

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 502.753:502.2.05

doi: 10.17223/19988591/53/6

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

*Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Россия*

Влияние совместной обработки эндофитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

Работа выполнена в рамках проекта РНФ «Физиологические основы формирования симбиотических взаимоотношений растений картофеля с эндофитными бактериями рода *Bacillus*», No. 20-76-00003.

*Изучено совместное влияние эндофитного штамма бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислоты (SA) на устойчивость растений картофеля к возбудителю фитофтороза оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Впервые показано увеличение численности эндофитных бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 во внутренних тканях растений под действием салициловой кислоты (SA). При этом выявлено более чем двукратное сокращение площади поражения фитофторозом на листьях картофеля при совместном действии SA и бактериального штамма, чего мы не наблюдали в случае действия только бактерий *B. thuringiensis* B-5351. Увеличение устойчивости растений в этом случае сопровождалось активацией ингибитора трипсина, накоплением перекиси водорода и транскриптов генов, кодирующих ингибиторы протеиназ (PR6), маркер развития салицилат-зависимых реакций PR1, фенилаланин-аммоний-лиазу, участвующую в биосинтезе SA. Обработка растений только бактериями *B. thuringiensis* B-5351 не способствовала развитию описанных реакций. Таким образом, в растениях картофеля обнаружена синергически развивающаяся защитная реакция против фитофтороза с участием бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и SA в условиях их совместного применения, где бактериальный штамм праймирует защитные гены, а SA характеризуется свойствами триггера их экспрессии.*

Ключевые слова: фитофтороз; PR-белки; ингибиторы протеиназ; перекись водорода.

Сокращения: PAL – Фенилаланин-аммоний-лиаза [Phenylalanine ammonia-lyase]; SA – салициловая кислота [Salicylic acid]; ISR – индуцируемая системная устойчивость [Induced systemic resistance]; PGPM – стимулирующие рост растений микроорганизмы [Plant growth-promoting microorganisms]; АФК – активные формы

кислорода [Reactive oxygen species, ROS]; TIU – активность ингибитора, выраженная в ингибиторных единицах [Trypsin inhibition units].

Для цитирования: Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Максимов И.В. Влияние совместной обработки эндофитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 109–130. doi: 10.17223/19988591/53/6

Введение

Необходимость разработки средств защиты растений от патогенов и вредителей, альтернативных экологически небезопасным химическим пестицидам, очевидна. В отличие от химических соединений, биопрепараты на основе живых бактериальных культур при введении в агроэкосистемы приходят во взаимодействие как с вредителями, так и с растениями-хозяевами, становясь частью растительного микробиома. В настоящее время большое внимание уделяется возможности регуляции состава и свойств растительного микробиома, в том числе для его обогащения стимулирующими рост растений микроорганизмами (PGPM) в составе биопрепаратов с целью увеличения устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды [1, 2].

Настоящую революцию в исследовании растительно-микробных взаимодействий произвело открытие эндофитных микроорганизмов (непатогенных грибов и бактерий), колонизирующих внутренние ткани растений [3]. Действие эндофитных бактерий, которых можно отнести к факультативным мутуалистам растений, может основываться не только на антибиотическом действии их метаболитов, но и на стимуляции защитных механизмов растений [2]. Бактериальные эндофиты рассматривают в качестве альтернативных химическим средствам защиты и перспективных агентов биоконтроля комплекса вредных организмов [3,4]. Возможно предположить, что эндофитные штаммы бактерий будут лишены ряда недостатков известных коммерческих штаммов, в том числе требовательности к условиям окружающей среды, таким как температура и смывание атмосферными осадками [1]. В этом случае можно подобрать такую форму микроорганизма, который, вероятно, будет обладать целым спектром возможностей по защите растений и обеспечит интегрированную комплексную защиту от патогенов и вредителей. По нашему мнению, ответ на этот вопрос представляет как теоретическую, так и практическую значимость. Например, бактерии *Bacillus thuringiensis* преобладают на рынке биопестицидов, но используется только их инсектицидный потенциал [1–3]. К сожалению, механизмы регуляции защитных реакций от патогенов и вредителей в растениях, инокулированных эндофитами, в том числе и бактериями *B. thuringiensis*, пока не ясны.

Литературные данные о штаммах бактерий рода *Bacillus*, в том числе и *B. thuringiensis*, способных индуцировать системную устойчивость растений к патогенам, а также обладающих фунгицидным, бактерицидным и

даже антивирусным эффектом, обобщены в обзоре [1]. В работе А. Тао с соавт. [4] показано, что выделенные из листьев пшеницы эндофитные штаммы бактерий *B. thuringiensis* 58-2-1, 37-1 и YC-1 подавляли развитие гриба *Urocystis agropyri*, вызывающего стеблевую головню. Интересно, что устойчивость растений томата против гриба *Ralstonia solanacearum* (возбудитель бактериального вилта), которую наблюдали исследователи под действием *B. thuringiensis*, зависела от салициловой кислоты (SA) [5]. Ранее мы показали, что штамм бактерии *B. thuringiensis* B-5351, продуцирующий CryIIa инсектотоксин, обладал слабой (по сравнению со штаммом бактерий *B. subtilis* 26Д) антибиотической активностью против оомицета *P. infestans* [6] *in vitro*. Кроме того, мы наблюдали увеличение транскрипционной активности SA-зависимого гена PR1 после инфицирования возбудителем фитофтороза в обработанных суспензией клеток бактерий *B. thuringiensis* B-5351 растениях картофеля [6], что также способствует развитию защитных реакций от патогена. В связи с этим встает вопрос о возможности регулирования защитной активности штамма бактерий *B. thuringiensis* B-5351 с использованием сигнальных молекул, таких как, например, SA.

Роль SA в развитии защитных реакций растений против патогенов связана с регуляцией активности ряда ферментов фенилпропаноидного биосинтеза, например фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL, КФ 4.3.1.5), и про-/антиоксидантной системы, например НАДФ-оксидазы и пероксидазы, а также связанной с ними генерации / утилизации активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, перекиси водорода [7] и лигнификации пораженных тканей [8]. Значительная роль в защитных системах растений принадлежит ингибиторам гидролаз микроорганизмов, например трипсиноподобных экзопротеиназ оомицета *P. infestans* [9].

Цель данной работы – исследование совместного влияния салициловой кислоты и эндофитного штамма бактерий *B. thuringiensis* B-5351 на физиолого-биохимические изменения в растениях картофеля, связанные с формированием их устойчивости к возбудителю фитофтороза оомицета *P. infestans*.

Материалы и методики исследования

В работе использованы 20-суточные пробирочные стерильные (без видимых признаков развития бактерий на среде культивирования, отсутствие вирусов протестировано методами ИФА и ПЦР) растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя роза, культивируемые на агаризованной среде Мурасиге–Скуга при 16-часовой освещенности 8 000–10 000 лк (лампы L 36W/77, «Osram» (Германия)), в климатоканнере с установленными дополнительными лампами КС200 («Смоленский СКТБ СПУ», Россия). Дневная температура – 22 °С, ночная – 20 °С. Влажность воздуха в пробирках для культивирования растений (при закрытой пробке) – 95–100 % (термометригигрометр комнатно-уличный DC-103 («Digital», Китай)). Все процедуры со

стерильными объектами проведены в ламинар-боксе II класса защиты Бокс БАВп-01 «Ламинар-С»-1,5 («Lamsystems», Россия).

Исследуемый штамм бактерий *B. thuringiensis* В-5351 хранится в коллекции Лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН (г. Уфа, Россия). Суспензию бактерий для инокуляции растений получали путем внесения в воду (или раствор SA) бактериальной массы микробиологической петлей непосредственно перед нанесением на растения. Титр бактерий устанавливали спектрофотометрически (с использованием калибровочной кривой). Плазмолитиз бактериальных клеток в воде отсутствовал, что является необходимым условием при разработке биопрепаратов [4] (для исключения внесения солей в почву).

