

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

## ВЛИЯНИЕ КОНЪЮГАТОВ ХИТОЗАНА С ОКСИКОРИЧНЫМИ КИСЛОТАМИ И БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* НА АКТИВНОСТЬ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К *Phytophthora infestans*

© 2024 г. Л. Г. Яруллина<sup>1, 2, \*</sup>, Г. Ф. Бурханова<sup>1</sup>, В. О. Цветков<sup>2</sup>,  
Е. А. Черепанова<sup>1</sup>, А. В. Сорокань<sup>1</sup>, Е. А. Заикина<sup>1</sup>, И. С. Марданшин<sup>3</sup>,  
И. Я. Фаткуллин<sup>1</sup>, И. В. Максимов<sup>1</sup>, Ж. Н. Калацкая<sup>4</sup>, Н. А. Еловская<sup>4</sup>,  
Е. И. Рыбинская<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия

<sup>3</sup>Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>4</sup>Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

\*e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 15.09.2023 г.

После доработки 30.10.2023 г.

Принята к публикации 05.11.2023 г.

Исследовали влияние конъюгатов хитозана с кофейной (ХКК) и феруловой (ХФК) кислотами в сочетании с бактериями *Bacillus subtilis* на транскрипционную активность генов PR-белков и изменение протеома у растений картофеля при инфицировании *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Показано, что опрыскивание растений, выращенных из мини-клубней сорта Удача, растворами композитов ХКК и ХФК и суспензией *B. subtilis* штаммов 26Д и 11 ВМ приводило к снижению степени развития возбудителя фитофтороза на листьях картофеля при всех вариантах обработки. Максимальный защитный эффект проявлялся при обработке растений бактериями *B. subtilis* штамм 26Д в сочетании с конъюгатами хитозана и оксикоричных кислот. Механизмы повышения устойчивости растений картофеля к *P. infestans* были связаны с активацией транскрипционной активности генов, кодирующих основной защитный белок (PR-1), хитиназы (PR-3), тауматинподобного белка (PR-5), ингибитора протеаз (PR-6), пероксидазы (PR-9) и рибонуклеазы (PR-10). Активация экспрессии маркерных генов системно приобретенной устойчивости и индуцированной системной устойчивости под влиянием совместной обработки свидетельствовала о синергетическом развитии защитных реакций в растениях картофеля в данном варианте. Методом двумерного электрофореза белков листьев *S. tuberosum* с последующим MALDI-TOF-анализом идентифицировано 12 белков, состав которых в листьях различался в зависимости от варианта опыта. Во всех вариантах наблюдали подавление активности серин-треониновой протеин-фосфатазы, отражающее развитие реакции сверхчувствительности (СВЧ-реакции). Различные варианты опыта формировали слабо выраженные кластеры, что свидетельствовало о множественных механизмах регуляции синтеза защитных белков, вовлеченных в реакцию, на обработку бактериями, конъюгатами хитозана и заражение *P. infestans*.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*, *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, конъюгаты хитозана, кофейная и феруловая кислоты, экспрессия генов, PR-белки, протеом, индуцированная устойчивость

DOI: 10.31857/S0555109924020088 EDN: FZZZBV

В настоящее время в растениеводстве широко используются биопестициды на основе эндофитных бактерий рода *Bacillus*, способных не только подавлять развитие патогенов, но и также стимулировать рост растений и их устойчивость к стрессам биотической и абиотической природы [1]. К недостаткам биопестицидов можно

отнести сравнительно низкую скорость уничтожения патогенов и высокую чувствительность к неблагоприятным факторам окружающей среды. Так, Стру-белки, продуцируемые бактериями *B. thuringiensis*, чувствительны к различным абиотическим факторам: осадки, pH и температура почвы, инсоляция и влажность [2]. В этой связи весьма

актуальным становится повышение эффективности микробиологических препаратов для защиты продовольственных культур от комплекса биотических и абиотических факторов среды, что может быть достигнуто созданием препаратов, в которых штамм бактерий дополнен биологически активными веществами [3, 4].

Хитозан и его производные являются элиситорами иммунитета растений, которые часто используются для повышения биологической активности биопрепаратов [5, 6]. Показано, что добавление хитозана к биопрепаратам повышало их эффективность в защите овощных культур от мучнистой росы, а добавление хитина к бактериям рода *Bacillus* повышало устойчивость растений хлопка к вилту [7]. Синергетический эффект хитозанов и бактерий обусловлен синтезом штаммами бактерий эндохитиназы, гидролизующей хитин с образованием олигосахаридов, стимулирующих рост растений и их защитный потенциал [8, 9]. Путем химической модификации хитозана можно получать производные с повышенными антимикробными свойствами, ростстимулирующей и антиоксидантной активностями [10, 11]. Одним из направлений химической модификации хитозана является включение в его состав фенольных соединений, таких как оксикоричные кислоты, которые являются предшественниками большинства фенольных соединений и регулируют защитные ответы растений [12].

Возбудитель фитофтоза — оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary — один из основных возбудителей эпифитотий в посадках картофеля. Современная стратегия комплексной защиты продовольственных культур от широкого круга возбудителей болезней и абиотических стрессов основывается на применении биопрепаратов в сочетании с природными иммуностимуляторами. В связи с этим наноконпозиты хитозана имеют большой потенциал для расширения спектра действия биопестицидов нового поколения благодаря своей способности индуцировать защитные реакции в растительных тканях. Для этого необходимы сведения о механизмах формирования защитных реакций у растений при совместном их применении.

Цель работы — исследование влияния конъюгатов хитозана с кофейной (КК) и феруловой кислотами (ФК) и их комплексов с бактериями *Bacillus subtilis* на транскрипционную активность генов PR-белков, синтез пролина и изменение протеома растений картофеля при инфицировании *P. infestans*.

