

Сигнальная регуляция активности защитных белков в растениях картофеля *in vitro* при поражении возбудителем фитофтороза

© 2019. Л. Г. Яруллина^{1,2}, д. б. н., профессор, в. н. с.,
А. В. Сорокань¹, к. б. н., н. с., Г. Ф. Бурханова¹, к. б. н., н. с.,
В. О. Цветков², к. б. н., доцент,

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
450054, Россия, г. Уфа, пр. Октября, д. 71,

²Башкирский государственный университет,
450076, Россия, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32,
e-mail: yarullina@bk.ru

Проведена сравнительная оценка влияния различных сигнальных молекул – салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот, хитоолигосахаридов (ХОС), метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* (МБ) на активность защитных белков в растениях *Solanum tuberosum* L. при инфицировании оомицетом *Phytophthora infestans* Mont. de Bary. Исследования проводили на пробирочных растениях картофеля восприимчивого сорта Ранняя Роза. Выявлено, что обработка растений СК, ЖК, ХОС и МБ способствует снижению степени поражённости листьев картофеля *P. infestans* и оказывает стимулирующее действие на концентрацию пероксида водорода (H₂O₂) и транскрипционную активность генов патоген-индуцируемых белков (PR-белков) (ингибиторов гидролаз, хитиназ, пероксидаз). Обсуждаются возможные механизмы повышения устойчивости картофеля к возбудителю фитофтороза экологически безопасными соединениями.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, сигнальные молекулы, PR-белки, экологически безопасное растениеводство.

Signal regulation of activity of protective proteins in potato plants *in vitro* with the defeat potato late blight

© 2019. L. G. Yarullina^{1,2} ORCID: 0000-0003-1459-0067, A. V. Sorokan¹ ORCID: 0000-0002-0443-7547,
G. F. Burkhanova¹ ORCID: 0000-0003-2346-3502, V. O. Tsvetkov² ORCID: 0000-0001-9646-478X,

¹Institute of Biochemistry and Genetics,
71, Prospekt Oktyabrya, Ufa, Russia, 450054,

²Bashkir State University,
32, Zaki Validi St., Ufa, Russia, 450076,
e-mail: yarullina@bk.ru

A comparative assessment of the influence of various signal molecules – salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids, chitoooligosaccharides (COS), metabolites of *Bacillus subtilis* bacteria (MB) on the degree of infestation of the leaves and the activity of protective proteins in the plants of *Solanum tuberosum* L. infected with oomycete *Phytophthora infestans* Mont. de Bary is carried out. Studies were carried out on test-tube plants of potato of susceptible variety Early rose. It is revealed that processing plants SA, JA, COS and MB reduces the degree of infestation of potato leaves by *P. infestans*, but at varying degrees. The best protective effect provided the JA and the *B. subtilis* 26D bacterial strain. Treatment with SA, JA, COS and *B. subtilis* increased the level of H₂O₂ in potato plants. COS and *B. subtilis* 11VD had earlier stimulating effect on the production of hydrogen peroxide (24 h after infection). The maximum stimulating effect on the production of H₂O₂ in the case with treatment with SA and *B. subtilis* 26D at 48 hours after inoculation was revealed. SA and JA had a stimulating effect on the transcriptional activity of amylase inhibitor and proteinase inhibitor genes in uninfected potato plants and especially in infected ones. The possible mechanisms of increasing the resistance of potatoes to the pathogen of late blight by environmentally safe compounds are discussed. Very promising for potato plants is the creation and use of environmentally friendly drugs, the protective effect of which against *P. infestans* is based on the stimulation of H₂O₂ production and activation of hydrolase inhibitor gene expression in infected tissues.

Keywords: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, signal molecules, PR-proteins, environmentally safe crop production.

В условиях высокой антропогенной нагрузки на агроэкосистемы остро встаёт вопрос экологически безопасного растениеводства, требующего новых подходов к защите растений от патогенов. Предполагается, что важную роль в защите от патогенов играют мобильные сигнальные элементы, последовательно формирующие системную устойчивость к патогенам [1]. Сигнальные молекулы могут быть как эндогенного (растительного), так и экзогенного (патогенного) происхождения [2]. Наиболее эффективными экзогенными сигнальными молекулами считаются производные хитона, в частности, низкомолекулярные водорастворимые хитоолигосахариды (ХОС) [3].