Использованный для инфицирования растений картофеля изолят возбудителя фитофтороза оомицета *P. infestans* ИСМ выделен из пораженных фитофторозом клубней картофеля сорта Удача (Башкортостан, Бирский район, с. Старобурново, 55°26'06.0 N 55°36'22.9 E) в 2018 г. Клубни с видимыми симптомами фитофтороза поверхностно стерилизовали 3%-ным раствором гипохлорита натрия (средство «Белизна») (15 мин), затем, после двукратного промывания стерильной водой, обрабатывали 15%-ным раствором перекиси водорода (10 мин). Высечки из клубней помещали в стерильные чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и выдерживали в термостате при температуре 18 °С до появления мицелия (1–2 суток). Затем мицелий переносили в чашки Петри на КГА. Идентификацию патогена проводили по морфологическим признакам мицелия, зооспорангиев и зооспор (Biozero BZ-X700, «Keyence», Japan) а также по способности вызывать симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля после инокуляции. Хранение патогена в лабораторных условиях на КГА. Для восстановления агрессивности изолята участки мицелия в асептических условиях переносили на вырезанные из средней части клубней картофеля (сорт Ранняя Роза) бруски, которые помещали в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой. Часть тканей из пораженных участков клубня через 7–10 дней после инокуляции переносили на КГА. Через 7 суток после помещения на КГА поверхность мицелия в чашках Петри заливали стерильной водой, после чего инкубировали при 4 °С в течение 30 мин для выхода спор; титр спор подсчитывали в камере Фукса-Розенталя.

Растения картофеля на 20-е сутки после посадки на свежую среду инокулировали суспензией клеток *B. thuringiensis* В-5351 (10^8 клеток/мл) в дистиллированной воде, либо в 1 мМ растворе SA путем нанесения 5 мкл суспензии на 4 верхних листа (20 мкл/растение). Контрольные растения обрабатывали дистиллированной водой; часть растений (дополнительный контроль) обрабатывали 1 мМ раствором SA в том же объеме. Через 7 суток после инокуляции бактериями часть экспериментальных растений картофеля инфицировали (непосредственно в пробирках), нанося на каждый лист по 5 мкл суспензии зооспор оомицета *P. infestans* (10^5 спор/мл) при помощи пипетки с удлинненным носиком.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в тканях растений определяли через 7 дней после инокуляции растений *B. thuringiensis* B-5351 (либо обработки водой и SA) [6, 10]. Для этого навески по 100 мг экспериментальных растений (из верхушечной части 3 разных растений) поверхностно стерилизовали по следующей схеме: 70% этанол – 1 мин; 0,1%-ный диоксид – 3 мин; дистиллированная вода. Навески растений гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением 2 мл стерильной воды. Гомогенат разбавляли в 10 и в 100 раз. Аликвоты гомогената после разбавления (100 мкл) распределяли по поверхности картофельно-глюкозного агар (КГА) микробиологической петлей 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, и их количество пересчитывали на 1 г сырой массы растений [11]. Чашки Петри, в которых мы наблюдали колонии, отличные по морфологии от колоний исследуемого штамма, не учитывали. Во всех вариантах производился подсчет КОЕ не менее чем в 20 чашках Петри.

Экстракция высокомолекулярной бактериальной ДНК из растений картофеля проведена с помощью 1%-ного лизирующего раствора (1 % тритона X100, 1 % твина-20, 1 % Chelex 100). Для подтверждения идентичности полученных реинокулятов исходному штамму применяли метод RAPD-анализа [11], используя праймер Lmbd8 5'-GGGCGCTG-3'.

Видимые симптомы фитофтороза наблюдали в течение 12 суток после инфицирования изолированных листьев, помещенных во влажные камеры с ватой, смоченной 0,04%-ным раствором бензимидазола. Степень развития симптомов оценивали по величине площади поражения (%) листовой пластинки. Для определения площади фотографии листьев анализировали в программе ImageJ («RSB», США) [6].

Для анализа активности ингибиторов протеиназ растений и содержания перекиси водорода пробирочные растения (листья со стеблем) гомогенизировали в 0,025 М фосфатном буфере (ФБ), pH 6,2, в соотношении 1 : 5 через 6, 24 и 48 ч после инфицирования *P. infestans*. Полученный гомогенат центрифугировали 20 мин при 10 000 g на центрифуге («Eppendorf», Германия). Супернатант использовали для определения активности ингибитора протеиназ. К 25 µл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 8,2, добавляли 50 µл растительного экстракта, полученного вышеописанным методом, 25 µл трипсина (1 мг/мл), а затем 50 µл (1 мг/мл) раствора п-нитроанилид-N,α-бензоил-DL-аргинина (БАПНА) и инкубировали в термостате при 37 °C в течение 10 мин. Реакцию останавливали 25 µл 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). В стандартных условиях за 1 ед. ингибиторной активности принимали такое его количество, которое необходимо для подавления 1 ед. активности трипсина на 100 %.

Содержание пероксида водорода оценивали спектрофотометрически (EnSpire®; «PerkinElmer» (США) [12]. Реагент 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 °С, затем центрифугировали 10 мин при 10 000 g и переносили 200 мкл супернатанта в лунки плоскодонных планшетов. Измеряли оптическую плотность реакционной смеси на планшетном спектрофотометре EnSpire® («PerkinElmer», США) при 560 нм.

Экстракция тотальной РНК из растений проведена через 24 ч после инфицирования растений картофеля спорами возбудителя фитофтороза с использованием тризола, согласно протоколу фирмы-поставщика («Sigma», Германия), из листьев и стеблей растений картофеля, зафиксированных в жидком азоте. Содержание нуклеиновых кислот установлено по A260/A280 на спектрофотометре Smart Spec Plus «Bio-Rad» (США), предварительно растворив образцы в трис-ЭДТА буфере.

Таблица 1 [Table 1]

Праймеры, использованные для исследования транскрипционной активности генов растений картофеля
[Primers used to study the transcriptional activity of potato plant genes]

Продукт гена [Gene product]	Номер гена в NCBI [NCBI access number]	Последовательность праймера [Primer sequence]	Эффективность праймеров [Primer efficacy], %
Ингибитор трипсина [Tripsin inhibitor, PR6]	AY089962	St_PR6_F 5'-gct-gag-gat-tgg-tga-gag-gta-3' St_PR6_R 5'-cca-cat-cac-cat-aat-cca-act-3'	99,46
Основной антимикробный белок [Basic antimicrobial protein, PR1]	AY050221	St_PR1_F 5'-tgg-gtg-gtg-gtt-cat-ttc-ttg-t-3' St_PR1_R 5'-cat-tta-att-cct-tac-aca-tca-taa-g-3'	102,05
PAL	X63104	St_PAL_F 5'-gct-gat-tct-ttg-aga-ggg-agt-aa-3' St_PAL_R 5'-gca-act-tgt-gca-aca-gtc-aa-3'	105,67
Актин [Actin]	X55749	St-act_F 5'-gat-ggt-gtc-agc-cac-ac-3' St act_R 5'-att-cca-gca-gct-tcc-att-cc-3'	101,1

Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проведена реакция обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы согласно протоколу фирмы-поставщика «Синтол» (Россия). Анализ экспрессии генов PR-белков проведен методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX Connect Real-Time PCR Detection System «Bio-Rad» (США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I («Синтол», Россия). Изменения в транскрипционной активности генов (оценка числа копий мРНК для каждого гена) определены относительно референсного гена актина с помощью программного обеспечения CFX Connect Real-Time System («Bio-Rad», (США)). Используемые в работе нуклеотидные последовательности приведены в табл. 1.