## МЕТОДИКА

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

сельского хозяйства, Уфа, Россия), выращенные из мини-клубней сорта Удача. Клубни высаживали в емкости с грунтом “TerraVita” (“Норд Палп”, Россия, 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* штаммы 26Д и 11 ВМ из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений 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 концентрации  $10^8$  кл./мл.

Для заражения растений использовали зооспоры оомицета *P. infestans* из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия). 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  $1 \times 10^5$  спор/мл.

**Получение конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами.** Конъюгат хитозана с КК и ФК получали карбодиимидным методом по методике, описанной в работе [13]. Для синтеза конъюгатов использовали хитозан с молекулярной массой (ММ) ~30 кДа, степенью деацетилирования 98.3% и степенью полимеризации ~186 (“Glentham Life Sciences”, Великобритания), КК (ММ = 180.16 г/моль, “Sigma-Aldrich”, США) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDC, “Sigma-Aldrich”). Синтез конъюгата проводили при соотношении Хит : КК и Хит : ФК = 5 : 1, EDC использовали в трехкратном мольном избытке по отношению к КК и ФК.

Содержание КК и ФК в синтезированном конъюгате определяли спектрофотометрически, для чего получали спектр поглощения конъюгата в области 200–400 нм и рассчитывали содержание КК и ФК по предварительно построенному калибровочному графику. Степень пришивки кофейной и феруловой кислот к хитозану составила  $5.0 \pm 0.6\%$  или  $53.8 \pm 7.2$  мкг/мг хитозана.

**Обработка растений.** На 15 сут после прорастания растения обрабатывали растворами конъюгатов хитозана с кофейной (ХКК, 0.30 мг/мл) и феруловой (ХФК, 0.25 мг/мл) кислотами, суспензией бактерий *B. subtilis* штаммов 26Д или 11 ВМ ( $10^8$  кл./мл), смесью растворов ХКК или ХФК с бактериями

соответствующих штаммов (1 : 1) из расчета 5 мл на 1 растение [7]. В контроле 1 растение опрыскивали 5 мл дистиллированной воды. Через 3 сут после инокуляции бактериями растения опрыскивали 5 мл суспензией спор *P. infestans* ( $1 \times 10^5$  спор/мл). Через 72 ч в листьях определяли содержание  $H_2O_2$  и пролина. Часть листьев каждого растения замораживали в жидком азоте для выделения РНК. О развитии болезни судили по проценту пораженной *P. infestans* площади от общей площади листовой пластинки (степень поражения, СП). Листья фотографировали, полученные изображения анализировали в компьютерной программе ImageJ (“NIH”, США). В качестве контрольных использовали растения, обработанные водой и не инфицированные фитотфторой.

**Определение содержания белка.** Содержание белка в образцах определяли по методу Брэдфорда, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [14]. Поглощение измеряли при 595 нм.

**Определение содержания пролина.** Листья картофеля (250 мг) погружали в 2.5 мл дистиллированной воды и обрабатывали, как описано в работе [15]. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на оборудовании En-Spire (“Perkin Elmer”, США) при длине волны 522 нм.

**Выделение РНК и проведение ПЦР в режиме реального времени.** Тотальную РНК из растений выделяли с помощью реактива Лира® по протоколу производителя (“Биолабмикс”, Россия) на 3 сутки после заражения. Синтез первой цепи кДНК и процедуру в реальном времени проводили, как описано ранее [15]. Экспрессия генов была показана как кратное изменение, нормализованное к транскрипции эталонного гена StAct, кодирующего актин картофеля. Применяли оборудование и программное обеспечение iCycler iQ5 Real-Time Detection System 181 (“BioRad”, США). Праймеры, использованные для ПЦР, показаны в табл. 1. Эффективность праймеров оценивали с помощью серии 10-кратных разведений кДНК.

**Двумерный электрофорез.** 450 мг листьев гомогенизировали в жидком азоте, ресуспендировали в 1 мл буферного раствора (0.7 М сахараза,

0.5 Hepes-KOH, pH 7.5, 0.1 М KCl, 2% меркаптоэтанол, 1 мМ этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N, N, N', N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА), 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ), 0.1 мМ ортованадат натрия) и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. Белки экстрагировали фенольным раствором по методике, описанной в работе [16]. К 1 мл фенола, насыщенного трис-НСl, добавляли 1 мл образца белка, полученную смесь инкубировали при –20°С 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°С 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 (ДТТ), 20 мМ Трис, 0.3%-ный раствор амфолитов).

Изоэлектрическое фокусирование белков проводили 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°С. Фокусировку проводили при напряжении 4000 В (20000 В ч) 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%-ного ДТТ и 2.5%-ного йодацетамида в буферных растворах с 25% глицерина, а затем промывали в 25 мМ трис-глициновом буфере, pH 8.3.

Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ с Na-ДДС. Полоски и белки-маркеры на фильтровальной бумаге помещали на полиакриламидный гель и проливали 1%-ным раствором агарозы в трис-глициновом буферном растворе. Электрофорез проводили при напряжении 90–120 В, гели стабилизировали в 50%-ном этаноле в течение 10 мин, затем окрашивали 0.1%-ным раствором

