



**ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ *BACILLUS SUBTILIS* 26Д СНИЖАЮТ ПОРАЖЕННОСТЬ РАСТЕНИЙ
КАРТОФЕЛЯ ФИТОФТОРОЗОМ, СТИМУЛИРУЯ ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ
ЖАСМОНАТ-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ**

А.В. Сорокань, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Россия,
Республика Башкортостан, 450045 г. Уфа, проспект Октября, 71.

*Email: fourtyanns@googlemail.com

Резюме

Bacillus subtilis 26Д увеличивает транскрипционную активность генов биосинтеза жасмоновой кислоты и жасмонат-зависимых защитных генов, в том числе анионной пероксидазы, участвующей в лигнификации, что приводит к увеличению устойчивости растений картофеля к фитофторозу.

Ключевые слова: картофель, фитофтороз, эндофиты, пероксидаза, жасмоновая кислота

Цитирование: Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Эндофитные бактерии *Bacillus subtilis* 26Д снижают пораженность растений картофеля фитофторозом, стимулируя транскрипционную активность жасмонат-зависимых генов // Биомика. 2020. Т.12(3). С. 398-403. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-31

© Авторы

**ENDOPHYTIC BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS* 26D REDUCE THE DAMAGE TO POTATO
PLANTS BY LATE BLIGHT, STIMULATING THE TRANSCRIPTIONAL
ACTIVITY OF JASMONATE-DEPENDENT GENES**

A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
Russia, Republic of Bashkortostan, 450045 Ufa, 71 Oktyabrya Avenue. Russia.

*Email: fourtyanns@googlemail.com

Resume

Bacillus subtilis 26D stimulated transcriptional activity of jasmonic acid biosynthesis genes and jasmonate-dependent protective genes, including anionic peroxidase involved in lignification, which increased their resistance to late blight pathogen.

Keywords: potato, late blight, endophytes, peroxidase, jasmonic acid

Citation: Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Maksimov I.V. Endophytic bacteria *Bacillus subtilis* 26D reduce the damage to potato plants by late blight, stimulating the transcriptional activity of jasmonate-dependent genes. *Biomixs*. 2020. Vol. 12(3). P. 398-403. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-31 (In Russian)

© The Authors

Современные интенсивные технологии сельского хозяйства требуют комплексного подхода к защите растений от повреждений патогенами и насекомыми-фитофагами. Химические средства защиты растений в основной массе являются одними из опаснейших поллютантов, кроме того, в популяциях патогенов и вредителей идет отбор наиболее резистентных к ним форм, что приводит к потере их эффективности. Экологически безопасным приемом повышения продуктивности и устойчивости растений является обработка семян микроорганизмами, способными контролировать развитие фитопатогенов и стимулировать рост растений. В настоящее время большие перспективы связаны с разработкой микробных биопрепаратов на основе эндофитных штаммов бактерий и грибов, которые населяют внутренние ткани растений без вреда для хозяина. Кроме того, эндофитность биологического агента может позволить снизить кратность обработок, как как подобный симбиоз поддерживается длительное время и выработка активных компонентов происходит непрерывно. Особо привлекательными среди них для промышленного (коммерческого) производства являются штаммы бактерий из рода *Bacillus* [1]. На основе одного из штаммов *B. subtilis* 26Д создан препарат Фитоспорин, эффективный против плесневения и гнилей семян различных культур, черной ножки, фитофтороза, альтернариоза картофеля и способный непосредственно воздействовать на ростовые характеристики патогенов [2].

Нашей задачей было протестировать способность бактерий *B. subtilis* 26Д влиять на поражаемость растений картофеля возбудителем фитофтороза *P. infestans*. В рамках этого было исследовано содержание перекиси водорода и активность пероксидаз картофеля, а так же транскрипционная активность ряда жасмонат-индуцируемых защитных генов – PR-6, алленоксидсинтазы и оксо-ФДК-редуктазы. Последние так же являются ферментами синтеза ЖК в растениях.

Пробирочные стерильные растения сорта Ранняя Роза после 10 суток культивирования на среде Мурасиге-Скуга обрабатывали бактериальной суспензией штамма *B. subtilis* 26Д путем нанесения 5 мкл суспензии (10^9 клеток/мл). Через 20 суток после обработки часть растений инфицировали возбудителем фитофтороза и наблюдали развитие симптомов заболевания. Изображения инфицированных листьев анализировали в программе ImageJ, о пораженности судили по проценту поврежденной площади от общей площади листа. Визуальные симптомы болезни наблюдали в течение

10 суток, фотографии анализировали в программе ImageJ.