Все опыты проведены в 3–5 биологических и 3 аналитических повторностях. При обработке результатов использована программа StatSoft STATISTICA 12.0. Статистическая значимость различий между опытными и контрольными образцами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. В таблицах и на рисунках представлены данные в виде средней по повторностям и их стандартные отклонения ($M \pm SD$).

Результаты исследования

На 7-е сутки после инокуляции стерильных пробирочных растений картофеля суспензией клеток бактерий исследуемого штамма в растительных тканях присутствовало до $7,3 \pm 1,6 \times 10^5$ КОЕ *B. thuringiensis* B-5351 /г сырой массы побегов (табл. 2). В этих же условиях при совместной обработке суспензией бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и СА мы обнаружили $2,3 \pm 1,5 \times 10^6$ КОЕ *B. thuringiensis* B-5351/г сырой массы побегов. В контрольных растениях, обработанных водой или СА, мы не обнаружили жизнеспособных бактерий. RAPD-анализ полученных после реинокуляции бактерий показал их полную идентичность с исходным штаммом бактерий *B. thuringiensis* B-5351 (рис. 1).

Таблица 2 [Table 2]

Количество эндофитных клеток *Bacillus thuringiensis* B-5351 через 7 суток после обработки растений индивидуально или совместно с салициловой кислотой (СА)

[The number of endophytic cells of *Bacillus thuringiensis* B-5351 on the 7th day after the treatment of plants individually or in combination with salicylic acid (SA)], $M \pm SD$

Количество КОЕ/г сырой массы [Number of CFU/g of wet mass]	Контроль [Control]*		<i>Bacillus thuringiensis</i> B-5351	
	H ₂ O	SA	H ₂ O	SA
	0	0	$7,3 \pm 1,6 \times 10^5$	$2,3 \pm 1,5 \times 10^6$

Примечание. * Не инокулированные *Bacillus thuringiensis* B-5351 растения картофеля.

[Note. * Non-inoculated with *Bacillus thuringiensis* B-5351 potato plants].

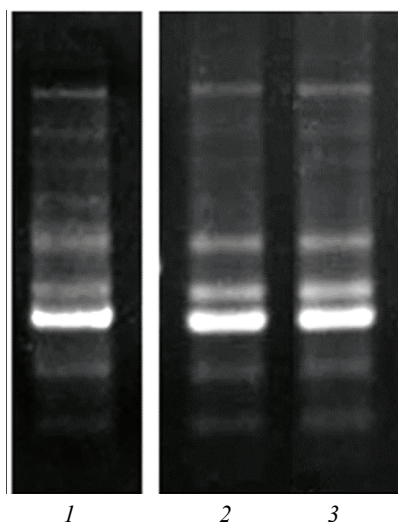


Рис. 1. Фотография полиакриламидного геля после RAPD-анализа бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 (1) и бактерий, выделенных из растений картофеля, инокулированных *B. thuringiensis* B-5351 в отдельности (2) и *B. thuringiensis* B-5351 в сочетании с салициловой кислотой (3)

[Fig. 1. Photo of polyacrylamide gel after RAPD analysis of bacteria *Bacillus thuringiensis* B-5351 (1) and bacteria, isolated from potato plants, treated with *B. thuringiensis* B-5351 individually (2), and with *B. thuringiensis* B-5351 in combination with SA (3)]

На рис. 2 видно, что на листьях контрольных растений и растений, обработанных суспензией клеток штамма *B. thuringiensis* B-5351, развитие симптомов фитофтороза происходило наиболее активно. На 12-е сутки после инфицирования *P. infestans* мы наблюдали в среднем 30%-ное поражение листьев растений в этих вариантах. SA при индивидуальном применении снизила интенсивность проявления симптомов на 9-е и 12-е сутки после инфицирования. Под действием бактерий *B. thuringiensis* B-5351 совместно с SA мы наблюдали меньшую площадь распространения симптомов фитофтороза на листьях, чем в остальных вариантах, уже на 3-и сутки после инфицирования. Через 12 суток после инфицирования *P. infestans* интенсивность проявления симптомов в 4 раза ниже относительно обработанных водой растений, что говорит об эффективности индуцированных иммунных реакций растений в этом случае.

Из рис. 3, А видно, что применение SA и бактерии *B. thuringiensis* B-5351 не оказали статистически значимого влияния на активность ингибиторов протеиназ в здоровых растениях ($p > 0,05$). Инфицирование обработанных водой растений вызвало снижение активности ингибиторов трипсина уже через 6 ч после нанесения суспензии спор патогена. В таких растениях мы наблюдали увеличение ингибиторной активности только через 24 ч после контакта с возбудителем фитофтороза.

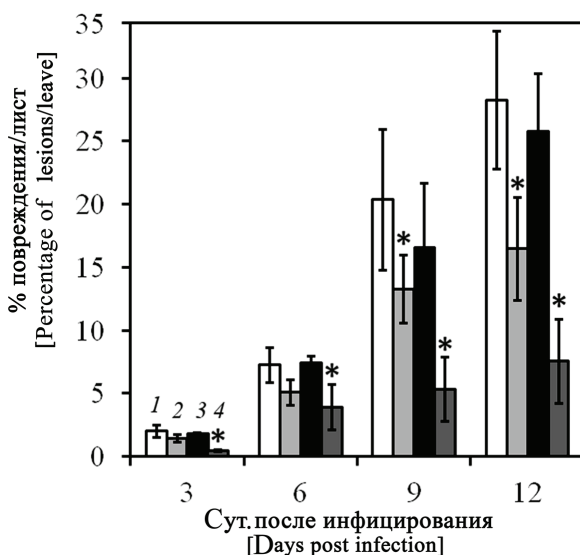


Рис. 2. Повреждение листьев картофеля фитофторозом в различных вариантах эксперимента: 1 – вода; 2 – салициловая кислота; 3 – *Bacillus thuringiensis* B-5351; 4 – *B. thuringiensis* B-5351 + салициловая кислота.

* – Статистически значимые отличия от контрольного варианта (обработка водой) в соответствующей временной точке ($p < 0,05$)

[Fig. 2. Development of late blight (% of leaves with visible symptoms) on potato plants under the influence of *B. thuringiensis* B-5351 and salicylic acid. 1 – control (water);

2 - Salicylic acid; 3 - *Bacillus thuringiensis* B-5351; 4 - *B. thuringiensis* B-5351 with Salicylic acid]
[Note: * Statistically significant differences from water-treated plants at the same time point ($p < 0.05$)]

Под воздействием SA высокая активность ингибитора трипсина сохранялась и на 6, и на 24 ч после инфицирования. Если обработка бактериальными клетками штамма *B. thuringiensis* B-5351 увеличила активность ингибиторов протеиназ в растениях картофеля только через 6 ч после инфицирования патогеном, то в растениях, обработанных совместно клетками бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и SA, происходило почти двукратное увеличение активности ингибиторов протеиназ через 6 и 24 ч после инфицирования оомицетом *P. infestans* (рис. 3, А).

В обработанных SA (как в отдельности, так и в сочетании с *B. thuringiensis* B-5351) неинфицированных растениях содержание перекиси водорода превосходило показатели в обработанных водой растениях. Инфицирование возбудителем фитофтороза обработанных водой растений картофеля приводило к увеличению содержания H_2O_2 на 25%, по сравнению с контролем на 6 и 48 ч после нанесения спор патогена (рис. 3, В). Аналогичные результаты мы наблюдали после инфицирования растений, инокулированных клетками *B. thuringiensis* B-5351, но не обработанных SA. Под действием SA в инфицированных растениях содержание перекиси превышало контрольные показатели более чем на 40%. В обработанных суспензией бакте-

рий *B. thuringiensis* B-5351 и SA растениях присутствие патогена вызывало резкое кратковременное накопление H_2O_2 через 6 ч после инфицирования. Последнее соответствует данным о том, что ранняя генерация АФК, приводящая к реакции сверхчувствительности, – определяющий фактор в формировании устойчивости растений картофеля к оомикету *P. infestans* [13].

