Влияние бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами на содержание пролина и транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при стрессе

© Яруллина Л.Г.¹, Заикина Е.А.^{1*}, Цветков В.О.², Бурханова Г.Ф.¹, Черепанова Е.А.¹, Сорокань А.В.¹, Марданшин И.С.³, Калацкая Ж.Н.⁴, Балюк Н.В.⁴

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Россия, Уфа, 450054, проспект Октября, 71.

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет» Россия, Уфа, 450076, ул. Заки Валиди, 32.

³Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Россия, Уфа, 450059, ул. Рихарда Зорге, 19.

⁴Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купрезича НАН Беларуси» Беларусь, Минск, 220072, ул. Академическая, 27.

*Email: evisheva@yandex.ru

Исследовано влияние бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами на содержание пролина и транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при инфицировании *Phytophthora infestans* при недостатке влаги. Растения, выращенные из микроклубней сорта Ранняя Роза, опрыскивали суспензией *B. subtilis* и смесью бактерий с СК, ЖК, СК + ЖК. Через 3 дня после обработки растения инфицировали *P. infestans* и культивировали в условиях засухи. Выявлено снижение степени развития *P. infestans* на листьях при обработке *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК, которое коррелировало с повышением содержания пролина и уровнем экспрессии генов PR-белков.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, пролин, экспрессия генов

В естественных условиях возделываемые культуры одновременно или последовательно подвергаются воздействию стрессовых факторов различной природы. В этой связи наиболее перспективными представляются микробиологические подходы, основанные на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов. Основной экологически чистых препаратов для защиты растений от биотических и абиотических стрессов являются стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) [1-2].

Среди абиотических факторов, формирующих продуктивность растений, наиболее важным является наличие воды [3]. Рост и развитие картофеля, а также урожайность сильно зависят от влажности почвы. У картофеля эта зависимость выражена гораздо

сильнее, чем у других видов сельскохозяйственных культур [4]. Известно, что ризобактерии могут значительно повысить засухоустойчивость растений [5-6].

Считается, что обработка растений СРРБ способствует развитию индуцированной системной устойчивости (ИСУ), опосредованной действием жасмоновой кислоты, маркером развития которой является индукция экспрессии защитного белка PR-6 [8]. 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), маркером развития которой служит индукция экспрессии защитного белка PR-1 [7].

Показано, что экзогенно применяемая салициловая кислота, помимо повышения устойчивости к патогенам, повышает устойчивость растений к ряду физиологических стрессов [8], аналогичные данные были получены при обработке жасмонатом [9]. 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.

Цель работы – изучение влияния бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с СК и ЖК на содержание пролина и транскрипционную активность PR-генов при заражении *Phytophthora infestans* и засухе.

Материалы и методы. В опытах использовали растения картофеля *Solanum tuberosum*, выращенные из микроклубней восприимчивого сорта Ранняя роза. Клубни высаживали в емкости с грунтом (TerraVita). Растения выращивали на светоплощадке с фотопериодом 16 ч (освещенность 8000–10000 люкс) при температуре 20–22 °С.

На 15-е сутки после прорастания растений, часть из них опрыскивали суспензией бактерий *B. subtilis* 26Д (10^8 клеток / мл) и смесью бактерий с СК (10^{-6} М), ЖК (10^{-7} М) или СК (10^{-6} М) + ЖК (10^{-7} М). Контрольные опрыскивали 5 мл дистиллированной воды на 1 растение. На 3-и сутки после инокуляции *B. subtilis* 26Д растения опрыскивали 5 мл 1×10^5 спор / мл суспензии возбудителя фитофтороза *P. infestans*. В качестве контроля использовали растения, не инокулированные бактериями и не инфицированные фитофторой.

Дефицит влаги создавали за счет сокращения полива. При появлении видимых симптомов засухи (увядание растений) через 7 дней после заражения *P. infestans* (влажность почвы при этом составляла $40\% \pm 5$ от полной влагоемкости) [10] определяли содержание пролина в листьях. Часть листьев каждого варианта растений растирали в жидком азоте для выделения РНК.

