

УДК 57.047,581.1

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* 26Д И *Bacillus velezensis* М66 НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ВОЗБУДИТЕЛЮ АЛЬТЕРНАРИОЗА *Alternaria solani*

© 2024 г. А. В. Сорокань^{1, *}, В. Ф. Габдрахманова¹, И. С. Марданшин²,
И. В. Максимов¹

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

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное
подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, 450059 Россия

*e-mail: fourtyanns@googlemail.com

Поступила в редакцию 08.05.2024 г.

После доработки 22.06.2024 г

Принята к печати 05.07.2024 г.

Изучено влияние бактерий *Bacillus velezensis* М66 и *Bacillus subtilis* 26Д на устойчивость растений картофеля к некротрофному грибу *Alternaria solani* – возбудителю альтернариоза. Впервые показано накопление жизнеспособных клеток бактерий этих штаммов во внутренних тканях стебля, корней и клубней картофеля на протяжении длительного времени. Выявлено значительное сокращение площади поражения альтернариозом на листьях, инокулированных эндофитами растений, а также ингибирование роста патогена под действием бактериальных штаммов, что может объясняться синтезом липопептидных антибиотиков, гены, отвечающие за синтез которых, были обнаружены методом ПЦР, и протеолитических ферментов, активность которых была показана *in vitro*. Формирование устойчивости растений под влиянием инокуляции *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* М66 сопровождалось накоплением пероксида водорода в первые часы после инфицирования растений спорами *A. solani* и снижением этого показателя на поздних этапах патогенеза за счет увеличения активности каталазы и пероксидаз. Ограничение распространения гриба сопровождалось увеличением активности ингибиторов протеиназ в растениях, что, вероятно, снижало негативное воздействие протеолитических ферментов некротрофного патогена *A. solani*. Можно полагать, что инокуляция растений клетками бактерий штамма *B. velezensis* М66 способствовала формированию устойчивости растений картофеля к альтернариозу посредством эффективного праймирования фитоиммунного потенциала, сравнимого с успешно применяемым в полевых условиях штаммом *B. subtilis* 26Д, активного компонента биопрепарата Фитоспорин-М.

Ключевые слова: картофель, *Bacillus velezensis* М66, *B. subtilis* 26Д, эндофиты, *Alternaria solani*, фитоиммунитет, про-/антиоксидантная система, ингибиторы протеиназ

DOI: 10.31857/S0555109924060064 **EDN:** QFSBZM

Бурая пятнистость, вызываемая несовершенным грибом *Alternaria solani* Sorauer (1896) является одним из важнейших заболеваний картофеля, распространенных во всех основных регионах выращивания этой культуры. При благоприятных погодных условиях, в теплые и влажные сезоны, это заболевание может привести к серьезным потерям урожая вследствие как преждевременной дефолиации, оказывающей значительное влияние на урожайность, так и прямого поражения клубней [1]. Токсины грибов рода *Alternaria* обладают цитотоксическим, фетотоксическим и тератогенным

действием на животных, а также мутагенным для микробных систем, млекопитающих [2]. Ожидается, что будущие климатические изменения, которые, вероятно, могут привести к повышению уровня CO₂ в атмосфере, увеличат заболеваемость альтернариозом и выработку токсинов патогеном [3]. Известно, что этот фактор существенно влияет на фитогормональный статус и защитный потенциал растений, например, на устьичные реакции, что приводит к их более высокой уязвимости к фитопатогенам, таким как альтернариоз [1]. В свою очередь, это ведет к увеличению объема вносимых

химических средств защиты растений, к которым данный патоген может успешно вырабатывать резистентность [2]. Проблемы в борьбе с распространением заболевания связаны с недостаточными знаниями о механизмах защиты растений от *A. solani*, например, отсутствие выявленных генов устойчивости картофеля к альтернариозу затрудняет получение устойчивых сортов [4]. В этих условиях приоритетной задачей является исследование растения как сложной биологической системы, которая является совокупностью макроорганизма — растения-хозяина, и всех микроорганизмов, которые заселяют экологические ниши в качестве паразитов или мутуалистов [5]. На всю эту систему оказывают влияние биотические и абиотические факторы среды.

Ассоциированные с растениями штаммы видов рода *Bacillus* (*B. thuringiensis* Berliner, *B. subtilis* Cohn, *B. amyloliquefaciens* Priest et al. 1987 и *B. velezensis* Ruiz-Garcia et al. 2005), обнаруженные как эндофиты во многих сельскохозяйственных растениях, являются наиболее известными агентами биологического контроля [5, 6]. Например, штамм бактерии *B. velezensis* SYL-3, выделенный из листьев табака, продемонстрировал ингибирующий эффект против *Alternaria alternata* ((Fr.) Keissl., 1912) и вируса табачной мозаики (ВТМ). С помощью полногеномного секвенирования растительного биота показано, что обработка этим штаммом значительно изменила структуру микробного сообщества на листьях табака и снизила индекс заболеваний, вызываемых *A. alternata* и ВТМ [7]. Сообщается, что выделенный из семян гороха штамм *B. velezensis* LHSB1 продемонстрировал 93.8% ингибирование радиального роста гиф *Agroathelia rolfsii* (Sacc.) Redhead & Mullineux, а обработка гороха *Sclerotinia rolfsii* Sacc. значительно снизила как заболеваемость, так и тяжесть стеблевой гнили по сравнению с контролем, даже по сравнению с обработкой фунгицидом [8]. Прямые механизмы защиты растений эндофитами реализуются преимущественно за счет секреции бактериями-эндофитами метаболитов, обладающих антибиотической активностью, главным образом антимикробных пептидов (циклических липопептидов, сидерофоров, поликетидов и др.), а также гидролитических ферментов — хитиназ, глюканаз, протеаз, липаз, амилаз, лактамаз и целлюлаз, разрушающих клетки патогенных грибов [9, 10].