Салициловая кислота (СК) и жасмоновая кислота (ЖК) являются эндогенными сигнальными молекулами, механизм защитного действия которых связан с индукцией генерации активных форм кислорода (АФК) в растительных тканях. Эти вещества, сами не обладая антимикробной активностью, стимулируют защитные реакции клеток растений посредством активации синтеза ряда связанных с патогенезом белков, в том числе и ингибиторов гидролаз патогенов [4].

Большое значение в сигнальной регуляции устойчивости к патогенам отводят непатогенным ризобактериям, регулирующим рост растений (**plant growth promoting rhizobacteria**, PGPR). Большинство из них запускают каскад защитных реакций за счёт выработки различных метаболитов [5], в том числе веществ пептидной природы, обладающих противовирусным, бактерицидным, фунгицидным и инсектицидным действием [6].

Особый интерес представляют циклические низкомолекулярные липопептиды – сурфактин, итурин и фенгизин [7]. В частности, сурфактины запускают в растениях табака активную генерацию H_2O_2 и ряда компонентов оксипириновой сигнальной системы, включая ингибиторы протеиназ [8].

Поскольку СК, ЖК, ХОС, PGPR положительно влияют на устойчивость растений, они находят широкое применение в сельскохозяйственной практике. В то же время, механизмы формирования защитного ответа недостаточно изучены. Подобные исследования являются важными для патосистемы картофель – возбудитель фитофтороза, учитывая широкое распространение этого заболевания в России.

Целью работы было изучить влияние салициловой и жасмоновой кислот, хитоолигосахаридов и метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* на активность защитных соединений

в растениях картофеля при инфицировании возбудителем фитофтороза.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований были пробирочные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя Роза. Растения культивировали *in vitro* в течение 30 сут на агаризованной среде Мурасиге и Скуга (МС), содержащей СК, ЖК или ХОС в конечных концентрациях 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-6} М соответственно. Часть растений через 20 сут после посадки инокулировали суспензией бактерий штаммов *Bacillus subtilis* 26Д и 11ВД путём нанесения клеток микробиологической петлёй на основание стебля (конечный титр 10^8 кл./мл). Растения инфицировали нанесением 5 мкл суспензии 10^5 зооспор/мл оомицета *Phytophthora infestans* Mont. de Bary (штамм Башкирский) на лист. Контролем служили неинфицированные и инфицированные растения, растущие на среде МС.

Развитие болезни наблюдали в течение 5 сут и оценивали по четырёхбалльной шкале, где листья без симптомов фитофтороза оценивали как 0 баллов, наличие симптомов болезни и поражение листа от 1 до 25% как 1, от 26 до 50% как 2; от 51 до 75% как 3 и более 75% – 4.

Определение содержания H_2O_2 . Растительный материал гомогенизировали в 0,025 М фосфатном буфере, pH 6,2 (ФБ), в соотношении 1:3, центрифугировали 20 мин при 10000 g. В супернатанте определяли содержание H_2O_2 спектрофотометрически при 560 нм с использованием ксиленолового оранжевого [9].

Оценка транскрипционной активности генов патоген-индуцируемых белков. РНК из растений выделяли с помощью тризола (Molecular Research Center, Inc., США). Для получения кДНК на основе мРНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы согласно протоколу фирмы-поставщика. Анализ накопления транскриптов генов ингибитора амилазы (номер в GenBank XM006351484), хитиназы (номер в GenBank U49969.1), ингибитора протеиназы (номер в GenBank JX683427) и пероксидазы (номер в GenBank M21334) проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе «iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad», США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I («Синтол», Россия). Изменения в транскрипционной активности

генов (оценка числа копий мРНК) определяли относительного референсного гена *St_act* («ген домашнего хозяйства», актин, номер из GenBank X55749) с помощью программного обеспечения «iCycler iQ5 Real-Time Detection System software» («Bio-Rad», США). Анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета программ Lasergene фирмы «DNASTAR» (США).