**Таблица 1.** Праймеры, используемые в ПЦР для исследования активности изучаемых генов

Продукт	Ген	GenBank, номер	Последовательность (5'–3')	
			прямой праймер	обратный праймер
Актин	StAct	X55749	gat-ggt-gtc-agc-cac-ac	att-cca-gca-gct-tcc-att-cc
PR1	StPR1	AY050221	tgg-gtg-gtg-gtt-cat-ttc-ttg-t	cat-tta-att-cct-tac-aca-tca-taa-g
Хитиназа, PR3	StPR3	U49970	ttc-tgg-atg-aca-gca-cag-gat	ggc-gtc-cat-tgc-cca-at
Тауматин-подобный белок, PR5	StPR5	AY737317	ccc-gtt-tga-cat-tga-cct-ttg	cga-ata-cgg-tgg-aac-atg-ga
Ингибитор протеиназы, PR6	StPR6	JX683427	ggg-aaa-gaa-tat-gct-caa-gtt-at	aat-tct-cca-tca-tct-tcc-act-g
Пероксидаза, PR9	StPR9	M21334	gta-atc-ctg-ccg-cac-aac-t	gca-gca-aaa-tct-cca-agg-aa
Рибонуклеаза, PR10	StPR10	AF500589	ctc-gct-aac-cct-tct-gtc-tat-g	caa-cac-gtc-ctg-ctc-ctc-tct-c
Метилтрансфераза	StMT	XM_006356514	ggc-aat-gga-cat-taa-ccg	tca-aga-aga-ggc-aaa-gca-g
Пролин-карбоксилат синтаза	StPCS	XM015308529	tta-aag-agg-acg-gag-ctt-gc	cag-tgc-ctc-agg-tcg-tga-ct

Кумасси G-250. Изображения гелей анализировали в компьютерной программе ImageJ (“NIH”, США).

**Масс-спектрометрия.** Идентификацию белков проводили на масс-спектрометре MALDI Bruker Ultraflex II (Германия). Триптический гидролиз белка в геле проводили в течение 18 ч при 37°C, останавливая добавлением 7 мкл 0.7%-ного раствора трифторуксусной кислоты. Для масс-спектрометрического анализа непосредственно на мишени масс-спектрометра смешивали 0.5 мкл раствора гидролизованного образца и 0.5 мкл 10 мг/мл дигидроксибензойной кислоты в 50%-ном ацетонитриле и 0.7%-ной 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. 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.

**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 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).

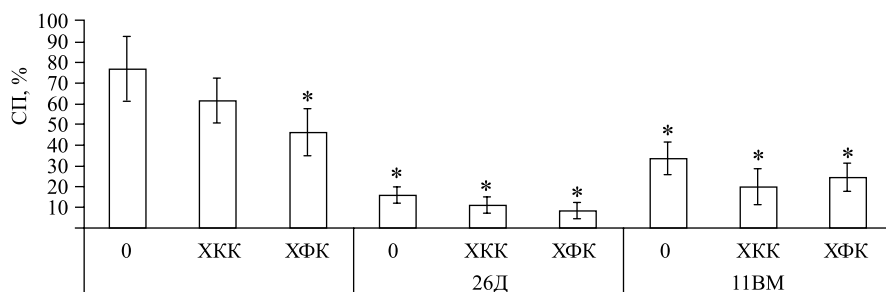
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние композитов хитозана с оксикоричными кислотами и бактерий *Bacillus subtilis* на устойчивость листьев картофеля к инфицированию *P. infestans* и содержание пролина.** Анализ степени пораженности листьев картофеля сорта Удача возбудителем фитофтороза выявил снижение скорости роста *P. infestans* при обработке растений конъюгатами ХКК и ХФК, а также при их совместном применении с различными штаммами бактерий *Bacillus subtilis* (рис. 1). Максимальное снижение степени пораженности листьев *P. infestans* выявлено в вариантах с предобработкой растений конъюгатом ХКК и при сочетании бактерий *B. subtilis* 26Д с ХФК, в два раза по сравнению с контролем.

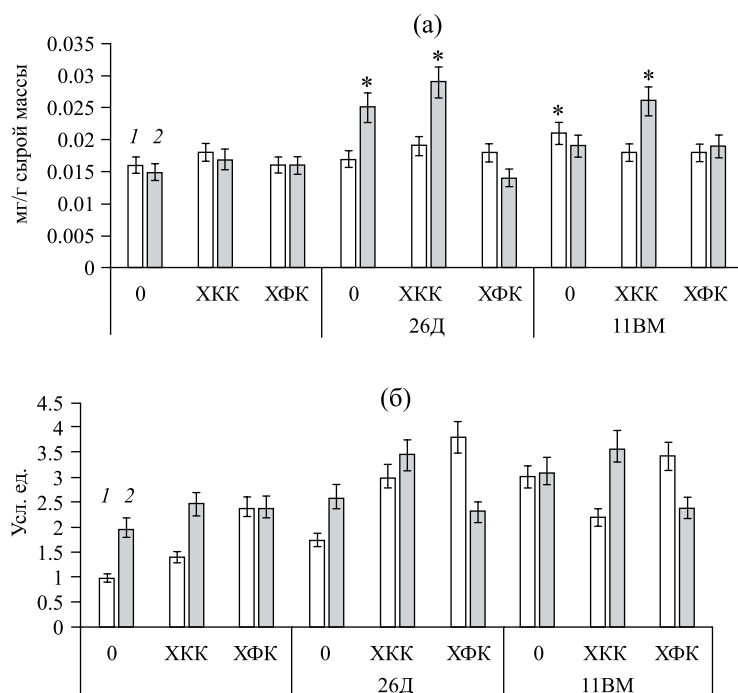
Защитный эффект предобработки растений картофеля бактериями *B. subtilis* 11ВМ заметно уступал штамму *B. subtilis* 26Д, в том числе при сочетании бактерий с конъюгатами ХКК и ХФК. При этом степень пораженности листьев *P. infestans* в вариантах *B. subtilis* 11ВМ + ХКК и *B. subtilis* 11ВМ + ХФК была достоверно ниже по сравнению с обработкой только *B. subtilis* 11ВМ.