Липопептиды — одна из основных групп бактериальных метаболитов, которые представляют большой интерес для ученых благодаря своей полифункциональности и в настоящее время активно изучаются в том числе и авторами работы [9]. Липопептиды бактерий рода *Bacillus* — сурфактины, итурины и фенгицины — обладают широким спектром биоцидного, бактерицидного, фунгицидного и инсектицидного действия [9, 11]. Липопептиды

проявляют антагонизм по отношению к другим организмам благодаря своей способности связывать липиды плазматической мембраны и изменять проницаемость или разрушать ее структуру, образуя в ней поры, как в случае фенгицина и итурина, или растворяя ее, как в случае сурфактина [12, 13]. Полногеномное секвенирование штаммов *B. velezensis* выявляет большое количество кластеров биосинтетических генов, кодирующих ферменты синтеза многочисленных антимикробных соединений, включая липопептиды, в том числе сурфактин, итурин, фенгицин и плипстатин [13]. Так, выделенный из ризосферы табака штамм *B. velezensis* EM-1 также продемонстрировал сильный ингибирующий эффект на *A. alternata*, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996 и *Phytophthora nicotianae* Breda de Naan, 1896, что авторы связывают с продукцией бактериями итурина А, макролактин А и макролактин W, а также с увеличением активности каталазы и полифенолоксидазы в табаке [14]. В работе [15] было показано, что штамм *B. subtilis* 26Д продуцирует сурфактины.

Неоднократно показана способность эндофитных микроорганизмов индуцировать устойчивость растений к различным патогенам, в том числе — возбудителям фитофтороза, среди которых наиболее экономически значим оомицет *P. infestans* (Mont.) de Bary [10, 16]. Роль эндофитов в развитии защитных реакций растений против патогенов тесно связана с регуляцией активности про-/антиоксидантной системы, например, НАДФ-оксидазы и пероксидазы, а также генерации/утилизации активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, пероксида водорода [4] и лигнификации пораженных тканей [17]. Лигнификация и суберинизация — это опосредованные пероксидазой процессы, в которых пероксид водорода необходим для перекисного окисления монолигнолов и фенольных компонентов [4, 17]. Было показано, что *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* могут стимулировать биосинтез лигнина посредством активации пероксидазы в инфицированных растениях [10]. Умеренно чувствительный к *A. solani* сорт картофеля Désirée, в отличие от восприимчивых линий (дефицитных по синтезу салициловой кислоты и нечувствительных к жасмонатам), характеризовался активной генерацией перекиси водорода в месте внедрения патогена [4].

Значительная роль в защитных системах растений принадлежит ингибиторам гидролаз микроорганизмов, например, трипсиноподобных экзопротеиназ у оомицета *Phytophthora infestans* [9]. У мутантов *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire, 1947 с нарушением единичных генов гидролитических ферментов, в том числе химотрипсина, N-ацетилглюкозаминидазы и сериновых протеаз, не наблюдается снижения вирулентности, что связано с функциональной избыточностью семейств

генов, свидетельствующая об их критической важности [19]. Повышенная активность ингибиторов протеазы в листьях томата после обработки альгинатом натрия также связывают с ограничением развития симптомов инфекции *A. solani* в листьях томата [20].

В связи с этим цель работы – оценка влияния бактерий штаммов *B. velezensis* М66 и *B. subtilis* 26Д на развитие защитных реакций растений картофеля, инфицированных некротрофным грибом *A. solani*.

МЕТОДИКА

Растительный и микробный материал. В работе использовали стерильные растения *Solanum tuberosum* L. сорта Алексеевский, полученные методом микроклонирования, выращенные в пробирках со средой Мурасиге и Скуга в климатической камере KBW E6 (“Binder GmbH”, Германия) с 16-часовым световым периодом при 20–22°C в течение 21 сут.

Культура бактерий штамма *B. subtilis* 26Д подерживается в коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН [21]. Клетки бактерии *B. velezensis* М66 были выделены из внутренних тканей стеблей картофеля сорта Удача (Башкортостан, Россия). Штамм депонирован в коллекции института [21], а последовательность 16S рРНК зарегистрирована в базе GenBank (accession number PP396155). Культуры бактерий выращивали на жидком лизогенном бульоне (LB) (триптон – 1%, дрожжевой экстракт – 0.5%, NaCl – 0.5%) при 20–22°C на лабораторных шейкерах OS-20 (“BioSan”, Латвия) при 120 об./мин.

Для формирования системы “Растение + эндوفит” стерильные 15-дневные растения картофеля инокулировали по ранее описанной методике [22] клетками бактерий *B. velezensis* М66 и *B. subtilis* 26Д, выращенными на жидкой питательной среде LB в течение суток. Затем, после центрифугирования в течение 15 мин при 4000 g на микроцентрифуге Eppendorf 5415R (США) бактерии ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде (титр был выровнен до 1×10^8 кл./мл). Бактериальную суспензию микробиологической петлей (5 мкл) наносили на нижнюю треть стебля (5×10^5 кл./растение). На стебли контрольных растений наносили по 5 мкл воды.