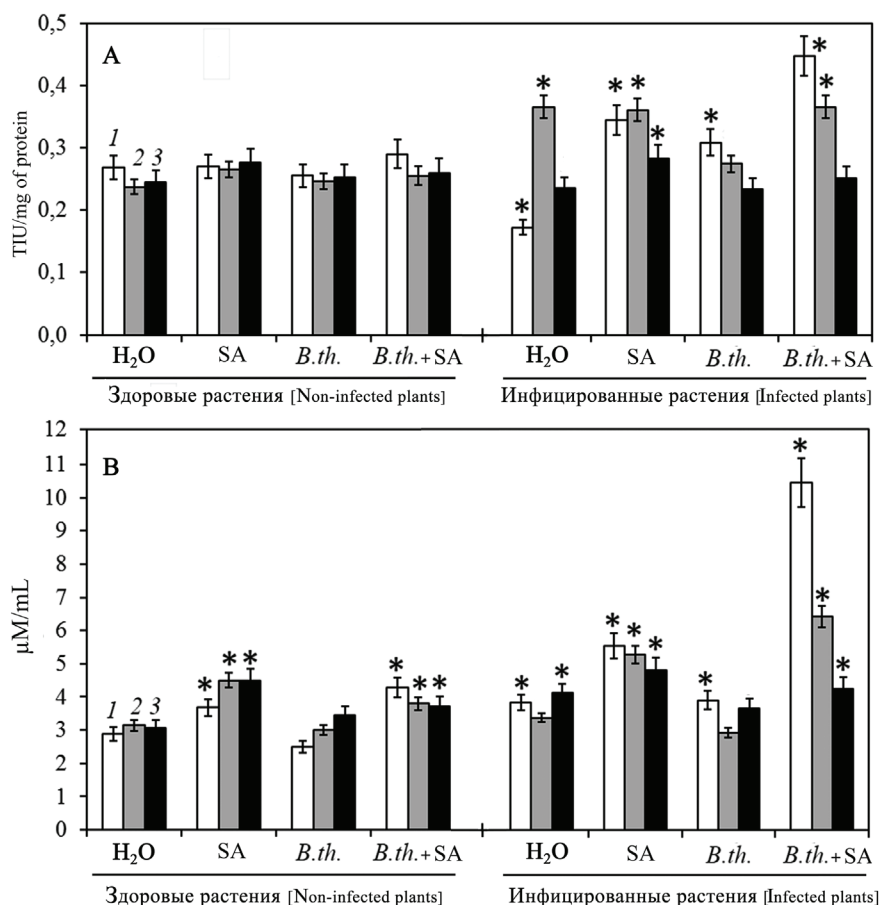


Рис. 3. Влияние салициловой кислоты (SA) и бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) на активность ингибиторов трипсина (А) и содержание перекиси водорода (В) в здоровых и инфицированных возбудителем фитофтороза оомикетом *Phytophthora infestans* растениях картофеля. 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования патогеном.

* – Статистически значимые отличия от показателей, наблюдаемых в обработанных водой неинфицированных растениях в соответствующей временной точке ($p < 0,05$)

[Fig. 3. Influence of Salicylic acid (SA) and bacteria *Bacillus thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) on the activity of trypsin inhibitors (A) and hydrogen peroxide content (B) in non-infected and infected with *Phytophthora infestans* potato plants. 1 - 6 hours, 2 - 24 hours, 3 - 48 hours after inoculation with pathogen spores. [Note: * - Statistically significant differences from the means observed in water-treated, non-infected plants at the same time point ($p < 0.05$)]

Анализ транскрипции гена *PR6*, кодирующего ингибиторы трипсина, показал, что в неинфицированных растениях, обработанных водой, SA и бактериями *B. thuringiensis* B-5351 в отдельности, мы не наблюдали значительных изменений в накоплении транскриптов этого гена (рис. 4). В варианте с совместной обработкой SA и бактериями *B. thuringiensis* B-5351 неинфицированных растений этот показатель превышал контрольный на 25%, так же как инфицирование растений, обработанных SA. Обработка растений SA совместно с бактериями *B. thuringiensis* B-5351 увеличивала количество транскриптов гена *PR6* более чем на 50% относительно обработанных водой неинфицированных растений. Инфицирование обработанных водой растений не влияло на транскрипционную активность гена *PR1*. Интересно, что обработки растений SA, бактериями *B. thuringiensis* B-5351 или суспензией SA + *B. thuringiensis* B-5351 индуцировали более чем 40% накопление мРНК этого гена как в здоровых, так и в инфицированных растениях. При инфицировании в растениях, обработанных водой, более чем на 30% увеличилось содержание транскриптов гена, кодирующего PAL, относительно показателей, наблюдаемых в обработанных водой неинфицированных растениях. Следует отметить, что под воздействием SA и бактерий *B. thuringiensis* B-5351 транскрипционная активность этого гена в здоровых растениях соответствовала уровню инфицированных контрольных растений.

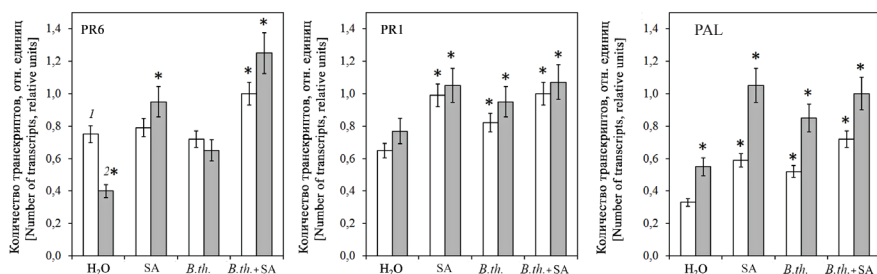


Рис. 4. Влияние салициловой кислоты (SA) и бактерий *B. thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) на относительное количество транскриптов генов, кодирующих PR6 (ингибитор трипсина), PR1 (основной защитный белок) и PAL (фенилаланин-аммоний-лиаза) в здоровых (1) и инфицированных возбудителем фитофтороза (2) растениях картофеля (24 ч после нанесения спор патогена). Транскрипционная активность каждого исследуемого гена нормализована относительно референсного гена актина картофеля.

* – Статистически значимые отличия от показателей, наблюдаемых в обработанных водой неинфицированных растениях ($p < 0,05$)

[Fig. 4. Influence of salicylic acid (SA) and bacteria *B. thuringiensis* B-5351 (*B. th.*) on the activity of transcription of genes encoding PR6 (trypsin inhibitor), PR1 (basic protective protein) and PAL (phenylalanine ammonium-lyase) in non-infected (1) and infected with *Phytophthora infestans* (2) potato plants (24 hours after inoculation with pathogen spores.).

The expression of each target gene is presented as fold change normalized to the reference gene encoding potato actin. [* - Statistically significant differences from the means observed in water-treated, non-infected plants at the same time point ($p < 0.05$)]

В присутствии патогена мы наблюдали более чем двукратное (относительно этого показателя в обработанных водой неинфицированных растениях) увеличение содержания мРНК гена *PAL* в растениях картофеля как при индивидуальном, так и при совместном применении SA и клеток бактерий *B. thuringiensis* B-5351.