Известно, что колонизация полезными микроорганизмами вызывает физиологическое состояние растения-хозяина, называемое праймингом. “Праймированный” статус растения позволяет реализовывать более сильные и быстрые защитные реакции против последующей инвазии патогенов, что проявляется как общий признак системной устойчивости, индуцируемой полезными микроорганизмами [17].

Хитин, хитозан и их олигомеры являются активными элиситорами иммунитета растений [18]. Оксикоричные кислоты под воздействием стрессовых факторов различной природы могут включаться в фенилпропаноидный путь, изменяя направление синтеза собственных производных [19], усиливая образование фенольных соединений, участвующих в механизмах повышения устойчивости растений [20]. Можно предположить, что совместная обработка конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами и бактериями *B. subtilis* способствует формированию более ранних и интенсивных защитных реакций при контакте с патогеном.



**Рис. 1.** Влияние конъюгатов ХКК и ХФК в композициях с *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на пораженность листьев картофеля *P. infestans* на 10 сутки после инокуляции. Звездочкой отмечены значения, значимо отличающиеся от контрольных значений по критерию Краскела–Уоллиса.



**Рис. 2.** Влияние конъюгатов ХКК и ХФК в композициях с *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на содержание пролина (а) и транскрипционную активность гена пирролин-5-карбоксилат синтазы (б) в растениях картофеля на 3 сутки после инокуляции *P. infestans*: 1 — контроль, 2 — заражение *P. infestans*. Звездочкой отмечены значения, значительно отличающиеся от контрольных значений по критерию Краскела–Уоллиса.

Известно, что самым ранним ответом растительного организма на атаку патогенов является генерация АФК и каскад последующих защитных реакций. В то же время длительная генерация АФК в растительных тканях приводит к их гибели. Наши исследования выявили антистрессовый эффект обработки *B. subtilis* в сочетании с ХКК на растениях картофеля, зараженных *P. infestans* (рис. 2а). Накопление пролина коррелировало с повышением транскрипционной активности гена пирролин-5-карбоксилат синтазой (P5CS) (рис. 2б) Повышение содержания пролина при стрессе связывают с активацией его синтеза, катализируемого P5CS и пирролин-5-карбоксилат редуктазой (P5CR) [21].

Синтез пролина может индуцироваться экзогенными сигнальными молекулами, brassиностероидами [22], салициловой кислотой [23], хитозаном [24]. Защитное действие пролина обусловлено его участием в стабилизации мембран, структуры белковых молекул и снижении уровня АФК. Кроме того, пролин задействован в регуляции многих клеточных процессов, является одним из индикаторов активации системной защиты растений, выполняя сигнальную функцию при взаимодействии растений с патогенами [25].

**Влияние композитов хитозана с оксикоричными кислотами и бактерий *B. subtilis* на транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при заражении *P. infestans*.** Одним из

механизмов защитного действия биопрепаратов на основе эндофитных бактерий является усиление продукции АФК [26] и опосредованной индукции экспрессии генов PR-белков [27]. Как видно на рис. 3, обработка растений штаммами *B. subtilis* 26Д и 11ВМ не влияла на транскрипционную активность исследуемых генов у незараженных растений. Уровень транскрипции гена *StPR9*, кодирующего анионную пероксидазу, в отличие от *StPR1* и *StPR6*, повышался при инфицировании *P. infestans*. Обработка растений картофеля конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами стимулировала накопление транскриптов генов *StPR1*, *StPR3*, *StPR6* и *StPR9*, *StPR10*, но не влияла на транскрипцию гена *StPR5* и метилтрансферазы в листьях растений, инфицированных *P. infestans*.

В обработанных бактериями, особенно штаммом *B. subtilis* 26Д, и инфицированных растениях в несколько раз повышалась транскрипция генов *StPR1*, *StPR6* и *StPR9*, *StPR10* и метилтрансферазы. Обработка растений *B. subtilis* 26Д совместно с конъюгатами ХКК и ХФК достоверно повышала уровень транскриптов генов *StPR1*, *StPR3*, *StPR5*, *StPR6* и *StPR9*, *StPR10*. В варианте с обработкой растений картофеля штаммом *B. subtilis* 11ВМ совместно с конъюгатами хитозана и оксикоричных кислот при инфицировании *P. infestans* также усиливалась транскрипционная активность генов *StPR1*, *StPR3*, *StPR6*, *StPR9* и *StPR10*, но не изменялась транскрипция *StPR5*.

На растениях трахинии показано, что *B. subtilis* 26D вызывает увеличение активности метилтрансфераз, участвующих в поддержании и регуляции метилирования ДНК растения [28]. Это предполагает участие бактерий рода *Bacillus* в регуляции устойчивости растений на эпигенетическом уровне. В целом, устойчивость растения к тому или иному стрессовому фактору определяется экспрессией множества генов, кодирующих защитные белки.

Показано, что обработка растений бактериями *B. subtilis* способствует развитию жасмонат-зависимой индуцированной системной устойчивости (ИСУ), что подтверждается увеличением транскрипционной активности гена PR-6, который считается маркером формирования защитного ответа по данному пути [29]. При воздействии биотрофных патогенов и элиситоров формирование системной приобретенной устойчивости (СПУ) развивается по салицилат-зависимому сигнальному пути, включая экспрессию гена PR-1 (маркера СПУ) [30, 31]. Следует отметить, что в зараженных