Фитопатоген и инокуляция. Патогенный грибок *A. solani* U2022 выделен из листьев картофеля сорта Удача с видимыми симптомами заболевания в 2022 г. (место выделения – г. Уфа, Башкортостан). Моноспорная культура была определена до вида по морфологическим признакам [23], что для крупноспорового вида *A. solani* считается возможным ведущими специалистами [24]. Патоген

выращивали на агаризованной ржаной среде в течение 7 сут [25]. Поверхность колоний промывали дистиллированной водой при температуре 4°C в течение 30 мин, после чего оценивали в камере Фукса–Розенталя количество конидий. Растения инфицировали путем нанесения 20 мкл суспензии спор (10^5 спор/мл) патогена (по 5 мкл на 4 верхних листа) на 7 сут после инокуляции бактериальной массой [26]. Исследование симптомов проводили с использованием фитопатологических газонов, на 8 сут после заражения растений грибом, пораженность определяли в процентах площади поражения к общей площади листьев. Изображения исследовали с помощью программного обеспечения ImageJ (“NIH”, США).

Определение титра бактерий в тканях растений. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в тканях растений определяли через 30 сут после инокуляции растений картофеля бактериями штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* М66 отдельно в побегах, корнях и образовавшихся мини-клубнях. Для этого навески органов растений поверхностно стерилизовали по следующей схеме: 70%-ный этанол – 1 мин; 0.33%-ный перексид водорода – 3 мин; дистиллированная вода [22, 26]. Перед стерилизацией кожура с мини-клубней удалялась. Навески растений гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением 2 мл стерильной воды. Аликвоты гомогената распределяли по поверхности среды LB шпателем Дригальского до полного высыхания. Чашки Петри инкубировали при температуре 28°C в термостате ТС–1/20 СПУ (“Смоленское СКТБ СПУ”, Россия) в течение 24 ч. Подсчет КОЕ производили во втором и третьем разведении, пересчитывая на 1 г сырой массы растений [26].

Биохимические исследования. Навеску пробирочных растений растирали в 0.025 М фосфатном буфере (ФБ), рН 6.2, в соотношении 1 : 5, экстрагировали 30 мин при 4°C и затем центрифугировали 10 мин при 8000 g на микроцентрифуге Eppendorf 5415R (США).

Содержание пероксида водорода оценивали при помощи реагента, который содержал 0.074% соли Мора в 5.81%-ной серной кислоте и 0.009% ксиленолового оранжевого в 1.82%-ном сорбите (в соотношении 1 : 100). К 250 мкл реагента добавляли 25 мкл супернатанта, полученного так, как описано выше. Реакционную смесь инкубировали в течение 45 мин в термостате при 30°C, затем центрифугировали 10 мин при 10000 g и вносили по 200 мкл супернатанта в лунки планшетных планшет. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли на планшетном спектрофотометре EnSpire© (“PerkinElmer”, США) при 560 нм [26].

Для определения активности ингибитора трипсина к 25 мкл 0.05 М трис-НСl-буфера, рН 8.2, добавляли 50 мкл растительного экстракта,

полученного вышеописанным методом, 25 мкл трипсина (1 мг/мл), а затем 50 мкл (1 мг/мл) раствора N- α -бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилид (БАПНА) и инкубировали в термостате при 37°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали 25 мкл 30%-ной уксусной кислоты. В качестве контроля использовали смесь, состоящую из всех описанных компонентов, но уксусную кислоту добавляли в лунки планшет перед их внесением. Оптическую плотность полученных растворов определяли на планшетном спектрофотометре EnSpire© (“PerkinElmer”, США) при 405 нм. Активность ингибитора выражали в ингибиторных единицах (TIU) [27].

Для определения пероксидазной активности супернатант разбавляли в 30–50 раз в ФБ (рН 6.2) и закапывали в лунки плоскодонных планшетов для иммуноанализа (“Nunc”, США) в следующем порядке: 75 мкл образца, 25 мкл 0.08%-ного орто-фенилендиамина, 25 мкл 0.016%-ной перекиси водорода. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 4 н серной кислоты.

Для определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) реакцию инициировали добавлением супернатанта к 65 мМ перекиси водорода в 50 мМ растворе ФБ (рН 7.8). Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 мин. Реакцию останавливали добавлением 32.4 мМ молибдата аммония. В контрольную пробу вместо супернатанта добавляли дистиллированную воду. Оптическую плотность измеряли на приборе для иммуноферментного анализа Benchmark Microplate Reader (“Bio-Rad”, США) при 490 нм (пероксидаза) и 410 нм (каталаза) [25].

Антагонистическая активность штамма. Для определения прямой противогрибковой активности штамма участок мицелия диаметром 5 мм,

взятый из 7-суточной культуры *A. solani*, помещали на одну сторону чашки Петри с картофельно-глюкозным агаром (КГА). Суспензию суточной культуры исследуемых штаммов бактерий наносили на другую сторону среды штрихом с использованием микробиологической петли (5 мкл). Двойную культуру культивировали при 25°C в течение 7 дней, в 5 повторностях [27].

