открыт новый класс биологически активных молекул – липопептиды, представляющие собой циклические низкомолекулярные соединения пептидной природы с жирнокислотным компонентом. В 1949 году впервые был детально описан липопептид полимиксин А из *Bacillus polymyxa* (Jones, 1949). Jones в том же году показал как наиболее эффективный продуцент биосурфактантов штамм *B. subtilis* IAM1213 (Baindara, Korpole, 2016). С тех пор многие исследователи начали детально изучать липопептиды, выделяя их и из других штаммов рода *Bacillus*, а также актиномицетов и грибов. Преимущество эндофитных штаммов бактерий, способных к синтезу липопептидов, перед синтетическими аналогами состоит в том, что такие препараты быстро биodeградируют, экологически безопасны, высокостабильны в широком диапазоне рН и температуры. Это обуславливает перспективность их применения в медицине, сельском хозяйстве, нефтехимии и рекультивации земель (Rodrigues et al., 2006).

Молекулы известных липопептидов содержат от 4 до 16 аминокислотных остатков; пептидные цепи линейные, циклические или смешанного строения. Аминокислотные остатки имеют L- или D-конфигурацию (Ongena et al., 2005). В зависимости от аминокислотной последовательности и ответвлений жирных кислот, липопептиды принято подразделять на три класса: 1) итурины (итурин А, микосубтилин и бацилломицин); 2) фенгицины (в том числе пипастатин); 3) сурфактины.

Липопептиды обладают определенной антибиотической избирательностью. Так, если сурфактин характеризуется главным образом антибактериальными и противовирусными свойствами, то итурин и фенгицин - антифунгальной (Falardeau et al., 2013; Jasim et al., 2016). Исследователями отмечается подавление развития гриба *Fusarium oxysporum* бактериями *B. subtilis* GM5, обусловленное присутствием липопептидов – сурфактина и фенгицина - на стадиях прорастания спор, формирования ростковых трубок и ветвления гиф, аномальное их развитие (Mardanov et al., 2017). Есть работы, свидетельствующие об усилении антифунгальной активности при синергичном влиянии фенгицина и микосубтилина (Mihalache et al., 2017).

Антибиотические способности липопептидов связывают с их способностью образовывать в водных средах мицеллы и мембранотропными свойствами этих амфифильных молекул, вызывающими нарушение нормального функционирования мембран вследствие их интеграции в липидный бислой и формированием в мембранах пор (Aranda et al. 2005; Falardeau et al., 2013), но есть данные о том, что они могут активировать экспрессию некоторых защитных генов в крайне низких концентрациях. Так, фенгицины в культуре растительных клеток индуцировали компоненты фенилпропаноидного пути (Dixon et al., 2002), а сурфактины активную генерацию перекиси водорода (Garcia-Gutierrez et al., 2013) и ряд компонентов оксипиновой сигнальной защитной системы от патогенов (Cawoy et al., 2015; Rahman et al., 2016). Штаммы *B.subtilis*, продуцирующие итурин и фенгицин, кроме того индуцировали в растениях экспрессию генов фенилпропаноидного метаболизма, запуская механизмы СИУ, например, против некротрофов (Falardeau et al., 2013), а сурфактин вызывал зависимое от ионов Ca^{2+} подщелачивание среды и накопление активных форм кислорода (АФК). Эти данные предполагают, что путь системной приобретённой устойчивости (СПУ), связанный с генерацией АФК и запускающийся салициловой кислотой, также может быть вовлечен в механизмы индукции защитной системы, опосредованный липопептидами. Штамм *B.subtilis* 168 – продуцент сурфактина и фенгицина усиливал устойчивость растений томатов и фасоли к *B. cinerea*, посредством активации ферментов липоксигеназного пути (Ongena et al., 2010), ответственных за синтез важной молекулы, регулирующей СИУ – жасмоновой кислоты (ЖК) Сурфактин индуцировал СИУ в растениях фасоли, дыни, томата, табака и винограда, тогда как фенгицин – защитный ответ у картофеля, томатов и табака (Farace et al., 2015). Обработка корней томатов массетолоидом А из *P.fluorescens* повышала устойчивость листьев растений к оомицету *Phytophthora infestans* (Tran et al., 2007). Штамм *B.amyloliquefaciens*, продуцирующий сурфактин, индуцировал СИУ в растениях рапса против *Botrytis cinerea* (Sarosh et al. 2009), также, как и *B.amyloliquefaciens* FZB42 индуцировал СИУ в растениях латука против *R.solani* через ЖК/этилен-зависимый сигнальный защитный путь индукции экспрессии гена PDF 1.2 (Chowdhury et al., 2015). Обнаружено, что микосубтилин запускает защитные реакции у растений винограда (Farace et al., 2015). Вместе с тем, рекомбинантные штаммы *B.amyloliquefaciens* FZB42, дефицитные по синтезу сурфактина (CH1), а также по синтезу сурфактина, фенгицина и бацилломицина Д (CH5) теряли