растениях, предварительно обработанных *B. subtilis* 26Д и 11ВМ совместно с композитами ХКК и ХФК, наблюдался высокий уровень транскрипционной активности генов основного антимикробного белка PR-1 и ингибитора протеазы PR-6. Возможно, в данном варианте обработки растений развитие устойчивости происходит синергетически, как по салицилат-, так и по жасмонат-зависимым путям. У инфицированных растений, обработанных *B. subtilis* 26Д в сочетании с ХФК, значительно повышалась транскрипционная активность генов хитиназы (PR-3), тауматин-подобного белка (PR-5) и пероксидазы (PR-9). Показано, что бактерии рода *Bacillus* вырабатывают в культуральную среду хитиназы и глюканазы, гидролизующие хитин и пептидогликаны, которые являются важным компонентом клеточной стенки микроорганизмов, а также индуцируют образование других защитных соединений [32]. В ответ на заражение вирусами, грибами и бактериями в межклеточной жидкости растительных тканей происходит накопление

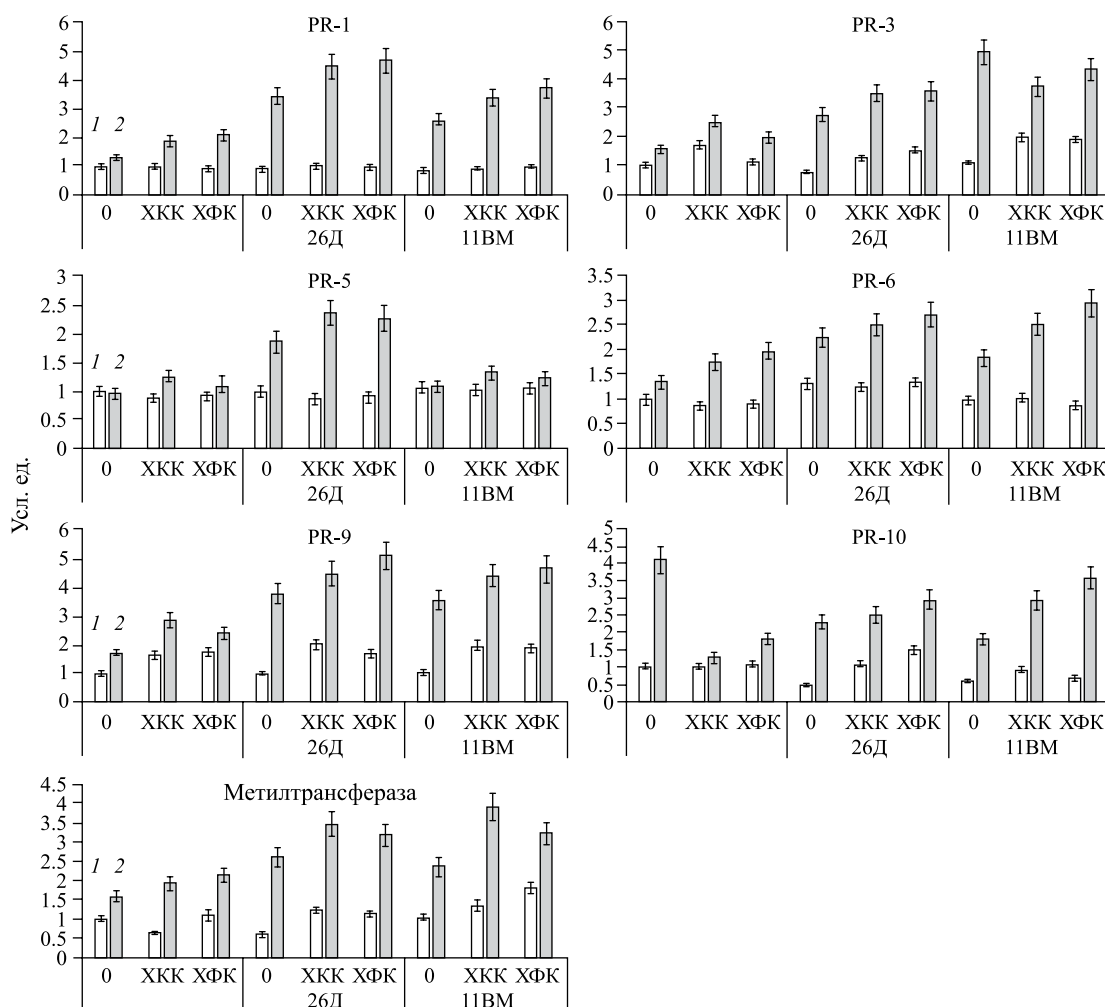


Рис. 3. Влияние конъюгатов ХКК и ХФК в композициях с *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля через 72 ч после инфицирования *P. infestans*: 1 — контроль, 2 — заражение *P. infestans*.



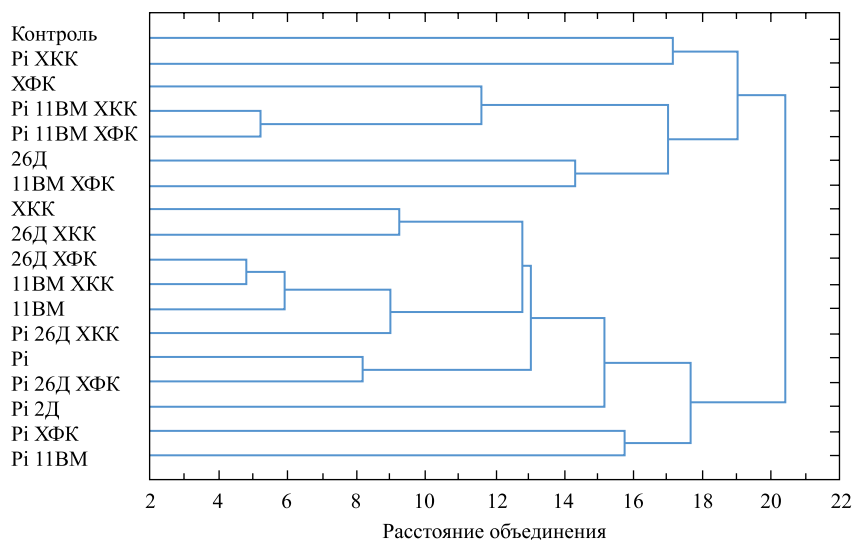


Рис. 4. Кластеризация вариантов опыта в соответствии с присутствием различных белков в листьях. “Pi” — заражение *P. infestans*.