О развитии болезни судили по проценту пораженной площади от общей площади листовой пластинки на 7-е сутки после заражения растений *P. infestans*. Листья фотографировали, полученные изображения анализировали в компьютерной программе ImageJ (NIH, США).

Определение содержания пролина. Навеску растений заливали 2.5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки помещали в водяную баню, которую затем доводили до кипения, после чего пробирки вынимали и охлаждали. Для приготовления реагента нингидрина 1.25 г нингидрина растворяли путем нагревания в 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 6М H_3PO_4 , а затем охлаждали. Пробирки, содержащие 2 мл холодного образца, 2 мл реагента нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты, помещали на водяную баню и кипятили в течение часа, затем охлаждали. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на спектрофотометре при 522 нм. Концентрацию пролина определяли с использованием ранее полученной калибровочной кривой:

навески пролина 10, 20, 30, 40, 50, 60 мкг растворяли в 2 мл 3% сульфосалициловой кислоты, измеряли на Perkin Elmer LS 55 (США) при 522 нм, и строили кривую концентрации. Содержание пролина в образцах рассчитывали по формуле: $A = N \times V / P$, где A - концентрация пролина, N - значение по калибровочной кривой, V - объем разведения, мл, P - масса образца, грамм.

Определение транскрипционной активности генов PR-белков. РНК выделяли из растений с помощью тризола (Molecular Research Center, Inc., США). Для получения кДНК на основе мРНК исследуемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы M-MuLV согласно протоколу поставщика. Анализ накопления транскриптов генов PR-1 (номер GenBank AY050221), PR-6 (номер GenBank JX683427) и PR-9 (номер GenBank M21334) проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени. кДНК разводили в пять раз и использовали непосредственно в качестве матрицы для количественной ПЦР (qPCR). Количественная ПЦР проводилась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием N', N'-диметил-N-(4 - ((E) - (3-метил-1,3-бензотиазол-2-илиден) метил) -1-фенилхинолин-1-иум-2-ил) -N-пропилпропан-1,3-диамина (SYBR GreenI) (Synthol, Россия) на приборе CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, США). Программа qPCR: 50 °C в течение 2 мин; 95 °C в течение 10 мин; 40 циклов при 95 °C в течение 15 с и при 60 °C в течение 1 мин. Каждую количественную ПЦР проводили в трех повторностях. После заключительного цикла ПЦР был проведен анализ кривой плавления для определения специфики реакции (при 95 °C в течение 15 секунд, 60 °C в течение 1 минуты и 95 °C в течение 15 секунд). Эффективность каждой пары праймеров была определена с использованием серии 10-кратных разведений кДНК для надежного определения кратных изменений. Изменения транскрипционной активности гена (оценка количества копий мРНК для каждого гена) проводили относительно эталонного гена St_act («ген домашнего хозяйства», актин, номер GenBank X55749) с использованием программного обеспечения «CFX Connect Real-Time System» (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка. Эксперименты включали 5 биологических повторностей для биохимических показателей и 15 – для транскрипционной активности. На гистограммах показаны выборочные средние и их 95%-ные доверительные интервалы. Различия исследуемых параметров анализировали с помощью теста Краскела – Уоллиса. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Результаты и их обсуждение. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на инфицирование растений картофеля *P. infestans* в условиях засухи. Сравнительный анализ степени пораженности фитофторозом листьев восприимчивого сорта картофеля при недостатке влаги выявил различия в скорости роста оомицета *P. infestans* в вариантах с инокуляцией бактериями и сигнальными молекулами (рис. 1). Так, в отсутствие обработки степень пораженности составила 64%, предварительная обработка *B. subtilis*, в том числе в сочетании с СК и ЖК, значительно снижала пораженность листьев. Предобработка *B. subtilis* в сочетании с ЖК оказала наиболее эффективное защитное действие (рис. 1). Ранее нами было показано, что обработка ЖК и *B. subtilis* 26Д снижают развитие *P. infestans* на клубнях картофеля [11].