Статистическая обработка проводилась в программе Statistica 6.0. Эксперименты включали не менее трёх биологических повторов. На рисунках и в таблицах приведены средние результаты повторов и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

Влияние сигнальных молекул на развитие симптомов фитофтороза и содержание пероксида водорода в листьях картофеля при инфицировании *P. infestans*. Исследования показали, что степень поражённости листьев картофеля через 5 сут после инокуляции *P. infestans* в контроле составляла 84,1±7,0% (рис. 1). На растениях, культивируемых на среде с добавлением исследуемых соединений, наблюдалось снижение степени развития симптомов заболевания фитофторозом: в вариантах опыта с СК и ХОС до 68,0±6,7 и 60,3±5,4%, с ЖК – до 40,5±3,5%, а с обработкой штаммами *B. subtilis*

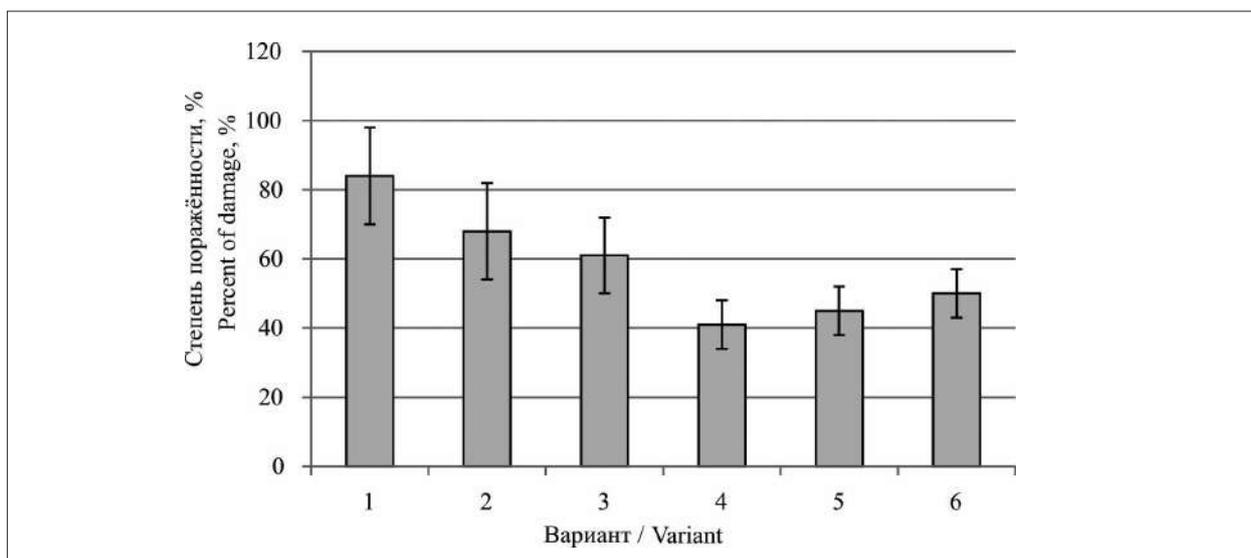


Рис. 1. Степень поражённости листьев картофеля через 5 сут после инокуляции *P. infestans*: 1 – контроль; 2 – СК; 3 – ХОС; 4 – ЖК; 5 – *B. subtilis* 26Д; 6 – *B. subtilis* 11ВД
Fig. 1. The degree of damage of potato leaves at 5 days after inoculation: 1 – control; 2 – SA; 3 – COS; 4 – JA; 5 – *B. subtilis* 26D; 6 – *B. subtilis* 11VD

Таблица 1 / Table 1

Изменение содержания H₂O₂ (мкмоль/г сырого веса) в картофеле при обработке сигнальными молекулами и инфицировании *P. infestans* / Changes in H₂O₂ (μmol/g raw weight) content in potato during treatment with signal molecules and infection of *P. infestans*

Варианты / Variants	Время после инокуляции, ч / Time after inoculation, h		
	24	48	72
Контроль / Control	2,3±0,1	3,3±0,2	2,6±0,1
Инфицирование / Infection	2,8±0,2	3,9±0,3	2,1±0,2
СК / SA	3,1±0,1	4,2±0,3	2,6±0,2
СК + <i>P. infestans</i> / SA + <i>P. infestans</i>	3,9±0,2	6,4±0,5	2,8±0,1
ЖК / JA	3,5±0,2	5,7±0,4	3,9±0,2
ЖК + <i>P. infestans</i> / JA + <i>P. infestans</i>	4,3±0,4	7,8±0,6	6,7±0,5
ХОС / COS	3,4±0,3	5,2±0,5	2,7±0,2
ХОС + <i>P. infestans</i> / COS + <i>P. infestans</i>	6,9±0,5	5,9±0,4	3,3±0,3
<i>B. subtilis</i> 26Д / <i>B. subtilis</i> 26D	4,1±0,2	5,4±0,4	4,9±0,3
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>P. infestans</i> / <i>B. subtilis</i> 26D + <i>P. infestans</i>	5,2±0,3	7,2±0,6	5,1±0,4
<i>B. subtilis</i> 11ВД / <i>B. subtilis</i> 11VD	3,8±0,2	4,9±0,3	4,2±0,2
<i>B. subtilis</i> 11ВД + <i>P. infestans</i> / <i>B. subtilis</i> 11VD + <i>P. infestans</i>	5,9±0,5	6,1±0,6	4,8±0,3