Идентификация генов липопептидсинтетаз с помощью ПЦР. Геномную ДНК из клеток бактерий выделяли с помощью лизирующего буфера, содержащего 1% смолы Chelex100 (“BioRad Laboratories”, США), 1% Triton X100, 1% Tween 20. и 0.005% креолового красного. Гены липопептидсинтетаз идентифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами (табл. 1), подбор и проверка специфичности которых были выполнены при помощи сервисов Primer Explorer 5 (LAMP Primerdesigning Software: <http://primerexplorer.jp/e/>), VNT19 и BLAST NCBI. ПЦР проводили в амплификаторе ТП4-ПЦР-01- “Терцик” (“ДНК-Технология”, Москва, Россия). Праймеры к гену *Vac*, кодирующему 16S РНК *Bacillus* spp., использовались в качестве внутреннего контроля. Продукты ПЦР разделяли в 7%-ном ПААГ, окрашенном бромидом этидия.

Для определения протеолитической активности бактериальные клетки при помощи петли помещали на поверхность 3%-ного агара из обезжиренного молока в чашках Петри. Культуры выращивали в течение 48 ч при 37°C. Протеолитическая активность штаммов определялась путем измерения зон вокруг колоний на через 48 ч после размещения. Эксперименты проводились трижды в 5 повторностях.

Статистика. Все опыты проведены в 3–5 биологических и 3 аналитических повторностях.

Таблица 1. Праймеры, использованные для исследования присутствия генов липопептидсинтетаз *B. velezensis* M66

| Продукт гена | Номер гена в NCBI | Размер ПЦР-продукта, п.н. | Последовательность праймера, 5'→3' |
|--------------------------|-------------------|---------------------------|--|
| Фосфоантенил трансфераза | KT750873 | ~730 | ATGAAGATTTACGGAATTTA TTATAAAAGCTCTTCGTACG |
| Сурфактин синтетаза | EU882341 | ~675 | ATGAAGATTTACGGAATTTATATG TTATAAAAGCTCTTCGTACGAG |
| Итурин синтетаза А | D21876 | ~600 | ATGAAAATTTACGGAGTATATATG TTATAACAGCTCTTCATACGTT |
| Итурин синтетаза В | KR149331 | ~675 | AAGAAGGCGTTTTTCAAGCA CGACATACAGTTCTCCCGGT |
| Фенгицин синтетаза | AJ011849 | ~964 | TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT GCTGTCCGTTCTGCTTTTC |
| 16S рибосомальная РНК | NR102783 | ~800 | ACCAGAAAGCCACGGCTAАСТАС GGCGGAAACCCCTAАСТАС |

Экспериментальные данные выражали в виде средних значений \pm стандартные ошибки, значения которых рассчитывали для всех вариантов обработок с использованием MS Excel. Значимость различий оценивали с применением однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Дункана ($p < 0.05$) с помощью программного обеспечения STATISTICA 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка числа жизнеспособных клеток бактерий в тканях растений картофеля показала присутствие $100.7 \times 10^4 \pm 18.13$ КОЕ *B. velezensis* М66 на г сырой массы побегов к 30 сут после инокуляции, что статистически не отличалось от показателей, характерных для *B. subtilis* 26Д (табл. 2). В корнях растений содержание бактерий было на порядок меньше для обоих штаммов. Впервые было показано, что во внутренней части полученных на экспериментальных растениях микроклубнях содержатся бактерии, $4.0 \times 10^4 \pm 1.35$ КОЕ *B. subtilis* 26Д на г сырой массы, и несколько меньше у *B. velezensis* М66 — $2.7 \times 10^4 \pm 0.38$ КОЕ на г сырой массы клубня. Таким образом, исследованные штаммы бактерий персистируют в растительных тканях длительное время и способны заселять в том числе формирующиеся клубни, что открывает перспективы защиты растений в том числе в послеуборочный период. Ранее было показано, что обработка клубней картофеля бактериями *B. subtilis* 26Д [27] и *B. subtilis* 10—4 [29] перед закладкой на хранение способствовало увеличению их устойчивости к *P. infestans* и *Fusarium oxysporum* Schldl., 1824 при искусственном инфицировании, и, вероятно, этот эффект был связан с их проникновением во внутренние ткани клубня.

Ранее было показано, что под влиянием салициловой кислоты происходит увеличение количества клеток бактерии *B. subtilis* 26Д в тканях побегов картофеля, что может быть одним из факторов, обуславливающих более высокий защитный эффект против фитофтороза, чем в варианте обработки только *B. subtilis* 26Д, на фоне крайне низкого воздействия взятой концентрации салициловой кислоты на устойчивость растений к патогену [26].

Обработка растений картофеля исследуемыми штаммами приводила к существенному снижению проявления симптомов альтернариоза на листьях. При этом достоверных различий между бактериальными обработками не наблюдалось (рис. 1а), как и в антагонистической активности штаммов против возбудителя альтернариоза, что выражалось в значительном подавлении роста мицелия гриба на среде КГА (рис. 1б).

Антагонистическая активность исследуемых штаммов *in vitro* может объясняться биосинтезом липопептидных антибиотиков. Так, широко

Таблица 2. Количество жизнеспособных клеток (КОЕ) бактерий *B. velezensis* М66 в тканях картофеля через 30 сут после инокуляции

| Штамм | Содержание КОЕ, 10^4 /г сырой массы | | |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------|
| | Побег | Корень | Клубень |
| <i>B. subtilis</i> 26Д | 79.2 ± 14.46^a | 16.5 ± 3.65^b | 4.0 ± 1.35^c |
| <i>B. velezensis</i> М66 | 100.7 ± 18.13^a | 9.8 ± 2.03^b | 2.7 ± 0.38^c |

Примечание. Разными буквами обозначены показатели, имеющие статистически значимые отличия друг от друга ($p \leq 0.05$).