способность повышать устойчивость растений салата к ризоктониозу (Chowdhury et al., 2015). Показано, что штамм *B.subtilis* BBG111 индуцирует СИУ к *R.solani* в ризосфере риса, по меньшей мере, благодаря секреции фенгицина и сурфактина, тем самым вызывая реакцию сверхчувствительности и гибель клеток, причем иммунные реакции развиваются по ЖК/этилен-, АБК- и ауксин-зависимым сигнальным путям, что блокирует рост и развитие патогена на ранней стадии патогенеза (Chandler et al., 2015).

Будущие исследования должны обеспечить дополнительное понимание тонких механизмов, с помощью которых липопептиды взаимодействуют с клетками растений, дополнительно поясняя дифференциальную их эффективность. Так, использование геномного шаффлинга Zhang с сотрудниками (2016) позволило получить штамм эндофитной бактерии *B. amyloliquefaciens* FMB72. синтезирующий в 8,3 раз больше фенгицина, чем исходный штамм *B. amyloliquefaciens* ES-2-4, выделенный из шлемника *S. baicalensis* Georgi. Штамм обладал высокой биоцидной активностью против патогенов.

Вызываемая эндофитами СИУ сохраняется в растениях долгое время и эффективно работает против патогенов даже в условиях хранения (Максимов и др., 2011). Он проявляется в каскадном раннем, быстром и многократном накоплении уровня АФК, в том числе и H_2O_2 , после начала инфицирования и запуске экспрессии редокс-чувствительных транскрипционных факторов и генов PR-белков, а также регулирует взаимодействие СК, ЖК и этиленового сигнальных путей. Так, ризобактерия *P. putida* LSW17S индуцировала быстрое накопление транскриптов PR-генов и продукцию H_2O_2 в растениях томата, инфицированных *P.syringae* pv. *tomato* DC3000, что ингибировало развитие патогена (Ahn et al., 2011). Снижение степени развития гриба *Rhizopus stolonifer* на плодах персика, обработанных *B. cereus* AR156 и *B. subtilis* SM21, было связано с генерацией H_2O_2 , увеличением экспрессии генов хитиназы, β -1,3-глюканазы и фенилаланинаммоний-лиазы и активностью их белковых продуктов (Wang et al., 2013). Штаммы *B.subtilis* BSCBE4 и *P.chlororaphis* PA23 активировали пероксидазы и полифенолоксидазы, катализирующие завершающие реакции биосинтеза лигнина, в проростках перца, инфицированных *Pythium aphanidermatum* (Nakkeeran et al., 2006).

При развитии СИУ, индуцированной эндофитными бактериями, генерация АФК в растениях может играть критическую роль в формировании эффекта прайминга. Феномен

праймирования генома хозяина под влиянием бактериальных агентов заключается в приобретении растительными клетками повышенной чувствительности к воздействию чужеродных веществ и характеризуется более быстрой и сильной активацией клеточных механизмов защиты растения при атаке патогенами или насекомыми и может длиться довольно долго, что приводит к повышению устойчивости растений. Выдвигаются предположения, что такое праймирование под влиянием бактерий связано с изменением статуса метилирования ДНК в геноме растений (Da et al., 2012).