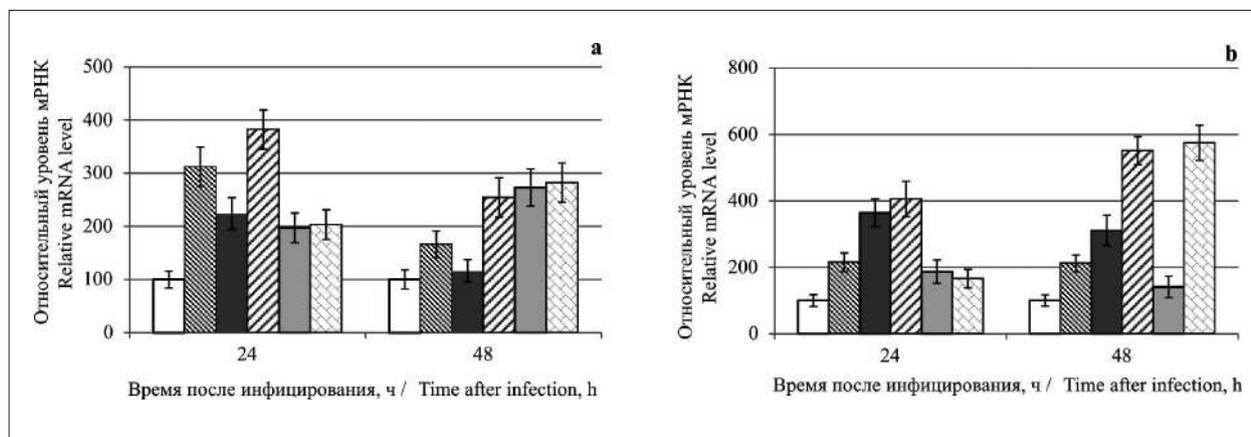


Рис. 2. Транскрипционная активность гена ингибитора амилазы (а) и ингибитора протеиназы (б) в листьях картофеля при обработке СК, ЖК и заражении *P. infestans*, в % к контролю (100%): 1 – контроль; 2 – *P. infestans*; 3 – обработка СК; 4 – СК+ *P. infestans*; 5 – обработка ЖК; 6 – ЖК + *P. infestans*. За единицу экспрессии принимали уровень транскрипционной активности целевых генов в контрольных неинфицированных растениях без обработки

Fig. 2. Changes in the transcriptional activity of the amylase inhibitor (a) and proteinase inhibitor (b) gene in potato leaves under the influence of treatment with SA, JA, and *P. infestans* infection, percent of control (100%): 1 – control; 2 – *P. infestans*; 3 – SA; 4 – SA + *P. infestans*; 5 – JA; 6 – JA + *P. infestans*. The level of transcriptional activity of target genes in control uninfected plants without treatment was taken as a unit of expression