изученный штамм *B. subtilis* 26Д синтезирует значительное количество сурфактина, что было показано методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрораспылительного масс-спектрометрического детектирования [15, 30]. Этот штамм обладает генами сурфактинсинтетазы и фенгицинсинтетазы. В геноме штамма *B. velezensis* М66 было определено наличие последовательности (~600 п.н.) гена итуринсинтазы А, ключевого фермента биосинтеза липопептида итурина (рис. 2а). Помимо этого, исследуемые штаммы имели сравнимую протеолитическую активность, что выражалось в наличии гало вокруг колоний на 3%-ном сухом молоке (рис. 2б).

Эндофитные микроорганизмы принимают активное участие в защите растений, не только конкурируя с патогенами за экологическую нишу [5, 10], но и стимулируя защитные механизмы растений [6, 17, 20]. Так, анализ биохимических показателей выявил, что исследуемые штаммы бактерий практически не оказывали влияние на состояние про-/антиоксидантной системы и активность ингибиторов протеиназ в неинфицированных растениях (рис. 3). Заражение возбудителем альтернариоза растений картофеля, обработанных водой и обоими штаммами бактерий, способствовало одинаковому (около 20%) увеличению содержания пероксида водорода через 1 ч после нанесения спор патогена. Через 24 ч после инфицирования этот уровень сохранился в растениях, обработанных водой и клетками *B. velezensis* М66, а в обработанных клетками *B. subtilis* 26Д — вернулся к контрольным показателям. Важно отметить, что через 6 сут после инфицирования в растениях, не содержащих бактерий, наблюдалось двукратное повышение содержания пероксида водорода относительно контрольных показателей, что, вероятно, отражает процессы развития болезни под воздействием некотрофного патогена *A. solani* [4]. Под действием исследуемых бактериальных штаммов содержание пероксида водорода через 6 сут после инфицирования, напротив, снижалось относительно здоровых растений, обработанных водой. Следует отметить,

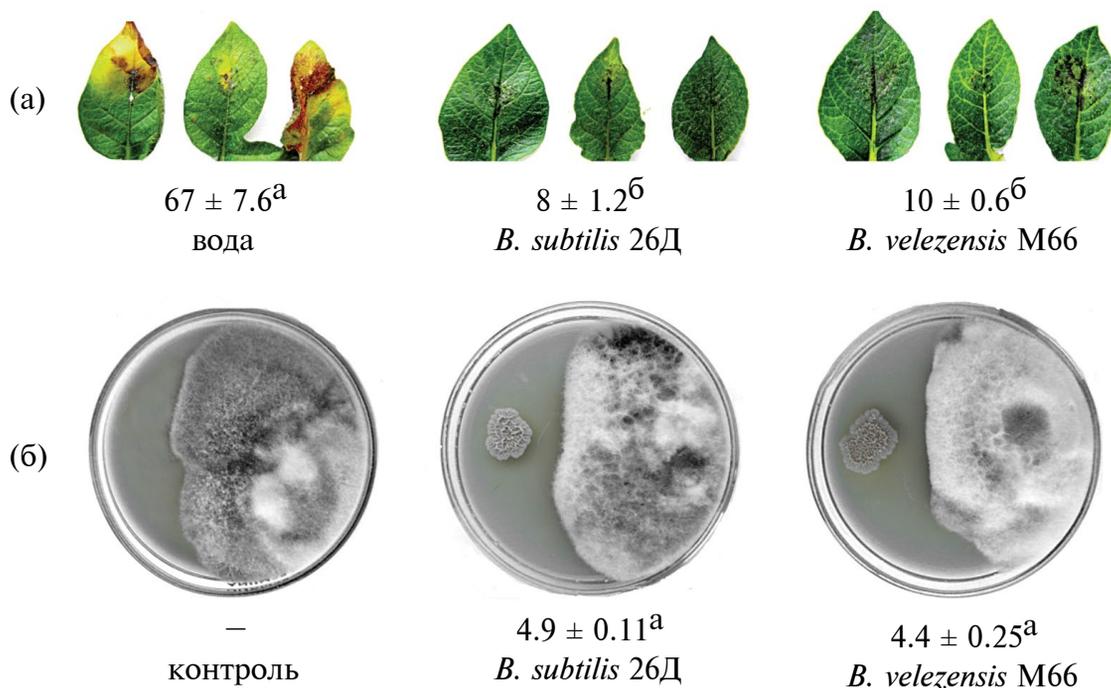


Рис. 1. Площадь проявления симптомов альтернариоза (а) на листьях картофеля в контроле и под влиянием *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* M66 (цифрами показан % пораженной площади листовой пластинки), и подавление роста культуры гриба *A. solani* (б) исследуемыми штаммами (цифрами показано расстояние между колониями бактерии и гриба). Разными буквами обозначены статистически значимые отличия показателей (при $p \leq 0.05$).