Таким образом, поиск высокоэффективных эндофитных штаммов, перенос «полезных» генов в них из других хозяйственно значимых видов бактерий, а также конструирование их эффективных консорциумов способствует созданию на их основе биопрепаратов нового поколения для комплексной защиты растений от и патогенов и вредителей. Способность эндофитов продуцировать фунги- и инсекто-токсичные белки, праймировать фитоиммунные реакции и одновременно сосуществовать в тканях растений может способствовать уходу от использования в растениеводстве трансгенных растений, продуцирующих соответствующие белки.

Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 17-29-08014 (2018).

Литература / References

1. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Юсупова З.Р., Хайруллин Р.М. Влияние бактерий *B. subtilis* 26Д на содержание пероксида водорода и активность пероксидазы в растениях яровой пшеницы // Агрехимия. 2010. № 1. С. 55–60.
2. Михайликова В.В., Стребкова Н.С. Использование средств защиты растений в Российской Федерации // Агрехимия. 2015. «12. С. 56-59.
3. Ahn I.P., Lee S.W., Kim M.G., Park S.R., Hwang D.J., Bae S.C. Priming by rhizobacterium protects tomato plants from biotrophic and necrotrophic pathogen infections through multiple defense mechanisms // Mol. Cells. 2011. V. 32. P. 7-14.
4. Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. // Biochim Biophys Acta. 2005. V.1713. P.51–56.
5. Bassil K.L., Vakil C., Sanborn M., Cole D.C., Kaur J.S., Kerr K.J. Cancer health effects of pesticides // Canadian Family Physician. 2007. V.53 (10). P.1704–1711.
6. Baidara P., Korpole S. Lipopeptides: Status and Strategies to Control Fungal Infection // Recent

- Trends in Antifungal Agents and Antifungal Therapy. 2016. P. 97-121.
7. Cawoy H., Debois D., Franzil L., De Pauw E., Thonart P., Ongena M. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. // Microb Biotechnol. 2015. V.8 (2). P.281-295.
 8. Chandler S., Van Hese N., Coutte F., Jacques Ph., Hofte M., De Vleeschauwer D. Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.) // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2015. V.91. P. 20-30.
 9. Compant S., Saikkonen K., Mitter B., Campisano A., Mercado-Blanco J. Editorial special issue: soil, plants and endophytes // Plant Soil. 2016. V.405. P. 1–11. DOI 10.1007/s11104-016-2927-9.
 10. Cocq K.L., Gurr S.J., Hirsch P.R., Manuchline T.H. Exploration of endophytes for sustainable agricultural intensification // Mol. Plant pathol. 2017. V. 18(3). P. 469-473.
 11. Chowdhury S.P., Uhl J., Grosch R., Alquéres S., Pittroff S., Dietel K., Schmitt-Kopplin P., Borriss R., Hartmann A. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani* // Mol. Plant Microbe Interact. 2015. V.28 (9). P. 984-995. doi: 10.1094/MPMI-03-15-0066-R.
 12. Da K., Nowak J., Flinn B. Potato cytosine methylation and gene expression changes induced by a beneficial bacterial endophyte, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V.50. P.24-34.
 13. Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S., Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defense - a genomics perspective. // Mol. Plant Pathol. 2002. V.3. P.371-390.
 14. Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. P. 869–878. doi 10.1007/s10886-013-0319-7.
 15. Farace G., Fernandez O., Jacquens L., Coutte F., Krier F., Jacques P., Clément C., Barka E.A., Jacquard C., Dorey S. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine // Mol. Plant Pathol. 2015. V.16 (2). P.177-187. doi: 10.1111/mpp.12170.
 16. Jasim B., Sreelakshmi K.S., Mathew J., Radhakrishnan E.K. Surfactin, Iturin and Fengycin Biosynthesis by Endophytic *Bacillus* sp. from *Bacopa monnieri* // Microb Ecol. 2016. V.72. P.106–119.