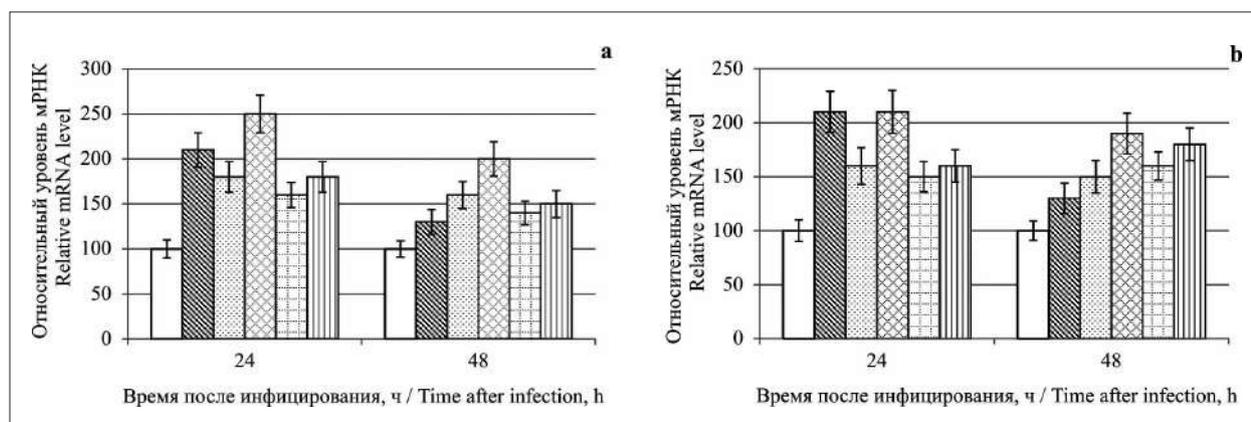


Рис. 3. Изменение транскрипционной активности генов ингибитора амилазы (а) и ингибитора протеиназы (б) в растениях картофеля сорта Ранняя Роза под влиянием обработки *B. subtilis* и инфицирования *Ph. infestans*, % к контролю (100%): 1 – контроль; 2 – *P. infestans*; 3 – обработка *B. subtilis* 26Д; 4 – *B. subtilis* 26Д + *P. infestans*; 5 – обработка *B. subtilis* 11ВД; 6 – *B. subtilis* 11ВД + *P. infestans*. За единицу экспрессии принимали уровень транскрипционной активности генов в контрольных неинфицированных растениях без обработки

Fig. 3. Changes in transcriptional activity of genes of amylase inhibitor (a) and proteinase inhibitor (b) in potato plants of Early Rose variety under the influence of treatment with *B. subtilis* and *P. infestans* infection, % of control (100%). 1 – control; 2 – *P. infestans*; 3 – *B. subtilis* 26D; 4 – *B. subtilis* 26D + *Ph. infestans*; 5 – *B. subtilis* 11VD; 6 – *B. subtilis* 11VD + *P. infestans*. The transcriptional activity level of genes in control uninfected plants without treatment taken as a unit of expression

26Д и 11ВД – до $45,1 \pm 2,8$ и $49,8 \pm 2,8$ % соответственно. Все исследуемые соединения повышали устойчивость к инфицированию, но в различной степени. Наилучший стимулирующий эффект оказывали ЖК и штамм бактерий *B. subtilis* 26Д (рис. 1).

Как показали эксперименты, инфицирование *P. infestans*, обработка СК, ЖК, ХОС и *B. subtilis* повышали уровень H_2O_2 в растениях картофеля (табл. 1). ХОС и *B. subtilis* 11ВД оказывали более раннее стимулирующее дей-

ствие на продукцию пероксида водорода (через 24 ч после инфицирования). Выявлен максимальный стимулирующий эффект на продукцию H_2O_2 в варианте с обработкой ЖК и *B. subtilis* 26Д через 48 ч после инокуляции.

Образование АФК является одним из наиболее ранних ответов на контакт с патогеном, в результате чего индуцируется, в частности, синтез PR-белков [10]. H_2O_2 можно рассматривать как важнейшую молекулу, вовлечённую в передачу внутриклеточных сигналов,

регулирующих экспрессию генов и активность защитных систем.

Изменение транскрипционной активности генов PR-белков в растениях картофеля под воздействием сигнальных молекул и *P. infestans*. Основным орудием нападения патогенов являются гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки и обеспечивающие внедрение гриба в ткани [11]. Защитная реакция растений сопровождается синтезом ингибиторов этих ферментов [12]. В наших исследованиях СК и ЖК оказывали стимулирующее действие на транскрипционную активность генов ингибитора амилазы (рис. 2а) и ингибитора протеиназы (рис. 2б) в незараженных растениях картофеля, но особенно – при заражении.

Схожие результаты получены при исследовании генов PR-белков под воздействием *B. subtilis* (рис. 3) и ХОС (рис. 4). Так, обработка *B. subtilis* повышала транскрипционную активность генов ингибиторов амилазы и

протеиназы (рис. 3). Причём под воздействием *B. subtilis* 26Д высокая транскрипционная активность генов ингибиторов сохранялась в течение 48 ч.

В индукцию защитного ответа растений картофеля к *P. infestans* под воздействием ХОС вовлекаются различные PR-белки. Так, при обработке ХОС усиливается транскрипционная активность генов ингибитора амилазы, ингибитора протеиназы, хитиназы и пероксидазы (рис. 4).