Обсуждение результатов исследования

В последние десятилетия практическое применение PGPM, в том числе эндофитных, привлекает большое внимание исследователей [1–3]. Однако, очень мало работ объясняющих физиолого-биохимические особенности регуляции взаимоотношений между эндофитными микроорганизмами и растениями-хозяевами. Колонизация внутренних тканей растений бактериями – один из наиболее важных факторов, от которых может зависеть эффективность биологического средства защиты растений, который пока не учитывается их производителями [3]. Вместе с тем известно, что наряду с другими видами микроорганизмов из внутренних тканей растений выделяются штаммы бактерий *B. thuringiensis* [3, 4, 14]. Вегетативные клетки, споры и белковые кристаллы четырех бразильских штаммов бактерий *B. thuringiensis* [15] наблюдали методом электронной сканирующей микроскопии в проростках капусты как вблизи устьиц, через которые бактерии могут проникать в ткани, так и в сосудах ксилемы. В нашей работе показано, что добавление SA к суспензии клеток бактерий *B. thuringiensis* B-5351 перед обработкой растений привело к увеличению числа клеток исследуемого штамма в тканях растений по сравнению с индивидуальной обработкой бактериальным штаммом. Интересно, что описанное нами впервые в этой работе увеличение колонизационной активности клеток *B. thuringiensis* B-5153 при использовании в композиции с SA достигало порядковых значений, характерных для штамма *B. subtilis* 26Д, эффективность которого в укреплении устойчивости растений картофеля к фитофторозу [6] и септориозу [10] мы описали ранее.

Механизм, лежащий в основе увеличения численности бактерий *B. thuringiensis* B-5351 в тканях растений картофеля под действием SA, неизвестен. Но не исключено, что это происходит вследствие подавления жасмонат-зависимых реакций в растениях под влиянием SA [7]. Например, в закрывании устьиц, через которые *B. thuringiensis* могут проникать внутрь растения [15], происходящем посредством активации киназного комплекса CBL1-CIPK5, участвует жасмоновая кислота [16]. В то же время мутанты арабидопсиса *cpr22*, накапливающие большое количество SA, проявляли неспособность закрывать устьица [17]. Известно о снижении колонизационной активности корней риса эндофитными азотфиксирующими бактериями *Azoarcus olearius* BH72 под воздействием жасмоновой кислоты [18], тогда как 100 μ г SA усиливала адгезию клеток в биопленках, формируемых бакте-

рии *Bacillus cereus* [19]. По-видимому, такой регулируемый растениями титр бактериальных клеток в тканях является важным фактором формирования их устойчивости впоследствии. В нашем исследовании совместная обработка растений SA и бактериальной суспензии *B. thuringiensis* B-5351 снизила интенсивность развития симптомов фитофтороза на листьях растений. Подобное совместное высокое защитное действие SA и бактерий *B. subtilis* ранее исследователи обнаружили, например, на растениях огурца, подвергнутых инфицированию возбудителем фузариоза [20].

Отличительная особенность ISR, опосредованной PGPM, – отсутствие прямой активации экспрессии PR-генов и развитие устойчивости по механизму прайминга [21]. СИУ, вызываемая PGPM, эффективна против оомицетов, грибов, бактерий и вирусов и даже насекомых и травоядных животных [1, 3]. Защитные реакции при развитии СИУ, опосредованной PGPM, характеризуются быстрым и ранним накоплением АФК, активирующих редокс-чувствительные транскрипционные факторы и гены PR-белков [21, 22]. Как и ожидалось, обработка SA привела к более раннему и интенсивному накоплению H_2O_2 . В нашем исследовании штамм бактерий *B. thuringiensis* B-5351 индивидуально не оказал влияния на содержание перекиси водорода в инфицированных растениях, хотя ранее показано, что ряд штаммов бактерий *B. thuringiensis* способен индуцировать окислительный взрыв в растениях сурепицы *Brassica campestris* [23]. Весьма неожиданный факт, что совместное действие и SA и клеток бактериального штамма обеспечило более чем двукратное увеличение содержания H_2O_2 на ранних этапах после контакта растительных тканей с патогеном, что, как мы предполагаем, привело к развитию устойчивости растений к фитофторозу.

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 [9]. Ранее показано, что протеолитическая активность в бесклеточном препарате, полученном из суспензии спор оомицета *P. infestans*, коррелирует с развитием некрозов при инъекции в ткани растений картофеля [24]. Цистеиновые протеазы PpCys44 и PpCys45 оомицета *P. parasitica* запускают NPK1-зависимую гибель клеток у различных видов растений табака *Nicotiana* spp. [25]. Ответная защитная реакция растений сопровождается синтезом ингибиторов этих ферментов. Повышение содержания ингибиторов гидролаз в растении происходит, как правило, за счет экспрессии их генов [26]. Снижение интенсивности проявления симптомов фитофтороза на листьях растений картофеля, обработанных SA и бактериальным штаммом, в которых мы обнаружили накопление транскриптов гена *PR6*, как и активность его белкового продукта, говорит о важности ингибиторов протеиназ в защите картофеля от фитофтороза.

Исследователи показали, что обработка растений картофеля бактериями *Bacillus thuringiensis* способствует развитию их устойчивости к возбудите-

лю бурой гнили грибу *Ralstonia solanacearum*, индуцируя транскрипционную активность SA-зависимых генов [5]. Нами также ранее показано, что штамм бактерий *B. thuringiensis* B-5351 увеличил транскрипционную активность гена *PR1* (маркера SA-зависимого пути) при заселении растений пшеницы злаковыми тлями, что сопровождалось снижением жизнеспособности вредителя [10]. В данной работе мы обнаружили, что исследуемый штамм эндофитной бактерии способствует накоплению транскриптов генов, кодирующих белки *PR1* и *PAL* в той же степени, что и SA. С. Zhang с соавт. [27] показали, что трансгенные растения сои с увеличенной экспрессией гена *GmPAL2.1*, кодирующего *PAL*, более устойчивы к оомицету *P. sojae*, а также содержали высокий уровень SA, чем растения дикого типа. Штамм бактерий *B. thuringiensis* 199 так же способствовал активации фермента *PAL* в растениях томата при инфицировании грибом *Fusarium oxysporum lycopersici*, вызывающим развитие фузариоза [28]. Обработка растений табака Бентхама *Nicotiana benthamiana* продуцентами SA – ризосферными бактериями *Pseudomonas tremae* EB-44 и *Curtobacterium herbarum* EB-47, повышала содержание этого гормона в растениях и индуцировало их устойчивость к патогенным бактериям *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [29]. Бактерии *B. amyloliquefaciens* MBI600 стимулировали SA-зависимые реакции (в том числе транскрипционную активность *PR1* гена) в растениях томатов, что снизило их пораженность вирусом картофеля Y [30]. О. Lastochkina с соавт. [31] показали, что совместная обработка клубней картофеля *B. subtilis* 10-4 и SA перед закладкой на хранение увеличила их устойчивость к оомицету *P. infestans* и грибу *F. oxysporum*, снижая патоген-индуцированное накопление пролина и интенсивность перекисного окисления липидов, что способствовало сохранности клубней. Кроме того, *B. subtilis* 10-4 и SA снижала пораженность фузариозом растений пшеницы, что свидетельствует о возможности проявления защитного эффекта подобных композиций на многих культурах [32].

Поскольку в растениях картофеля штамм бактерий *B. thuringiensis* B-5351 совместно с SA индуцирует салицилат-зависимые защитные реакции, можно подумать, что это единственный путь формирования устойчивости. Однако при совместной обработке наблюдается также увеличение транскрипционной активности гена *PR6*, который, согласно литературным данным [33], является жасмонат-зависимым геном. Соответственно, полученные нами данные говорят о возможности параллельного синергического запуска компонентов защитной системы в растениях, регулируемых, с одной стороны, SA, а с другой – эндофитами, например бактериальным штаммом *B. thuringiensis* B-5351. Принимая во внимание инсектицидную активность исследуемого штамма против злаковых тлей *Schizaphis graminum* [10] и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* [5], а также эффективность применения SA против вирусных заболеваний растений [34], возможность увеличения устойчивости растений к фитофторозу путем совместной обра-

ботки бактериями *B. thuringiensis* B-5351 и SA может открыть один из подходов в комплексной защите растений от биотических воздействий.