Тотальную РНК выделяли с помощью реактива Тризол (Molecular Research Center, Inc, США), согласно протоколу фирмы-поставщика. Синтез кДНК, на основе мРНК проводили с использованием праймеров и фермента M-MLV обратной транскриптазы по протоколу фирмы-поставщика (Fermentas, США). кДНК использовали в реакции амплификации с праймерами к генам анионной пероксидазы картофеля M21334, PR-6 (ЖК-чувствительные гены), а также генов биосинтеза ЖК (алленоксидсинтазы (AOS) и 12-оксо-(10,15Z)-фитодиеновой кислоты - редуктазы (OPR). Анализ экспрессии генов PR-белков 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 относительного референсного гена *St act* с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США).

Локализацию лигнина и пероксидазной активности в листьях изучали через 24 ч после инокуляции растений. При анализе локализации пероксидазы листья обрабатывали смесью из 0.01% 3.3 диаминобензидина (ДАБ) и 0.02% H_2O_2 в 0.1 М ФБ 30 мин при вакуумной инфльтрации перед фиксацией в 96% этаноле при 4° С в течение 4 ч. Аутофлуоресценцию лигнина в листьях зараженных растений изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-510 на основе инвертированного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия). Для возбуждения автофлуоресценции использовали аргоновый лазер 30 мВт с длиной волны 488 нм, диχροичное зеркало 490 нм и пропускающий фильтр 505 нм [3].

Было выявлено, что в отсутствие обработки *B. subtilis* 26Д инфицирование вызывает только кратковременный подъем транскрипционной активности генов анионной пероксидазы и оксо-ФДК-редуктазы на первые сутки после инфицирования. При этом активность гена алленоксидсинтазы в инфицированных растениях на 1 сутки снижена и увеличивается только на 3 сутки, чему соответствует постепенное увеличение транскрипционной активности гена PR-6 белка до 6-ти кратного на 3 сутки. При этом обработка растений суспензией бактериальных клеток в небольшой степени влияет на содержание транскриптов исследуемых генов (за исключением значительной активации транскрипции

гена PR-6 белка), однако инфицирование обработанных растений вызывает продолжительное накопление транскриптов гена M21334 анионной пероксидазы. Кроме того, в данном варианте наблюдалась трехкратная активация транскрипции генов оксо-ФДК-редуктазы и алленоксидсинтазы на 1 сутки после инфицирования. При этом содержание транскриптов гена алленоксидсинтазы оставалось

высоким в последующие сутки после инфицирования. Следует отметить, что в данном варианте 6-ти кратное по сравнению с контролем превышение содержания транскриптов жасмонат-чувствительного гена PR-6 достигалось уже на 1 сутки после инфицирования, что может быть обусловлено наблюдаемым увеличением активности генов ферментов синтеза ЖК в растении.