в основном хитиназ третьего типа (PR-3). Основной защитный механизм белка PR-5 связан с увеличением проницаемости мембран патогенов [33].

В зараженных растениях, обработанных обоими штаммами *B. subtilis* в сочетании с ХКК, значительно повышалась экспрессия генов PR-9 и PR-10, что коррелировало с их устойчивостью. Известно, что пероксидазы растений класса III, входящих в семейство защитных белков семейства PR-9, участвуют в укреплении клеточных стенок за счет окислительных реакций, катализирующих процессы полимеризации фенольных соединений в лигнине клеточных стенок, повышая их устойчивость к разрушению фитопатогенами. Белки семейства PR10 могут функционировать в качестве фунгицидов, причем эта их способность, связанная с нуклеазной активностью, может проявляться как при прямом воздействии на патоген при проникновении внутрь клетки и разрушении клеточных РНК [34], так и за счет участия в реакции сверхчувствительности полностью [35]. Можно предположить, что индукция устойчивости растений, опосредованная рассматриваемыми штаммами *Bacillus*, может характеризоваться многогранным процессом прайминга, включающим экспрессию генов PR-белков и тонкую регуляцию окислительно-восстановительных процессов в растении [36].

**Изменение протеома листьев *S. tuberosum* при обработке композитами хитозана с оксикоричными кислотами и бактериями *B. subtilis* при заражении *P. infestans*.** 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* с последующим MALDI-TOF-анализом было

идентифицировано 12 белков, наличие которых в листьях различалось в зависимости от варианта опыта (табл. 2, рис. 4).

Как видно из табл. 2 и рис. 4, обработка ХФК в зараженных растениях существенно изменяла спектр белков листьев по сравнению с контролем. Различные варианты опыта формируют слабо выраженные кластеры, что свидетельствует о множественных механизмах регуляции синтеза защитных белков, вовлеченных в реакцию на обработку бактериями, конъюгатами хитозана и заражение *P. infestans*.

Предобработка ХФК при заражении растений вызывала повышенное содержание в листьях белков охуген-evolving enhancer protein 1, вовлеченного в генерацию АФК, и mitochondrial amidoxime reducing component 2. Известно, что окислительный взрыв является сигналом для реакции СВЧ, которая тесно связана с ответом растений на инфицирование патогеном. Имеются данные о взаимосвязи белка окислительного взрыва RPH1 с устойчивостью растений арабидопсиса к *Phytophthora brassicae* и картофеля к *P. infestans* [36]. Mitochondrial amidoxime reducing component 2 относится к ферментам электрон-транспортной цепи и катализирует реакции восстановления N-гидроксилированных соединений. Описана его защитная роль, заключающаяся в нейтрализации токсичных и мутагенных азотистых оснований [37, 38]. Белок mARK способен оказывать влияние на энергетические пути [38], также показано его участие в защите клеток от апоптотических эффектов [39]. Роль данного белка в реализации устойчивости растений в настоящее время не описана.

Во всех вариантах обработки наблюдалось пониженное содержание в листьях серин-треониновой протеинфосфатазы. Недавние исследования определяют протеинфосфатазу как важнейший

Таблица 2. Присутствие различных белков в листьях картофеля в различных вариантах опыта

№	Название белка по Uniprot	Контроль												<i>P. infestans</i>											
		H <sub>2</sub> O			26Д			11ВМ			H <sub>2</sub> O			26Д			11ВМ								
		0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК	0	ХКК	ХФК						
1	Sesquiterpene synthase	–	–	–	11	–	–	–	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3						
2	Aminomethyltransferase, mitochondrial	6	–	–	4	–	–	2.4	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.4						
3	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						
4	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3	–	–	–	6	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						
5	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						
6	Serine/threonine protein phosphatase	9	–	–	6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						
7	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	–	–	–	4	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						
8	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	–	2	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						
9	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	–	3	11	8	3	16	13	–	13	–	–	–	–	–	–	–	–	14						
10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6	–	4	–	8	1	4	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	9						
11	Putative ferredoxin-NADP reductase	–	14	–	2	13	9	12	8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						
12	Chorismate synthase.	–	8	–	–	12	11	12	11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–						

Примечание: «←» — белок не детектирован.

компонент, который контролирует ответные реакции патогенеза у различных видов растений, опосредуя посттрансляционную регуляцию ферментов и сигнальных компонентов. Генетические, протеомные и метаболомные исследования подчеркнули универсальную природу протеинфосфатазы как регулятора передачи сигналов рецепторов и органелл, экспрессии генов, метаболических путей и гибели клеток, оказывающих существенное влияние на иммунитет растений [40]. Все известные пути развития СВЧ-реакции включают инактивацию серин-треониновых протеинфосфатаз. В наших экспериментах наблюдалось блокирование этого фермента, что, по-видимому, является проявлением развития СВЧ-реакции.

При обработке ХКК и ХФК происходило повышение митохондриальной сериновой гидроксиметилтрансферазы (SHMT), одного из ферментов дыхания растений, нейтрализующего последствия СВЧ-реакции [41]. Показана связь SHMT с уменьшением выраженности симптомов поражения биотрофами и некротрофами, а также повреждений клеток, вызываемых абиотическими стрессами. Известно, что SHMT взаимодействует с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами АТФ-синтазы, содержание которой в наших экспериментах также значительно повышалось при различных обработках. По современным представлениям, данные взаимодействия в конечном итоге приводят к минимизации производства АФК, в частности пероксида водорода, в хлоропластах и уменьшению степени их окислительного повреждения [41].