Заключение

Проведенные нами работы показали эффективность сформированных на основе живых бактерий *B. thuringiensis* B-5351 и SA композиций в защите растений картофеля от фитофтороза, который, с одной стороны способствует непосредственному подавлению роста и развития патогенов в тканях растений, а с другой – опосредованному индуцированию ими неспецифического защитного ответа растений. Это заключалось в раннем увеличении содержания перекиси водорода в растениях, увеличении транскрипционной активности генов, кодирующих маркер салицилат-зависимого ответа *PR1*, ген биосинтеза SA (фенилаланин-аммоний-лиаза) и ингибитора трипсина, а также активности белкового продукта последнего. Полученные данные могут быть использованы для разработки биопрепаратов с комплексной активностью против патогенов и насекомых-вредителей.

Литература

1. Jouzani G.S., Valijanian E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings // Applied microbiology and biotechnology. 2017. No. 101. PP. 2691–2711.
2. Lopes R., Tsui S., Gonçalves P.J.R.O. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants // World journal of microbiology and biotechnology. 2018. No. 34. PP. 94–100.
3. Rana K.L., Kour D., Kaur T. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. No. 113. PP. 1075–1107.
4. Tao A., Panga F., Huang S., Yu G., Li B., Wang T. Characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut // Biocontrol Science and Technology. 2014. No. 24. PP. 901–924.
5. Takahashi H., Nakaho K., Ishihara T., Ando S., Wada T., Kanayama Y., Asano S., Yoshida S., Tsushima S., Hyakumachi M. Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum* // Plant cell reports. 2014. No. 33(1). PP. 99–110.
6. Sorokan A.V., Benkovskaya G.V., Burkhanova G.F., Blagova D.K., Maksimov I.V. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26DCryChS producing CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes multifaceted potato defense against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and pest *Leptinotarsa decemlineata* Say // Plants. 2020. No. 9. PP. 1115–1123.
7. Kamle M., Borah R., Bora H., Jaiswal A.K., Singh R.K., Kumar P. Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens Cham : Springer, 2020. 356 p.
8. Pallas J.A., Paiva N.L., Lamb C., Dixon R. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by *Tobacco mosaic virus* // The plant journal. 1996. No. 10(2). PP. 281–293.
9. Kudriavtseva 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 // Applied biochemistry and microbiology. 2013. No. 49 (5). PP. 513–21.

10. Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Rumyantsev S.D., Alekseev V.Y., Khayrullin R.M. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene *BtcryIIa* encoding CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. // Biological control. 2020. No. 144. PP. 326–338.
11. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. ; под ред. А.И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
12. Bindschedler L.M., Minibaeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signaling events in apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve camp and Ca^{2+} // New phytologist. 2001. No. 151. PP. 185–194.
13. El Komy M.H., Saleh A.A., Ibrahim Y.E., Molan Y.Y. Early production of reactive oxygen species coupled with an efficient antioxidant system play a role in potato resistance to late blight // Plant pathology. 2020. No. 45. PP. 44–55.
14. Mishra P.K., Bisht S.C., Ruwari P., Subbanna A.R.N.S., Bisht J.K., Bhatt J.C., Gupta H.S. Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from the North Western Indian Himalayas // Annual review of microbiology. 2017. No. 67. PP. 143–155.
15. Praca L.B., Gomes A.C.M.M., Cabral G., Martins E.S., Sujji E.H., Monnerat R.G. Endophytic colonization by brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown *in vitro* // Bt Research. 2012. No. 3. PP. 11–19.
16. Förster S., Schmidt L.K., Kopic E., Anschütz U., Huang S., Schlücking K., Köster P., Waadt R., Larrieu A., Batistič O., Rodriguez P.L., Grill E., Kudla J., Becker D. Wounding-induced stomatal closure requires jasmonate-mediated activation of GORK K^{+} channels by a Ca^{2+} sensor-kinase CBL1-CIPK5 complex // Developmental cell. 2019. No. 48. PP. 87–99.
17. Mosher S., Moeder W., Nishimura N., Jikumaru Y., Joo S.H., Urquhart W., Klessig D.F., Kim S.K., Nambara E., Yoshioka K. The lesion-mimic mutant *cpr22* shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner // Plant Physiology. 2010. No. 152. PP. 1901–1913.
18. Chen X., Marszałkowska M., Reinhold-Hurek B. Jasmonic acid, not salicylic acid restricts endophytic root colonization of rice // Frontiers in plant science. 2020. No. 10. PP. 3–15.
19. Lemos M., Borges A., Teodósio J., Araújo P., Mergulhão F., Melo L., Simões M. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms // International Biodeterioration & Biodegradation. 2014. No. 86. PP. 42–51.
20. Yousefi H., Sanebani N., Mirabolfathy M. The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radices cucumerinum* // Iranian journal of plant pathology. 2011. No. 4. PP. 85–87.
21. Compant S., Samad A., Faist H., Sessitsch A. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application // Journal of advanced research. 2019. No. 19. PP. 29–37.
22. Wang X., Wang J., Jin P., Zheng Y. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit // International journal of food microbiology. 2013. No. 164. PP. 141–147.
23. Wang M., Geng L., Sun X., Shu C., Song F., Zhang J. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L. // Biological control. 2020. No. 145. PP. 104–115.
24. Paris R., Lamattina L. *Phytophthora infestans* secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato // European journal of plant pathology. 1999. No. 105. PP. 753–760.

25. Zhang Q., Li W., Yang J., Xu J., Meng Y., Shan W. Two *Phytophthora parasitica* cysteine protease genes, PpCys44 and PpCys45, trigger cell death in various *Nicotiana* spp. and act as virulence factors // Molecular plant pathology. 2020. No. 21. PP. 541–554.
26. Ревина Т.А., Кладнищкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. Ингибитор химотрипсина и трипсина из клубней картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. No. 7. С. 46–51.
27. Zhang C., Wang X., Zhang F., Dong L., Wu J., Cheng Q., Qi D., Yan X., Jiang L., Fan S., Li N., Li D., Xu P., Zhang S. Phenylalanine ammonia-lyase 2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection // Scientific reports. 2017. No. 7. PP. 1–13.
28. Akram W., Mahbo A., Javed A.A. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt // European journal of microbiology and immunology. 2013. No. 3. PP. 275–280.
29. Islam N., Ali S., Choi S., Park Y., Baek K. Salicylic acid-producing endophytic bacteria increase nicotine accumulation and resistance against wildfire disease in tobacco plants // Microorganisms. 2020. No. 8. PP. 3–18.
30. Beris D., Theologidis I., Skandalis N., Vassilakos N. *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and potato virus Y // Science reports. 2018. No. 8. PP. 103–120.
31. Lastochkina O., Baymiev A., Shayahmetova A., Garshina D., Koryakov I., Shpirnaya I., Pusenkova L., Mardanshin I., Kasnak C., Palamutoglu R. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers // Plants. 2020. No. 9. PP. 76–81.
32. Lastochkina O., Garshina D., Allagulova C., Fedorova K., Koryakov I., Vladimirova A. Application of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid to improve wheat growth and tolerance under combined drought and *Fusarium* root rot stresses // Agronomy. 2020. No. 10. PP. 1343–1350.
33. Pauw B., Memelink J. Jasmonate-responsive gene expression // Journal of plant growth regulation. 2004. No. 23. PP. 200–210.
34. Zhang K., Wang Y., Sun W., Han K., Yang M., Si Z., Li G., Qiao Y. Effects of exogenous salicylic acid on the resistance response of wild soybean plants (*Glycine soja*) infected with Soybean mosaic virus // Canadian journal of plant pathology. 2020. No. 42. PP. 84–93.