Особенностью эндофитных бактерий является их способность воздействовать на рост растений непосредственно за счет синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы, таких как ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая, салициловая и жасмоновая кислоты [12], индуцирующих неспецифическую активацию защитных механизмов растений. Системная индуцированная устойчивость, вызываемая СРРБ, эффективна против грибов, оомицетов, бактерий, вирусов и насекомых-вредителей.

Рисунок 1. Влияние обработки бактериями *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК на пораженность листьев картофеля фитофторозом в условиях засухи. 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖК. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на содержание пролина. Исследования выявили антистрессовый эффект обработки бактериями *B. subtilis* 26Д на растениях картофеля в условиях засухи. Так, в растениях, обработанных *B. subtilis*, уровень пролина в листьях незараженных растений увеличивался в несколько раз (рис. 2). Сочетание бактерий с ЖК, но особенно с СК, снижало стимулирующее действие *B. subtilis* на уровень пролина в неинфицированных растениях. Однако, в варианте *B. subtilis* 26Д+СК+ЖК, содержание пролина было сопоставимо с уровнем растений, обработанных бактериями. Сходная тенденция влияния сочетания бактерий и сигнальных молекул на уровень пролина сохранялась и в инфицированных растениях (рис. 2).

Рисунок 2. Влияние обработки бактериями *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК на содержание пролина в листьях картофеля при заражении *P. infestans* в условиях засухи. 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖК. 1 – незараженные, 2 – зараженные *P. infestans* растения. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Известно, что пролин играет роль осмопротектора при засухе, накапливаясь в цитозоле растительных клеток [13]. Защитный эффект пролина обусловлен его участием в стабилизации мембран, структуры белковых молекул и снижении уровня АФК [13].

Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при заражении *P. infestans* в условиях засухи. Системная устойчивость растений к болезням, являющаяся неспецифической, основана на экспрессии многих защитных генов. Как видно на рис. 3, инфицирование и обработка *B. subtilis*, особенно в сочетании с сигнальными молекулами, стимулировали накопление транскриптов генов PR-1, PR-6 и PR-9 в растениях картофеля. Так ген PR-1 наиболее интенсивно экспрессировался у растений, обработанных бактериями в сочетании с СК. Обработка *B. subtilis* в сочетании с ЖК приводила к значительному увеличению уровня транскрипции гена PR-6 у неинфицированных и инфицированных растений по сравнению с контролем.

Рисунок 3. Влияние обработки бактериями *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖК на уровень экспрессии генов защитных белков. 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖК. 1 – незараженные, 2 – зараженные *P. infestans* растения. Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

Следует обратить внимание, что обработка бактериями *B. subtilis* в отсутствие сигнальных молекул оказывала значительное влияние на повышение уровня экспрессии PR-1 и PR-6 у незараженных растений в условиях засухи. Комбинация бактерий с СК и ЖК в данном случае имела, как правило, меньший, а в некоторых случаях даже отрицательный эффект, например, экспрессия PR-6 снижалась в присутствии СК. У инфицированных растений, обработанных бактериями в сочетании с СК или ЖК, значительно повышалась экспрессия PR-белков. В неинфицированных растениях экспрессия PR-9 увеличивалась при обработке *B. subtilis* как в отсутствие, так и в комбинации с СК или ЖК, но комбинированный эффект СК и ЖК вызывал большее увеличение экспрессии PR-9. Ранее было показано, что ЖК может нейтрализовать способность *B. subtilis* 26Д стимулировать транскрипционную активность гена PR-9 в условиях нормальной влажности [12]. Супрессивный эффект совместной обработки *B. subtilis* 26Д + ЖК выражался в снижении транскрипции генов PR-2, PR-3 и PR-9 в растениях пшеницы по сравнению с растениями, обработанными только *B. subtilis* 26Д или ЖК. Следовательно, совместное влияние засухи и заражения патогеном приводит к дополнительным

изменениям транскрипционной активности PR-генов растений по сравнению с инфицированными растениями, выращенными в нормальных условиях. Полученные данные могут быть использованы для разработки биопрепаратов, обладающих комплексным защитным эффектом на растения в стрессовых условиях.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ и БРФИ в рамках научного проекта № 20-516-00005, на оборудовании ЦКП “Биомика” и УНУ “Кодинк”.