Таким образом, совместная обработка растений конъюгатами хитозана с КК и ФК и бактериальными штаммами *B. subtilis* 26Д и 11ВМ способствовала повышению устойчивости растений картофеля к возбудителю фитофтороза. Механизмы активации защитных систем картофеля были опосредованы стимулированием экспрессии генов, кодирующих защитные белки PR-1, PR-3, PR-5, PR-6, PR-9 и PR-10 и повышением синтеза пролина. Выявленная активация экспрессии генов PR-1 (маркер СПУ) и PR-6 (маркер ИСУ) у растений свидетельствуют о том, что развитие защитных реакций в растениях картофеля против возбудителя в данном варианте обработки протекает синергетически. Возможно, бактерии праймируют гены защитных белков, а композиты хитозана запускают их экспрессию. Механизм влияния ХКК и ХФК на формирование устойчивости к возбудителю фитофтороза определяется составом (полимер-антиоксидант) и структурой самого конъюгата. За счет полимерной матрицы, вероятно,



обеспечивается пролонгированное воздействие оксикоричных кислот на функциональное состояние растительной клетки.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23–16–00139).

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandler D., Bailey A. S., Tatchell G. M., Davidson G., Greaves J., Grant W. P. // *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2011. V. 366. P. 1987–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
2. Kocięcka J., Liberacki D. // *Plants*. 2021. V. 10. P. 1160. <https://doi.org/10.3390/plants10061160>
3. Gonçalves C., Ferreira N., Lourenço L. // *Polymers*. 2021. V. 13. P. 2466. <https://doi.org/10.3390/polym13152466>
4. Aranaz I., Alcántara A. R., Civera M. C., Arias C., Elorza B., Heras Caballero A., Acosta N. // *Polymers*. 2021. V. 13. P. 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
5. Новикова И. И., Попова Э. В., Краснобаева И. Л., Коваленко Н. М. // *Сельскохозяйственная биология*. 2021. Т. 56. № 3. С. 511–522. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.511rus>
6. Kolesnikov L. E., Popova E. V., Novikova I. I., Priyatkin N. S., Arkhipov M. V., Kolesnikov Yu. R. et al. // *Agricultural Biology*. 2019. V. 54. № 5. P. 1024–1040. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.1024>
7. Краснобаева И. Л., Коваленко Н. М., Попова Э. В. // *Вестник защиты растений*. 2020. Т. 103. № 4. С. 233–240. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272>
8. Ortiz-Rodríguez T., De La Fuente-Salcido N., Bideshi D. K., Salcedo-Hernández R., Barboza-Corona J. E. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2010. V. 51. P. 184–190.
9. Saharan V., Pal A. *Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection*. New Delhi, India: Springer, 2016. P. 33–41.
10. Palazzini J., Reynoso A., Yerkovich N., Zchetti V., Ramírez M., Chulze S. // *Toxins*. 2022. V. 14. P. 499. <https://doi.org/10.3390/toxins14070499>
11. Ahmed A. S., Ezziyyani M., Sánchez C. P., Candela M. E. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2003. V. 109. P. 633–637. <https://doi.org/10.1023/A:1024734216814>
12. Brzezinska M.S., Kalwasińska A., Świątczak J., Żero K., Jankiewicz U. // *Microb. Pathog.* 2020. V. 148. P. 104462. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104462>
13. Rajput V. D., Harish Singh R. K., Verma K. K., Sharma L., Quiroz-Figueroa F.R., Meena M., Gour V. S., Minkina T., Sushkova S., Mandzhieva S. // *Biology*. 2021. V. 10. P. 267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
14. Kruger N. J. In: *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks / Ed. J. M. Walker, Totowa, USA: Humana Press, 2009. P. 17–24.
15. Yarullina L.G., Burkhanova G. F., Cherepanova E. A., Sorokan A. V., Zaikina E. A., Tsvetkov V. O. et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. № 6. P. 760–769. <https://doi.org/10.31857/S0555109921060131>
16. Fedina E.O., Karimova F. G., Tarchevsky I. A., Toropygin I. Y., Khripach V. A. // *Russ. J. Plant Phys.* 2008. V. 55. P. 193–200. <https://doi.org/10.1007/s11183-008-2005-0>
17. Conrath U., Beckers G. J. M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F. et al. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006. V. 19. P. 1062–1071.
18. Максимов И.В., Сингх Б. П., Черепанова Е. А., Бурханова Г. Ф., Хайруллин Р. М. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56. № 1. С. 19–34. <https://doi.org/10.31857/S0555109920010134>
19. Gonzalez-Gallegos E., Laredo-Alcala E., Ascacio-Valdes J., de Rodriguez D., Hernandez-Castillo F. // *American Journal of Plant Sciences*. 2015. V. 6. № 11. P. 1785–1791. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.611179>
20. Yu Y., Gui Y., Li Z., Jiang C., Guo J., Niu D. // *Plants (Basel)*. 2022. V. 11. № 3. P. 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>
21. Тарчевский И. А., Егорова А. М. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. № 4. С. 315–329.
22. Riseh R. S., Hassanisaadi M., Vatankhah M., Babaki S. A., Barka E. A. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 220. P. 998–1009.
23. Suarez-Fernandez M., Marhuenda-Egeac F. C., Lopez-Moyab F., Arnaod M. B., Cabrera-Escribano F., Nuedaf M. J. et al. // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 572087. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572087>
24. Chakraborty M., Hasamezzaman M., Rahman M., Khan M. A.R., Bhowmik P., Mahmud N. U. et al. // *Agriculture*. 2020. V. 10. № 12. P. 624. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
25. Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M. E. // *Mol. Plant Microb. Interact.* 2004. V. 17. № 4. P. 343–350.
26. Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., Barka E., Kauffmann A. et al. // *J. Exp. Botany*. 2011. V. 62. P. 595–603. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq291>
27. Pfannschmidt T., Brautigam K., Wagner R., Dietzel L., Schroter Y., Steiner S., Nykytenko A. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 599–607. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn081>
28. Gagné-Bourque F., Mayer B. F. // *PLoS ONE*. 2015. V. 10. № 6. P. e0130456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130456>
29. Veselova S. V., Nuzhnaya T. V., Maksimov I. V. In: *Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development*, Series Plant Science Research and Practices / Ed. L. Morrison. USA: Nova Sci. Publishers, 2015. P. 33–66.
30. Glazebrook J. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. V. 43. P. 205. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>