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.; повторно 17.11.2020 г.;
принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

Авторский коллектив:

Сорокань Антонина Вячеславовна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>

E-mail: fourtyanns@googlemail.com

Бурханова Гузель Фанилевна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2346-3502>

E-mail: guzel_mur@mail.ru

Алексеев Валентин Юрьевич, м.н.с. лаборатории биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4441-3360>

E-mail: valentin-1994@yandex.ru

Максимов Игорь Владимирович, профессор, д-р биол. наук, заведующий лабораторией биохимии иммунитета растений, Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>

E-mail: igor.mak2011@yandex.ru

For citation: Sorokan AV, Burkhanova GF, Alekseev VYu, Maksimov IV. The influence of co-treatment with *Bacillus thuringiensis* B-5351 and salicylic acid on the resistance of potato plants to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:109-130. doi: 10.17223/19988591/53/6 In Russian, English Summary

Antonina V. Sorokan, Guzel F. Burkhanova, Valentin Yu. Alekseev, Igor V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

The influence of co-treatment with *Bacillus thuringiensis* B-5351 and salicylic acid on the resistance of potato plants to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

Biocontrol agents based on strains of microorganisms that participate in mutualistic relationships with host plants, including those based on strains of endophytic bacteria, can be an alternative to chemical pesticides. There are endophytic *B. thuringiensis* strains that produce insect-toxic proteins and induce systemic resistance of plants to pathogens. An important issue is the possibility of regulation of the relationship of endophytic bacterial strains with the host-plant and their ability to induce plant defense reactions against pathogens by signaling molecules, including salicylic acid (SA). The aim of this work was to study the effect of SA and the endophytic bacterial strain *B. thuringiensis* B-5351 on the activity of potato plants reactions associated with signaling and biosynthesis of SA, as well as the activity of a potato trypsin inhibitor upon infection with the late blight pathogen.

We used sterile test tube potato plants (*Solanum tuberosum* L.) of the Early Rose cultivar. 20-days-old potato plants were inoculated with a bacterial suspension of *B. thuringiensis* B-5351 (1×10^8 cells / ml) in distilled water, or in $1 \mu\text{M}$ SA solution by applying $5 \mu\text{l}$ of bacterial suspension to 4 upper leaves ($20 \mu\text{l}$ / plant). Control plants were treated with distilled water, and some plants were treated with $1 \mu\text{M}$ SA solution in the same volume. On the 7th day after inoculation with *B. thuringiensis* B-5351, the plants were infected with oomycete *P. infestans* spores ($5 \mu\text{l}$ of 1×10^5 spore/ml suspension per leaf). To assay the damaged area, leaves were photographed; the images were analyzed using the ImageJ software. 24 h after infection with late blight pathogen spores, plants were fixed to assess the transcriptional activity of *PR6*, *PR1* and *PAL* genes (See Table 1) (using CFX Connect Real-Time PCR Detection System Bio-Rad (USA)), and after 6, 24 and 48 h - to analyze the activity of plant proteinase inhibitors and the content of hydrogen peroxide. We estimated the number of colony-forming units (CFU) of microorganisms in plant tissues after their surface sterilization on the 7th day after inoculation of plants with *B. thuringiensis* B-5351 bacteria. The significance of the differences between the samples was accessed using Student's *t*-test ($p < 0.05$). Tables and Figures show data as the mean of the replicates and their standard

deviations ($M \pm SD$). All experiments were conducted in three-five biological and three analytical replicates.

In this work, we showed that SA presence increased the content of living cells of *B. thuringiensis* B-5351 bacteria in the internal tissues of plants ($2,3 \pm 1,5 \times 10^6$ CFU/g) as compared to individual treatment with the bacterial strain under investigation ($7,3 \pm 1,6 \times 10^5$ CFU/g) (See Table 2). Using the method of RAPD analysis, we established the identity of bacteria isolated from internal tissues of potato plants and the initial strain of *B. thuringiensis* B-5351 (See Fig. 1). Apparently, such titer of bacterial population regulated by plant signaling molecules in plant tissues is an important factor in the formation of plant resistance. Thus, we did not observe a decrease in the area of late blight symptoms on the leaves of potato plants treated only with *B. thuringiensis* B-5351, while under the individual action of SA this parameter decreased by half, and upon combined treatment of plants with SA and bacteria *B. thuringiensis* B-5351 - almost 4 times as compared to water-treated plants (See Fig. 2). Treatment with bacteria *B. thuringiensis* B-5351 increased the activity of proteinase inhibitors in potato plants only 6 h after infection with the late blight pathogen; in plants treated with bacteria cells of *B. thuringiensis* B-5351 together with SA, there was an almost a twofold increase in the activity of proteinase inhibitors after 6 and 24 h after infection with oomycete *P. infestans*. Under the influence of SA, a 15-20% increase in the content of H_2O_2 in intact plants was observed in all variants. In infected plants treated with SA, the H_2O_2 content exceeded the control values by more than 40%. In plants treated with a suspension of bacteria *B. thuringiensis* B-5351 and SA plants, the presence of the late blight pathogen caused a threefold increase in the H_2O_2 content 6 h after infection (See Fig. 3). In the variant with combined treatment with SA and bacteria *B. thuringiensis* B-5351 of non-infected plants, the content of PR6 gene transcripts exceeded the control level by 25%, as in infected plants treated with SA. Treatment of plants with SA together with bacteria *B. thuringiensis* B-5351 increased the number of PR6 gene transcripts by more than 50% relative to water-treated non-infected plants (See Fig. 4). In this work, we found that the strain of endophytic bacteria under investigation promoted the accumulation of transcripts of genes encoding PR1 and PAL proteins to the same extent as SA, both individually and when used together. In the presence of the late blight pathogen, more than a twofold (relative to this level in water-treated intact plants) increase in the content of PAL gene mRNA in potato plants was observed in cases of both individual and combined application of SA and *B. thuringiensis* B-5351 cells. Thus, treatment with *B. thuringiensis* B-5351 bacteria together with SA induces salicylate-dependent defense reactions (PR1, PAL), as well as an increase in the transcriptional activity of the PR6 gene, which, according to the literature, is a jasmonate-dependent gene.

Our results showed the effectiveness of the composition based on live bacteria *B. thuringiensis* B-5351 and SA in protecting potato plants from late blight by inducing systemic defense responses in plants. Taking into account the insecticidal activity of the strain under investigation against Russian wheat aphids and Colorado potato beetle, which we previously described, the possibility of increasing plant resistance to late blight by biocontrol agent combining *B. thuringiensis* B-5351 with SA can open one of the approaches to the development of multifunctional protection of plants from biotic influences.

The paper contains 4 Figures, 2 Tables and 34 References.