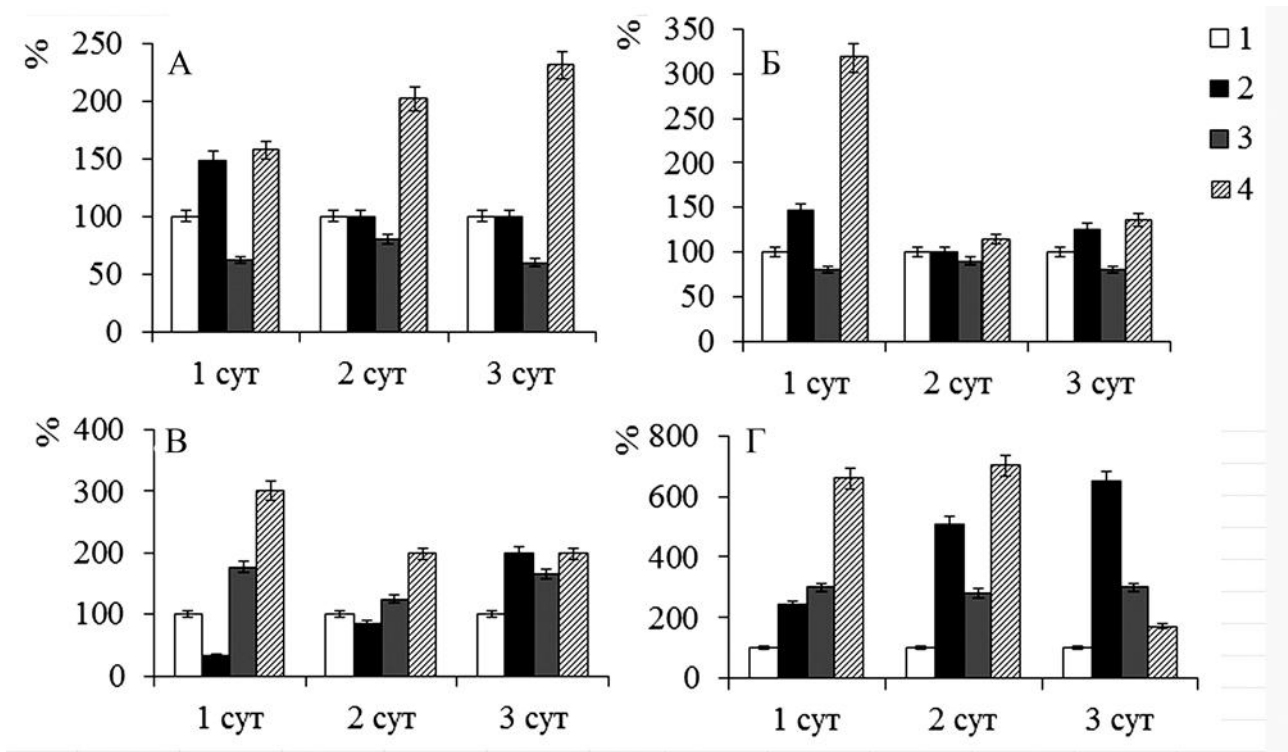


Рис. 1. Транскрипционная активность генов, кодирующих пероксидазу M21334 (А), оксо-ФДК-редуктазу (Б), алленоксидсинтазу (В) и белок PR-6 (Д) картофеля под воздействием *B.subtilis* 26Д в здоровых и инфицированных фитофторозом растениях картофеля. 1 – необработанный незараженный контроль; 2 – инфицирование; 3 – *B.subtilis* 26Д; 4 – *B.subtilis* 26Д + инфицирование. Транскрипционная активность генов исследовалась через 48 часов после инфицирования. Данные по транскрипционной активности генов нормализованы против актина.
 Figure 1. Transcriptional activity of genes encoding M21334 peroxidase (A), oxo-FDC reductase (B), allenyloxynase (C), and PR-6 protein (D) in potatoes under the influence of *B.subtilis* 26D in healthy and late blight-infected potato plants. 1 - untreated uninfected control; 2 - infection; 3 - *B. subtilis* 26D; 4 - *B.subtilis* 26D + infection. Transcriptional activity of the genes was studied 48 hours after infection. Data on gene transcriptional activity were normalized against actin.

Ранее нами было показано, что сниженная экспрессия анионной пероксидазы M21334 в растениях приводила к недостаточной лигнификации клеточных стенок при воздействии *P. infestans*, и, в свою очередь, к снижению устойчивости к патогену [4]. Как видно из рис. 2, инфицирование растений картофеля приводит к лигнификации клеток, прилегающих к месту внедрения патогена и зоне развития СВЧ. Присутствие клеток эндофитных

бактерий *B. subtilis* 26Д в тканях растений способствовало как более выраженной автофлуоресценции клеточных стенок в норме, так и интенсификации образования лигнина вокруг пораженных зон, что может объясняться увеличением пероксидазной активности в клеточных стенках как неинфицированных, так и инфицированных растений картофеля, обработанных *B. subtilis* 26Д (рис. 1).