17. Jones T.S. Chemical evidence for the multiplicity of the antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* // Ann. N. Y. Acad. Sci, 1949. V.51. P.909-916.
18. Ji X., Zhang H., Zhang Y., Wang Y., Gao C. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants // Nature plant. 2015. V.1. Article 15144. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.144.
19. Kavino M., Manoranjitham S.K., Vijayakumar, N.K.R. Plant growth stimulation and biocontrol of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*) by coinoculation of banana (*Musa* sp.) plantlets with PGPR and endophytes. // Recent Trends in PGPR Research for Sustainable Crop Productivity, 2016. P.77.
20. Maksimov I.V., Khairullin R.M. The role of *Bacillus* bacterium in formation of plant defense: Mechanism and reaction The Handbook of Microbial Bioresources (eds V.K Gupta et al.) c CAB International 2016. Chapter 4. P.56-80.
21. Mardanova A.M., Hadieva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R. *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. // Agricultural Sci. 2017. V.8. P.1-20. doi: [10.4236/as.2017.81001](https://doi.org/10.4236/as.2017.81001)
22. Mihalache G., Balaes T., Gostin I., Stefan M., Coutte F., Krier F. Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. // Environ Sci. Pollut. Res. Int. 2017. V.20. doi: 10.1007/s11356-017-9162-7.
23. Nakkeeran S., Kavitha K., Chandrasekar G., Renukadevi P., Fernando W.G.D. Induction of plant defense compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum* // Biocontrol Sci. Techn. 2006. V. 16. P. 403-416.
24. Ongena M., Henry G., Thonart P. The role of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis* // Recent Developments in Management of Plant Diseases (Plant Pathology in the 21st century). V.1 / Eds. Gisi U. et al., Dordrecht Heidelberg, London New Yoerk, Springer Science+Business Media B.V. 2010. P. 59-69. DOI 10.1007/978-1-4020-8804-9_5.
25. Ongena M., Jacques P., Toure Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. V.69(1). P.29–38.
26. Rahman A., Uddin W., Wenner N.G. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens* // Mol. Plant. Pathol. 2015. V.16 (6). P.546-558.
27. Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. // J. Antimicrob. Chemother. 2006. V.57. P.609-618.
28. Sarosh B.R., Danielsson J., Meijer J. Transcript profiling of oilseed rape (*Brassica napus*) primed for biocontrol differentiate genes involved in microbial interactions with beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* from pathogenic *Botrytis cinerea*. // Plant Mol. Biol. 2009. V.70 (1-2). P.31-45. doi: 10.1007/s11103-009-9455-4.
29. Tran H., Ficke A., Asiimwe T., Höfte M., Raaijmakers J.M. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens* // New Phytol. 2007. V.175 (4). P.731-742.
30. Wang X., Wang J., Jin P., Zheng Y. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit // Int. J. Food Microbiol. 2013. V.164. P.141–147.
31. Yakhin O.I., Lubyantsev A.A., Yakhin I.A., Brown P.H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective // Frontier in plant science. 2017. V.7. Article 2049. doi: 10.3389/fpls.2016.02049.
32. Yang P., Sun Z.X., Liu S.Y., Lu H.X., Zhou Y., Sun, M. Combining antagonistic endophytic bacteria in different growth stages of cotton for control of *Verticillium* wilt. // Crop Protection. 2013. V.47. P.17-23.
33. Zhang T., Zhao Y.-L., Zhao J.-H., Wang S., Jin Y., Chen Z.-Q., Fang Y.-Y., Hua C.-L., Ding S.-W., Guo H.-S. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen // Nature plants. 2016. V.2. Article 16153. DOI: 10.1038/NPLANTS.2016.153.