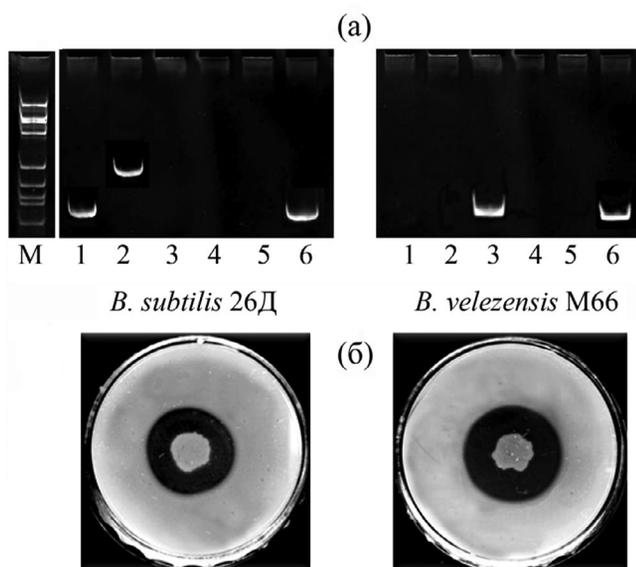


Рис. 2. Антагонистические свойства *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* M66 против патогенов. (а) – фотография полиакриламидного геля после разделения продуктов ПЦР последовательностей ДНК бактерий с праймерами к генам, кодирующими ферменты биосинтеза липопептидов: 1 – фосфопантетеинил трансфераза; 2 – сурфактин синтаза; 3 – итуринсинтаза А; 4 – итуринсинтаза В; 5 – фенгицинсинтаза; 6 – ген домашнего хозяйства 16S рРНК; (б) – рост колоний *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* M66 на 3%-ном обезжиренном молочном агаре.

что через 1 ч и через 24 ч после инфицирования в растениях, обработанных бактериями, поддерживалась повышенная относительно контрольных показателей активность каталазы. Вероятно, это позволило деактивировать перекись водорода в растительных клетках, сохраняя их жизнедеятельность. Точно также, как и в экспериментах в настоящей работе, эндофитный гриб *Aspergillus terreus* Thom, 1918, выделенный из листьев базилика *Ocimum basilicum* L., продемонстрировал непосредственную противогрибковую активность против гриба *A. solani*, а заражение обработанных этим грибом растений баклажана патогеном *A. solani* вызывало повышение уровня активности супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы, что было причиной меньшего развития пятнистости [31]. Обработка растений альгинатом натрия также существенно снизила пораженность *A. solani* и значительное повышение уровня экспрессии гена супероксиддисмутазы [20]. продуцирующий липопептиды (в основном, фенгицин) штамм *B. subtilis* СтрхS2-1 показал высокую противогрибковую активность против *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, 1968, а так же способность индуцировать физиологическую устойчивость растений люпина против этого патогена. Авторы публикации связали это с увеличением уровня транскриптов хозяйских генов PR-1, PR-4, SOD, PIN-1