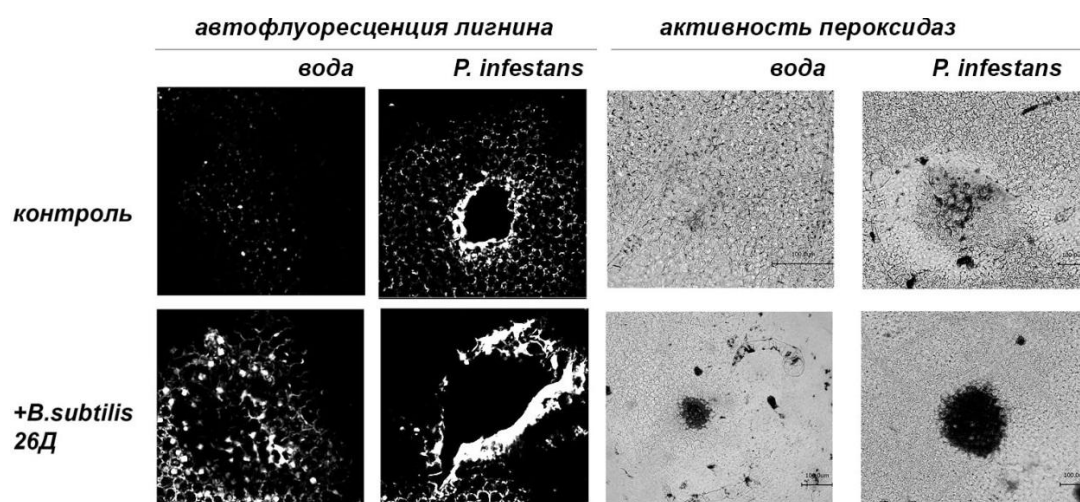


Рис. 2. Накопление лигнина и активность пероксидаз в клеточных стенках растений картофеля под действием эндофитных бактерий *B.subtilis* 26Д и инфицирования возбудителем фитофтороза.

Fig. 2. Accumulation of lignin and activity of peroxidases in the cell walls of potato plants under the action of endophytic bacteria *B.subtilis* 26D and infection with the pathogen of late blight.

B.subtilis 26Д стимулирует локальный иммунный ответ растений на внедрение патогена и способствует увеличению активности ряда защитных генов. Важно, что это приводит к заметному сокращению симптомов фитофтороза на листьях инфицированных растений (рис. 3) – в то время как площадь поражения необработанных листьев занимает около 1/3 листа, листья обработанных растений поражены менее чем на 15%. Можно предположить, что эндофитные бактерии увеличивают чувствительность растений к патогену, что позволяет в короткие сроки запустить каскад реакций, связанных с развитием защитного ответа по жасмонат-зависимому пути. Так, в первые сутки значительно увеличивается транскрипция генов ферментов синтеза ЖК, высокое содержание перекиси водорода обеспечивает восприятие ЖК-сигнала генами позднего ответа (PR-6 и M21334) и своевременно развивается устойчивость к патогену.

Как было показано ранее, обработка суспензией *B. subtilis* 26Д растений устойчивого к фитофторозу сорта картофеля Невский снижала интенсивность проявления симптомов фитофтороза на листьях и приводила к увеличению содержания транскриптов ЖК-зависимого гена PR-6 [5]. В данной работе был использован восприимчивый сорт Ранняя Роза, растения которого также становились более устойчивыми к фитофторозу после обработки бактериальными клетками.

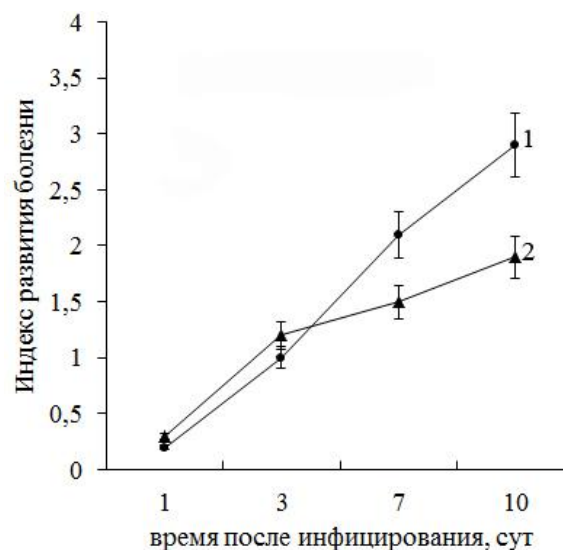


Рис. 3. Индекс развития симптомов фитофтороза на листьях стерильных (1) и содержащих эндофитные бактерии *B.subtilis* 26Д (2) растений картофеля.

Fig. 3. Index of the development of late blight symptoms on the leaves of sterile (1) and endophytic bacteria containing *B.subtilis* 26D (2) potato plants.

Исследованием последних лет доказано, что многие растения, в том числе и сельскохозяйственные, содержат в своем составе микроорганизмы (бактерии, грибы), эндофитно существующие в тканях макросимбионта [6]. Так, в настоящее время

подобных эндофитов только среди бактерий обнаружено не менее 220 видов, относящихся к 71 роду [7]. Способность эндофитов участвовать в биоконтроле фитопатогенов и насекомых, регуляции роста растений, азотфиксации, синтезе биологически активных соединений [8,9] открывает значительные перспективы для последующего их использования в биотехнологии и растениеводстве. Особо интересны данные по способности эндофитов придавать растениям комплексную устойчивость как к насекомым-вредителям, так и к патогенам, наносящим ущерб сельскому хозяйству [10]. Полученные данные убедительно доказывают, что такие микроорганизмы как штамм *B.subtilis* 26Д, могут быть эффективными агентами для защиты растений от патогенов и их использование является весьма перспективным.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 20-76-00003.