Литература

1. Maksimov I.V., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Sarvarova E.R., Khairullin R.M. Plant growth-promoting bacteria in regulation of plant resistance to stress factors // Russian Journal of Plant Physiology. 2015. V. 62. P. 715-726.
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. 543-580.
3. Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M., SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria // Microbiological Research. 2016. V. 184. P. 13-24.
4. Burton W.G. Challenges for stress physiology in potato // American Potato Journal. 1981. V. 58. P. 3–14.
5. Marasco R., Rolli E., Ettoumi B., Vigani G., Mapelli F., Borin S., Abou-Hadid A.F., El-Behairy U.A., Sorlini C., Cherif A., Zocchi G., Daffonchio D. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming // PLoS One. 2012. V. 7. No. 10. Article e48479.
6. 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.
7. 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. 33-66.
8. 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. No. 3. P. 346-352.
9. Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review // Environmental and Experimental Botany. 2010. V. 68. P. 14-25.
10. Chanda B., Xia Y., Mandal M.K., Sekine K.T., Gao Q.M., Selote D. Glycerol-3-phosphate, a critical mobile inducer of systemic immunity in plants // Nat Genet. 2011. V. 43. P. 421–427.
11. Lastochkina O.V., Aliniaieifard 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. 579-6.

12. Maksimov I.V., Abizgildina P.P., Sorokan A.V., Burkhanova G.F. Regulation of peroxidase activity under the influence of signaling molecules and *Bacillus subtilis* 26D in potato plants infected with *Phytophthora infestans* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2014. V. 50. No. 2. P. 173-178.
13. Pireivatloum J., Qasimov N., Maralian H. Effect of soil water stress on yield and proline content of four wheat lines. // Afr J Biotech. 2010. V. 9. P. 36-40.

Influence of *Bacillus subtilis* bacteria in combination with signaling molecules on proline content and transcriptional activity of PR-protein genes in potato plants under stress

Yarullina L.G.¹, Zaikina E.A.^{1*}, Tsvetkov V.O.², Burkhanova G.F.¹, Cherepanova E.A.¹, Sorokan A.V.¹, Mardanshin I.S.³, Kalatskaya J.N.⁴, Balyuk N.V.⁴

¹FGBUN Institute of Biochemistry and Genetics UFIC RAS, 71, Pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia

²FSBEI HE Bashkir State University, 32, Zaki Validi str., Ufa, 450076, Russia

³FGBUN Bashkir Research Institute of Agriculture, 450059 Russia, Ufa, Zorge str., 19

⁴GNU Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich NAS of Belarus, 27, Akademicheskaya str., Minsk, 220072, Republic of Belarus

*Email: evisheva@yandex.ru

The effect of *Bacillus subtilis* bacteria in combination with salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids on the proline content and transcriptional activity of PR-protein genes in potato plants during *Phytophthora infestans* infection and drought was studied. Plants grown from microtubers of the Rannyaya Rosa cultivar were sprayed with a suspension of *B. subtilis* and a mixture of bacteria with SA, JA, SA + JA. 3 days after treatment, the plants were infected with *P. infestans* and cultivated under drought conditions. A decrease in the degree of *P. infestans* development on leaves was revealed upon treatment with *B. subtilis* in combination with SA and JA, which correlated with an increase in the proline content and the level of expression of PR-protein genes.

Key words: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, proline, gene expression