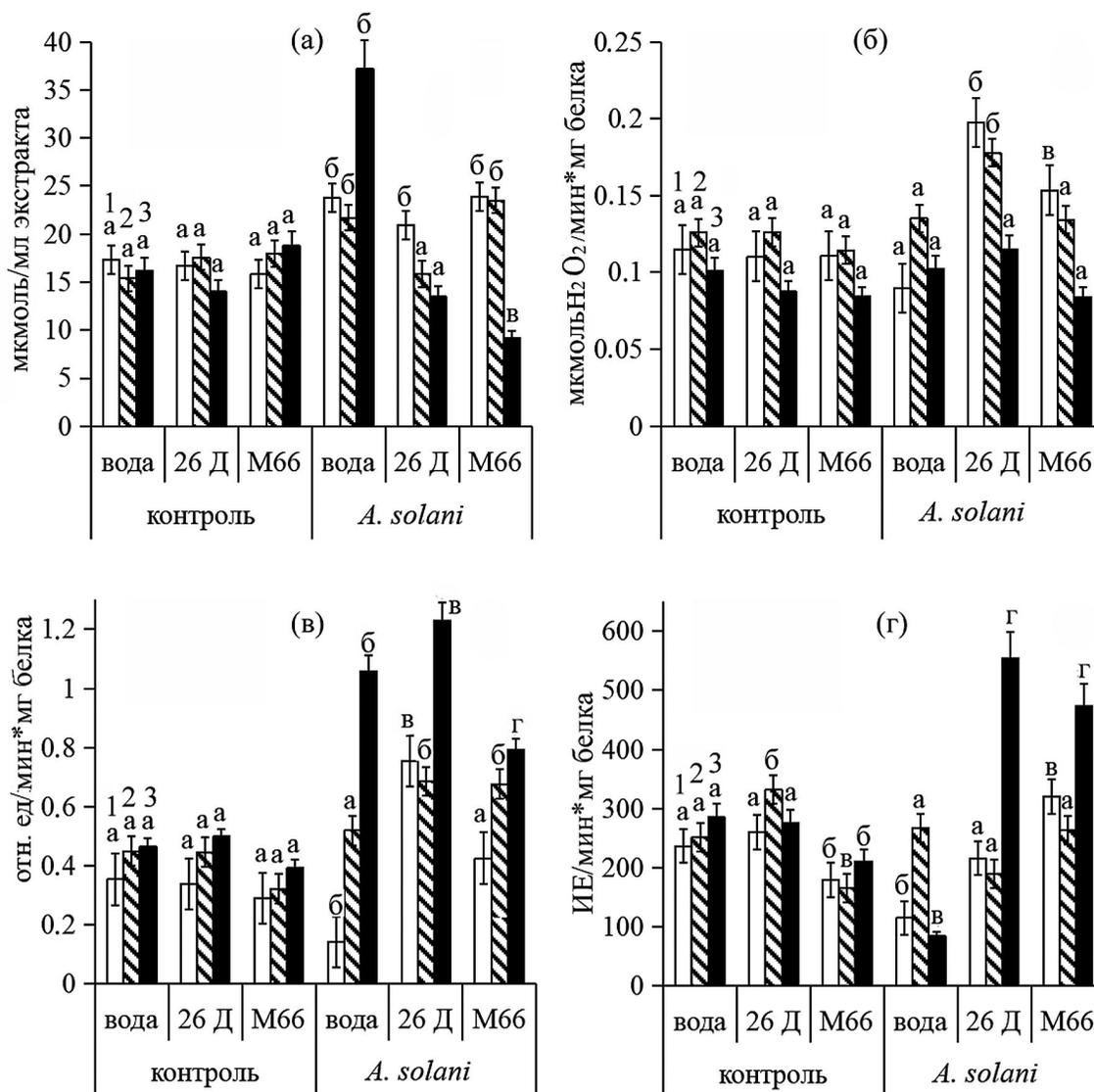


Рис. 3. Влияние бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* М66 на содержание пероксида водорода (а), активность каталазы (б), пероксидаз (в) и ингибиторов трипсина (г) в здоровых и инфицированных возбудителем альтернариоза растениях картофеля: 1 – 1 ч, 2 – 24 ч, 3 – 6 сут после нанесения спор патогена. Разными буквами обозначены статистически значимые отличия показателей, наблюдаемых в соответствующей временной точке (при $p \leq 0.05$).

и PIN-3, а также увеличением активности каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы [32].

Обращает на себя внимание двукратное снижение активности пероксидаз в инфицированных *A. solani* контрольных растениях через 1 ч (увеличение этого параметра произошло только через 6 сут) и ингибиторов протеиназ через 1 час и 6 сут после нанесения спор патогена, что указывает на активное подавление иммунных реакций растений патогеном в этом варианте. При этом через 1 ч после инфицирования в обработанных *B. subtilis* 26Д растениях картофеля увеличивалась активность пероксидаз (на 1/3 относительно контрольных показателей), а в обработанных *B. velezensis* М66 – активность ингибиторов протеиназ. В обоих случаях

активность ингибиторов протеиназ и пероксидаз была выше контрольных показателей на поздних этапах взаимодействия с патогеном как в случае *B. velezensis* М66, так и *B. subtilis* 26Д. Так как одним из основных факторов агрессивности патогенов являются продуцируемые ими гидролазы, обеспечивающие внедрение гриба в ткани, например, за счет разрушения клеточных стенок растений и деградации защитных белков [18], выработка их ингибиторов в растениях может быть эффективным механизмом ограничения патогенного процесса.

Полученные результаты показали эффективность биопрепарата на основе эндофитных бактерий *B. velezensis* М66, сравнимую с широко применяемым штаммом *B. subtilis* 26Д в защите растений

картофеля от альтернариоза как путем прямого воздействия на патоген, который наблюдали *in vitro*, так и индуцирования ими защитного ответа, связанного с регуляцией редокс-статуса растений и выработки ими ингибиторов протеиназ. Использование *B. velezensis* М66 в качестве компонентов биопрепаратов для защиты растений благодаря глубокой интеграции в систему регуляции фитоиммунного потенциала растений, невысокой стоимости, низкой энергоемкости при производстве, возможность сочетания с другими профилактическими мерами, неспособность вызывать инфекционные процессы в организме человека и животных, и непатогенности для растений является весьма перспективным.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 24-26-00025 “Перспектива применения выделенных на территории Южного Урала эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к комплексу биотических факторов среды”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных либо с участием людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fagodiya R.K., Trivedi A., Fagodia B.L.* // Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 6131–6147. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10108-z>
2. *Fernandes C., Casadevall A., Gonçalves T.* // FEMS Microbiol. Rev. 2023. V. 47. № 6. A. fuad061. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad061>
3. *Miranda-Apodaca J., Artetxe U., Aguado I., Martin-Souto L., Ramirez-Garcia A., Lacuesta M., et al.* // Plants. 2023. V. 12. № 6. P. 1304–1321. <https://doi.org/10.3390/plants12061304>
4. *Brouwer S.M., Odilbekov F., Burra D.D., Lenman M., Hedley P.E., Grenville-Briggs L., et al.* // Plant Mol. Biol. 2020. V. 104. № 1–2. P. 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01019-6>
5. *Wu X., Wang Z., Zhang R., Xu T., Zhao J., Liu Y.* // Archives of Microbiology. 2022. V. 204. № 4. P. 213. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02824-x>
6. *Kim J.A., Song J.S., Kim P.I., Kim D.H., Kim Y.* // J. of Fungi. 2022. V. 8. № 10. P. 1053. <https://doi.org/10.3390/jof81010532>
7. *Liu H., Jiang J., An M., Li B., Xie Y., Xu C., Jiang L., Yan F., Wang Z., Wu Y.* // Front Microbiol. 2022. V. 13. A. 840318. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840318>
8. *Chen L., Wu Y.D., Chong X.Y., Xin Q.H., Wang D.X., Bian K.* // J. Appl. Microbiol. 2022. V. 128. P. 803–813. <https://doi.org/10.1111/jam.14508>
9. *Maksimov I.V., Singh B.P., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Khairullin R.M.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 14. P. 15–28. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010135>
10. *Liu D., Li K., Hu J., Wang W., Liu X., Gao Z.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20(12). P. 2908. <https://doi.org/10.3390/ijms20122908>
11. *Andri S., Meyer T., Rigolet A., Prigent-Combaret C., Höfte M., Balleux G. et al.* // Microbiol. Spectr. 2021. V. 9. A. e0203821. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02038-21>
12. *Cawoy H., Debois D., Franzil L., De Pauw E., Thonart P., Ongena M.* // Microb. Biotechnol. 2015. V. 2. P. 281–295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
13. *Fazle Rabbee M., Baek K.H.* // Molecules. 2020. V. 25. № 21. P. 4973–4985. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
14. *Sui X., Han X., Cao J., Li Y., Yuan Y., Gou J. et al.* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. A. 940156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.940156>
15. *Черепанова Е.А., Галяутдинов И.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В.* // Прикл. биохимия микробиология. 2021. Т. 57. №?? С. 496–503. <https://doi.org/10.31857/S0555109921050032>
16. *Cheffi M., Bouket A.C., Alenezi F.N., Luptakova L., Belka M., Vallat A., et al.* // Microorganisms. 2019. V. 7. № 9. P. 314. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090314>
17. *Liu S., Zha Z., Chen S., Tang R., Zhao Y., Lin Q., Duan Y., Wang K.* // J. Sci. Food. Agric. 2023. V.103. № 5. P. 2675–2680. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12272>
18. *Kudriavtseva N.N., Sofin A.V., Revina T.A., Gvozdeva E.L., Ievleva E.V., Valueva T.A.* // App. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49. № 5. P. 513–521. <https://doi.org/10.7868/S0555109913050073>
19. *Cho Y.* // Eukary Cell. 2015. V. 14. P. 335–344. <https://doi.org/10.1128/EC.00226-14>
20. *Dey P., Ramanujam R., Venkatesan G., Nagarathnam R.* // PLoS One. 2019 V. 14(9). A. e0223216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223216>
<http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc> (available on 25.05.2024)
21. *Sorokan A., Veselova S., Benkovskaya G., Maksimov I.* // Plants. 2021. V. 10. P. 923–938. <https://doi.org/10.3390/plants10050923>
22. *Ганнибал Ф.Б.* /Ред. М.М. Левитина. СПб.: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии., 2011. 70 с.
23. *Ганнибал Ф.Б., Орина А.С.* // Микология и фитопатология. 2022. Т. 56. № 6. с. 431–440

24. Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. // Plant Dis. 2012. V. 96. № 1. P. 4–17. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0458>
25. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Максимов И.В. // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. Т. 53. С. 109–130. <https://doi.org/10.17223/19988591/53/6>
26. Sorokan A., Benkovskaya G., Burkhanova G., Vlagova. D., Maksimov. I. // Plants. 2020. V. 9. A. 1115. <https://doi.org/10.3390/plants9091115>
27. Максимов И.В., Пусенкова Л.И., Абизгильдина Р.Р. // Агрохимия. 2011. № 6. С. 43–48.
28. Lastochkina O., Baymiev A., Shayahmetova A., Garshina D., Koryakov I., Shpirnaya I. et al. // Plants. 2020. V. 9. P. 76–81. <https://doi.org/10.3390/plants9010076>
29. Rumyantsev S.D., Alekseev V.Y., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Garafutdinov R.R. et al. // Life. 2023. V. 13. P. 214–226. <https://doi.org/10.3390/life13010214>
30. Attia M.S., Hashem A.H., Badawy A.A. // Bot. Stud. 2022. V. 63. P. 26–38. <https://doi.org/10.1186/s40529-022-00357-6>
31. Yáñez-Mendizábal V., Falconí C.E. // Biotechnol. Lett. 2021. V. 43. № 3. P. 719–728. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03066-x>

Influence of Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis* 26D and *Bacillus velezensis* M66 on the Resistance of Potato Plants to the Early Blight Pathogen *Alternaria solani*

A. V. Sorokan^{a, *}, V. F. Gabdrakhmanova^a, I. S. Mardanshin^b, and I. V. Maksimov^a

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – a separate structural division of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkir Research Institute of Agriculture – a separate structural division of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450059 Russia*

*e-mail: fourtyanns@googlegmail.com

The effect of *Bacillus velezensis* M66 and *Bacillus subtilis* 26D bacteria on the resistance of potato plants to the causative agent of potato early blight necrotrophic fungus *Alternaria solani* was studied. For the first time, accumulation of viable bacterial cells of these strains in the internal tissues of potato stems, roots and tubers over a long period of time was shown. A significant reduction of the damaged by the early blight area of leaves inoculated with plant endophytes was revealed, as well as inhibition of pathogen growth under the influence of bacterial strains, which can be explained by the synthesis of lipopeptide antibiotics, the genes responsible for the synthesis of which were detected by PCR, and proteolytic enzymes, the activity of which was shown *in vitro*. Increase of plant resistance to the pathogen under the influence of inoculation with *B. subtilis* 26D and *B. velezensis* M66 was accompanied by the accumulation of hydrogen peroxide in the first hours after infection of plants with *A. solani* spores and a decrease in this parameter at the late stages of pathogenesis due to an increase of the activity of catalase and peroxidases. Limitation of the spread of the fungus was accompanied by an increase in the activity of proteinase inhibitors, which probably reduced the negative impact of proteolytic enzymes of the necrotrophic pathogen *A. solani* on plants. It can be assumed that inoculation of plants with bacterial cells of the *B. velezensis* M66 strain contributed to the increase of plant resistance to the early blight effectively priming the phytoimmune potential, comparable to the *B. subtilis* 26D strain, the active component of the biopreparation Fitosporin-M, which successfully used under the field conditions, .

Keywords: potato, *Bacillus velezensis* M66, *B. subtilis* 26D, endophytes, *Alternaria solani*, phytoimmunity, pro-/antioxidant system, proteinase inhibitors