Литература

1. Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. Под ред. Шакировой Ф.М., М.: Наука. 2005. 166 с.
2. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах. М.: Наука. 2007. 147 с.
3. Efetova M., Zeier J., Riederer M., Lee C.W., Stingl N., Mueller M., Hartung W., Hedrich R., Deeken R. 2007. A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 145(3), 853-862. <https://doi.org/10.1104/pp.107.104851>
4. Sorokan A.V., Burhanova G.F., Maksimov I.V. Anionic peroxidase-mediated oxidative burst is required for jasmonic acid-dependent *Solanum tuberosum* L. defense against *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary // *Plant Pathology.* 2018. V 67, pp 349-357; doi:10.1111/ppa.12743
5. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Сайленсинг гена анионной пероксидазы картофеля изменяет регуляцию активности защитных генов при патогенезе // Тезисы докладов VIII Съезда ОФР. Петрозаводск 2015. С. 503.
6. Partida-Martinez L. P., Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? // *Frontier in plant science.* 2011. V.2. Article 100. P. 1-16
7. Hallman J., Berg G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes // *Soil Biology.* V. 9. Microbial root endophytes. Berlin: Springer-Verlag. 2006. P. 15-31.
8. Ownley B. et al. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control // *Journal of Invertebrate Pathology.* 2008. N. 98. P. 267–270
9. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. Влияние биопрепаратов на основе эндофитной бактерии *Bacillus subtilis* 26Д на поствегетационное сохранение защитного потенциала клубней картофеля против патогенов // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 4, с. 373–385.
10. Arumugam K., Ramalingam P., Appu M. Isolation of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* organism from soil and their treatment against rice pathogens // *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2013. 3 (6):77-81.

References

1. Loginov O.N. Bakterii *Pseudomonas* i *Azotobacter* kak ob'ekty sel'skhozjajstvennoj biotehnologii. Pod red. Shakirovoj F.M., M.: Nauka. 2005. 166 s. [Pseudomonas and Azotobacter Bacteria as objects of agricultural biotechnology] (In Russian)
2. Melent'ev A.I. Ajerobnye spoorobrazujushhie bakterii *Bacillus* Cohn v agroekosistemah. M.: Nauka. 2007. 147 s. [Aerobic spore-forming bacteria *Bacillus* Cohn in agroecosystems] (In Russian)
3. Efetova M., Zeier J., Riederer M., Lee C.W., Stingl N., Mueller M., Hartung W., Hedrich R., Deeken R. 2007. A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 145(3), 853-862. <https://doi.org/10.1104/pp.107.104851>
4. Sorokan A.V., Burhanova G.F., Maksimov I.V. Anionic peroxidase-mediated oxidative burst is required for jasmonic acid-dependent *Solanum tuberosum* L. defense against *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary // *Plant Pathology.* 2018. V 67, pp 349-357; doi:10.1111/ppa.12743
5. Sorokan' A.V., Burhanova G.F., Kuluev B.R., Maksimov I.V. Sajlensing gena anionnoj peroksidazy kartofelja izmenjaet reguljaciju aktivnosti zashhitnyh genov pri patogeneze // Tezisy dokladov VIII S'ezda OFR. Petrozavodsk 2015. S. 503. [Silencing of the potato anionic peroxidase gene changes the regulation of the activity of protective genes in pathogenesis] (In Russian)
6. Partida-Martinez L. P., Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? // *Frontier in plant science.* 2011. V.2. Article 100. P. 1-16
7. Hallman J., Berg G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes // *Soil Biology.* V. 9. Microbial root endophytes. Berlin: Springer-Verlag. 2006. P. 15-31.

8. Ownley B. et al. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control // Journal of Invertebrate Pathology. 2008. N. 98. P. 267–270
9. Maksimov I.V., Abizgil'dina R.R., Pusenkova L.I. Vlijanie biopreparatov na osnove jendofitnoj bakterii *Bacillus subtilis* 26D na postvegetacionnoe sohranenie zashhitnogo potenciala klubnej kartofelja protiv patogenov // Prikl. biohimija i mikrobiologija. 2011. T. 47, № 4, s. 373–385. [Influence of biologics based on the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* 26D on post-vegetative preservation of the protective potential of potato tubers against pathogens] (In Russian)
10. Arumugam K., Ramalingam P., Appu M. Isolation of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* organism from soil and their treatment against rice pathogens // J. Microbiol. Biotech. Res. 2013. 3 (6):77-81.