Представители рода *Phytophthora* используют для расщепления крахмала ферменты картофеля, активируя их биосинтез в поражённых клубнях [13]. Можно предположить, что усиление транскрипции ингибиторов амилазы препятствует росту *P. infestans*.

Усиление транскрипции гена ингибитора протеиназы повышает устойчивость картофеля (рис. 2). Ключевую роль в инициации образования ингибиторов протеаз играет мембранный рецептор системин. Он вызывает деполя-

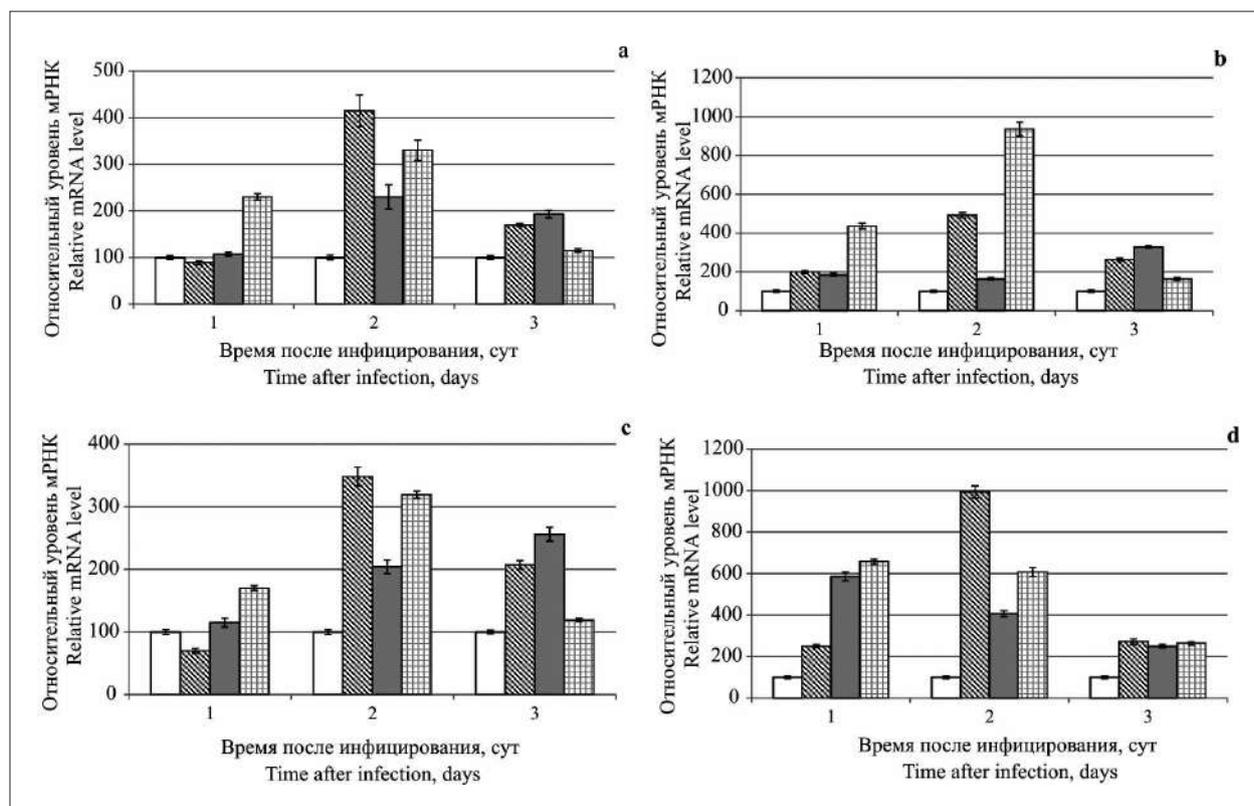


Рис. 4. Изменение транскрипционной активности генов ингибитора амилазы (а), хитиназы (б), протеиназы (с) и пероксидазы (д) в растениях картофеля сорта Ранняя Роза под влиянием обработки ХОС и инфицирования *P. infestans*, % к контролю (100%): 1 – контроль; 2 – *P. infestans*; 3 – обработка ХОС; 4 – ХОС + *P. infestans*. За единицу экспрессии принимали уровень транскрипционной активности генов в контрольных неинфицированных растениях без обработки
Fig. 4. The change in transcriptional activity of inhibitor of amylase (a), chitinase (b), inhibitor of proteases (c), and peroxidase (d) genes in plants of the potato Early Rose variety under the effect of the treatment with COS and *P. infestans* infection, % of control (100%): 1 – control; 2 – *P. infestans*; 3 – COS; 4 – COS + *P. infestans*. The transcriptional activity level of genes in control uninfected plants without treatment taken as a unit of expression

ризации мембраны, что приводит к открытию ионных каналов и резкому повышению уровня ионов кальция в клетке. В результате активируются МАР-киназы и фосфолипазы и образуется жасмоновая кислота, которая, вероятно, и служит активатором транскрипции генов защитных белков [14, 15].