31. Gimenez-Ibanez S., Solano R. // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00072>
32. Chen F., Wang M., Zhang Y., Luo J., Yang X., Wang X. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 26. P. 675–684.
33. Vasyukova N. I., Ozeretskovskaya O. L. // *Russian Journal of Plant Physiology.* 2009. V. 56. № 5. P. 581–590. <https://doi.org/10.1134/S102144370905001X>
34. He M., Xu Y., Cao J. // *Protoplasma.* 2013. V. 250. № 1. P. 1229–1240.
35. Choi D. S., Hwang I. S., Hwang B. K. // *Plant Cell.* 2012. V. 24. № 4. P. 1675–1690.
36. Martinez-Medina A., Flors V., Heil M., Mauch-Mani B., Corné M. J., Pieterse C. M. J. // *Trends Plant Sci.* 2016. V. 21. P. 818–822. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.009>
37. Krompholz N., Krischkowski C., Reichmann D., Garbe-Schönberg D., Mendel R., Bittner F. et al. // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. V. 25. № 11. P. 2443. <https://doi.org/10.1021/tx300298m>
38. Rixen S., Havemeyer A., Tyl-Bielicka A., Pysniak K., Gajewska M., Kulecka M. et al. // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. RA119.007606. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007606>
39. Plitzko B., Havemeyer A., Kunze T., Clement B. // *Cell Biology.* 2015. V. 290. № 16. P. 10126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640052>
40. Máthé C., Garda T., Freytag C., M-Hamvas M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 3028. <https://doi.org/10.3390/ijms20123028>
41. Moreno J. I., Martin R., Castresana C. // *The Plant Journal.* 2005. V. 41. P. 451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02311.x>

## Effect of Chitosan Conjugates with Oxycinnamic Acids and *Bacillus subtilis* Bacteria on the Activity of Protective Proteins and Resistance of Potato Plants to *Phytophthora infestans*

L. G. Yarullina<sup>a, b, \*</sup>, G. F. Burkhanova<sup>a</sup>, V. O. Tsvetkov<sup>b</sup>, E. A. Cherepanova<sup>a</sup>, A. V. Sorokan<sup>a</sup>, E. A. Zaikina<sup>a</sup>, I. S. Mardanshin<sup>c</sup>, I. Y. Fatkullin<sup>a</sup>, I. V. Maksimov<sup>a</sup>, J. N. Kalatskaja<sup>d</sup>, N. A. Yalouskaya<sup>d</sup>, and E. I. Rybinskaya<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biochemistry and Genetics — a separate structural unit of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

<sup>b</sup>Ufa University of Science and Technology, Ufa, 450076 Russia

<sup>c</sup>Bashkir Research Institute of Agriculture — a separate structural unit of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

<sup>d</sup>Institute of Experimental Botany, V. F. Kuprevich National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

\*e-mail: yarullina@bk.ru

The effect of chitosan conjugates with caffeic (ChCA) and ferulic (ChFA) acids in combination with *Bacillus subtilis* bacteria on the transcriptional activity of PR protein genes and proteome changes in potato plants during infection with *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary was studied. Plants grown from mini tubers of the Luck variety were sprayed with solutions of ChCA and ChFA, suspension of *B. subtilis* bacteria strains 26D and 11 VM, composites of ChCA of ChFA together with bacteria. 3 days after treatment, some of the plants were infected with *P. infestans*. A decrease in the degree of development of the pathogen of late blight on potato leaves in all treatment options was revealed. The maximum protective effect was manifested when plants were treated with bacteria *B. subtilis* strain 26D in combination with conjugates of chitosan and oxycinnamic acids. The mechanisms of increasing the resistance of potato plants to *P. infestans* were associated with the activation of transcriptional activity of genes encoding the main protective protein (PR-1), chitinase (PR-3), thaumatin-like protein (PR-5), protease inhibitor (PR-6), peroxidase (PR-9), ribonuclease (PR-10). The revealed activation of the expression of marker genes of systemic acquired resistance and induced systemic resistance under the influence of joint treatment of plants with *B. subtilis* and chitin conjugates with oxycinnamic acids indicate the synergistic development of protective reactions in potato plants in this variant. By the method of two-dimensional electrophoresis of *S. tuberosum* leaf proteins followed by MALDI-TOF analysis, 12 proteins were identified, the presence of which in the leaves differed depending on the variant of the experiment. In all treatment variants, suppression of serine-threonine protein phosphatase activity was observed, reflecting the development of the hypersensitivity reaction. Different variants of the experiment formed weakly expressed clusters, which indicates multiple mechanisms of regulation of the synthesis of protective proteins involved in the reaction to treatment with bacteria, chitosan conjugates and infection with *P. infestans*.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, *Bacillus subtilis*, *Phytophthora infestans*, chitosan conjugates, caffeic and ferulic acids, gene expression, PR-proteins, proteome, induced resistance