Хитиназы, обладающие антифунгальным действием, относятся к PR-белкам. Хитиназы опосредованно индуцируют синтез фитоалексинов и экспрессию генов других PR-белков [5]. Функции пероксидазы тесно связаны с катализом полимеризации фенольных мономеров в лигнин [7].

Полученные данные указывают, что активация синтеза защитных белков в растениях картофеля под действием исследуемых соединений может способствовать формированию их устойчивости к *P. infestans*. Дальнейшие исследования в этом направлении открывают перспективы повышения устойчивости растений экологически безопасными веществами.

Работа выполнялась частично по теме госзадания, № гос. регистрации АААА-А16-116020350027-7, и при частичной финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, № 075-15-2019-293.

References

1. Vasyukova N.I., Chalenko G.I., Gerasimova N.G., Valueva T.A., Ozeretskovskaya O.L. Activation of protective properties of elicitors with the help of signal molecules in the interaction of potatoes and the pathogen of late blight // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2008. V. 44. No. 2. P. 236–240 (in Russian).
2. Tarchevskiy I.A. Plant metabolism under stress. Kazan: Fen, 2001. 448 p. (in Russian).
3. Tyuterev S.L. Scientific basis for the induction of baleneological plants. Sankt-Peterburg: Innovatsionnyy tsentr zashchity rasteniy VIZR, 2002. 328 p. (in Russian).
4. Tarchevskiy I.A. Signaling system of plants. Moskva: Nauka, 2002. 294 p. (in Russian).
5. Van Loon L.C., Bacter P.A.H.M., Pieterse C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1998. V. 36. P. 453–483. doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453
6. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species // *J. of Biotechnology*. 2018. V. 285. No. 1. P. 44–55. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044
7. de Vleeschauwer D., Djavaheri M., Bakker P. A.H.M., Höfte M. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response // *Plant. physiol.* 2008. V. 148. No. 4. P. 1996–2012. doi: 10.1104/pp.108.127878
8. Cawoy H., Mariutto M., Henry G., Fisher C., Vasilyeva N., Thonart P., Dommes J., Ongena M. Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2014. V. 27. No. 2. P. 87–100. doi: 10.1094/mpmi-09-13-0262-r
9. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish G., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // *New Phytologist*. 2001. V. 151. P. 185–194. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x
10. Shetty N.P., Jorgensen H.J.L., Jensen J.D., Collinge D.B., Shetty H.S. Roles of reactive oxygen species in interaction between plants and pathogen // *Eur. J. Plant Pathol.* 2008. V. 121. P. 267–280. doi: 10.1007/s10658-008-9302-5
11. Yarullina L.G., Akhatova A.R., Kasimova R.I. Hydrolytic enzymes and their protein inhibitors in the regulation of plant-pathogen relationships // *Fiziologiya rasteniy*. 2016. V. 63. No. 2. P. 205–217 (in Russian). doi: 10.7868/S0015330316020159
12. Kudryavtseva N.N., Sofin A.V., Revina T.A., Gvozdeva E.L., Ievleva E.V., Valueva T.A. Secretion of proteolytic enzymes by three phytopathogenic microorganisms // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2013. V. 49. P. 513–521 (in Russian). doi: 10.7868/S0555109913050073
13. Gappa-Adachi R., Yano K., Takeuchi S., Morita Y., Uematsu S. Phytophthora blight of southern star (*Oxyptalum caeruleum*) caused by *Phytophthora palmivora* in Japan // *J. Gen Plant Pathol.* 2012. V. 78. No. 1 P. 39–42. doi: 10.1007/s10327-011-0351-9
14. Ryan C.A. The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1477. P. 112–121. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00269-1
15. Vasyukova N.I., Ozeretskovskaya O.L. Jasmine-dependent protective alarm in plant tissues // *Fiziologiya rasteniy*. 2009. V. 56. No. 5. P. 643–653 (in Russian).