Key words: late blight; PR proteins; proteinase inhibitor; hydrogen peroxide.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation grant "Physiological basis of the formation of symbiotic relationships of potato plants with endophytic bacteria of the genus *Bacillus*" (Project No. 20-76-00003).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101:2691-2711. doi: [10.1007/s00253-017-8175-y](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y)
2. Lopes R, Tsui S, Gonçalves PJRO. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World J Microbiology and Biotechnology*. 2018;34:94-100. doi: [10.1007/s11274-018-2479-7](https://doi.org/10.1007/s11274-018-2479-7)
3. Rana KL, Kour D, Kaur T. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2020;113:1075-1107. doi: [10.1007/s10482-020-01429-y](https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y)
4. Tao A, Panga F, Huang S, Yu G, Li B, Wang T. Characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. *Biocontrol Science and Technology*. 2014;24:901-924. doi: [10.1080/09583157.2014.904502](https://doi.org/10.1080/09583157.2014.904502)
5. Takahashi H, Nakaho K, Ishihara T, Ando S, Wada T, Kanayama Y, Asano S, Yoshida S, Tsushima S, Hyakumachi M. Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis* - induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports*. 2014;33(1):99-110. doi: [10.1007/s00299-013-1515-1](https://doi.org/10.1007/s00299-013-1515-1)
6. Sorokan AV, Benkovskaya GV, Burkhanova GF, Blagova DK, Maksimov IV. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26DCryChS producing CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes multifaceted potato defense against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and pest *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Plants*. 2020;9:1115-1123. doi: [10.3390/plants9091115](https://doi.org/10.3390/plants9091115)
7. Kamle M, Borah R, Bora H, Jaiswal AK, Singh RK, Kumar P. Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): Role and mechanism of action against phytopathogens. Cham: Springer Publ.; 2020. 356 p.
8. Pallas JA, Paiva NL, Lamb C, Dixon R. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by Tobacco mosaic virus. *The Plant J*. 1996;10(2):281-293. doi: [10.1046/j.1365-3113X.1996.10020281.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1996.10020281.x)
9. Kudriavtseva NN, Sofin AV, Revina TA, Gvozdeva EL, Ievleva EV, Valueva TA. Secretion of proteolytic enzymes by three phytopathogenic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013;49(5):513-21. doi: [10.1134/S0003683813050074](https://doi.org/10.1134/S0003683813050074)
10. Maksimov IV, Blagova DK, Veselova SV, Sorokan AV, Burkhanova GF, Cherepanova EA, Sarvarova ER, Rumyantsev SD, Alekseev VYu, Khayrullin RM. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene BtcryIIa encoding CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. *Biological Control*. 2020;144:34-39. doi: [10.1016/j.biocontrol.2020.104242](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242)
11. *Praktikum po mikrobiologii: Uchebnoe posobie dlya stud. vyssh. ucheb. zavedenij* [Workshop on microbiology. Textbook for students of higher study institutions]. Netrusov AI, Egorova MA, Zaharchuk LM et al.; Netrusov AI, editor. Moscow: Akademiya Publ.; 2005. 608 p. In Russian
12. Bindschedler LM, Minibaeva FV, Gardner SL, Gerrish C, Davies DR, Bolwell GP. Early signaling events in apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve camp and Ca²⁺. *New Phytologist*. 2001;151:185-194. doi: [10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x)
13. El Komy MH, Saleh AA, Ibrahim YE, Molan YY. Early production of reactive oxygen species coupled with an efficient antioxidant system play a role in potato resistance to late blight. *Plant Pathology*. 2020;45:44-55. doi: [10.1007/s40858-019-00318-8](https://doi.org/10.1007/s40858-019-00318-8)
14. Mishra PK, Bisht SC, Ruwari P, Subbanna ARMS, Bisht JK, Bhatt JC, Gupta HS. Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from

- the North Western Indian Himalayas. *Annual Review of Microbiology*. 2017;67:143-155. doi: [10.1007/s13213-016-1244-0](https://doi.org/10.1007/s13213-016-1244-0)
15. Praca LB, Gomes ACMM, Cabral G, Martins ES, Sujii EH, Monnerat RG. Endophytic colonization by brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown *in vitro*. *Bt Research*. 2012;3:11-19. doi: [10.5376/bt.2012.03.0003](https://doi.org/10.5376/bt.2012.03.0003)
 16. Förster S, Schmidt LK, Kopic E, Anschütz U, Huang S, Schlücking K, Köster P, Waadt R, Larrieu A, Batistič O, Rodriguez PL, Grill E, Kudla J, Becker D. Wounding-induced stomatal closure requires jasmonate-mediated activation of GORK K⁺ channels by a Ca²⁺ sensor-kinase CBL1-CIPK5 complex. *Developmental Cell*. 2019;48:87-99. doi: [10.1016/j.devcel.2018.11.014](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.014)
 17. Mosher S, Moeder W, Nishimura N, Jikumaru Y, Joo SH, Urquhart W, Klessig DF, Kim SK, Nambara E, Yoshioka K. The lesion-mimic mutant *cpr22* shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner. *Plant Physiology*. 2010;152:1901-1913. doi: [10.1104/pp.109.152603](https://doi.org/10.1104/pp.109.152603)
 18. Chen X, Marszałkowska M, Reinhold-Hurek B. Jasmonic acid, not salicylic acid restricts endophytic root colonization of rice. *Frontiers in Plant Science*. 2020;10:1758-1770. doi: [10.3389/fpls.2019.01758](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01758)
 19. Lemos M, Borges A, Teodósio J, Araújo P, Mergulhão F, Melo L, Simões M. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. *Int Biodeterioration & Biodegradation*. 2014;86:42-51. doi: [10.1016/j.ibiod.2013.06.011](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.011)
 20. Yousefi H, Sanebani N, Mirabolfathy M. The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radices cucumerinum*. *Iranian J Plant Pathology*. 2011;4(184):85-87. doi: [10.3389/fimmu.2019.00564](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00564)
 21. Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Advanced Research*. 2019;19:29-37. doi: [10.1016/j.jare.2019.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004)
 22. Wang X., Wang J, Jin P, Zheng Y. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. *Int J Food Microbiology*. 2013;164:141-147. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.010](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.010)
 23. Wang M, Geng L, Sun X, Shu C, Song F, Zhang J. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L. *Biological Control*. 2020;145:104-115. doi: [10.1016/j.biocontrol.2020.104262](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104262)
 24. Paris R, Lamattina L. *Phytophthora infestans* secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato. *European J Plant Pathology*. 1999;105(8):753-760. doi: [10.1023/A:1008734527651](https://doi.org/10.1023/A:1008734527651)
 25. Zhang Q, Li W, Yang J, Xu J, Meng Y, Shan W. Two *Phytophthora parasitica* cysteine protease genes, PpCys44 and PpCys45, trigger cell death in various *Nicotiana* spp. and act as virulence factors. *Molecular Plant Pathology*. 2020;21(4):541-554. doi: [10.1111/mpp.12915](https://doi.org/10.1111/mpp.12915)
 26. Revina TA, Parfenov IA, Gvozdeva EL, Gerasimova NG, Valueva TA. Chymotrypsin and trypsin inhibitor isolated from potato tubers. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(3):239-244. doi: [10.1134/S0003683811030112](https://doi.org/10.1134/S0003683811030112)
 27. Zhang C, Wang X, Zhang F, Dong L, Wu J, Cheng Q, Qi D, Yan X, Jiang L, Fan S, Li N, Li D, Xu P, Zhang S. Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. *Science Reports*. 2017;7:1-13. doi: [10.1038/s41598-017-07832-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07832-2)
 28. Akram W, Mahboob A, Javed AA. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European J Microbiology and Immunology*. 2013;3:275-280. doi: [10.1556/eujmi.3.2013.4.7](https://doi.org/10.1556/eujmi.3.2013.4.7)

29. Islam N, Ali S, Choi S, Park Y, Baek K. Salicylic acid-producing endophytic bacteria increase nicotine accumulation and resistance against wildfire disease in tobacco plants. *Microorganisms*. 2020;8:64-78. doi: [10.3390/microorganisms8010031](https://doi.org/10.3390/microorganisms8010031)
30. Beris D, Theologidis I, Skandalis N, Vassilakos N. *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus Y. *Science Reports*. 2018;8:103-120. doi: [10.1038/s41598-018-28677-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28677-3)
31. Lastochkina O, Baymiev A, Shayahmetova A, Garshina D, Koryakov I, Shpirnaya I, Pusenkova L, Mardanshin I, Kasnak C, Palamutoglu R. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants*. 2020;9:76-81. doi: [10.3390/plants9010076](https://doi.org/10.3390/plants9010076)
32. Lastochkina O, Garshina D, Allagulova C, Fedorova K, Koryakov I, Vladimirova A. Application of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid to improve wheat growth and tolerance under combined drought and *Fusarium* root rot stresses. *Agronomy*. 2020;10:1343-1352. doi: [10.3390/agronomy10091343](https://doi.org/10.3390/agronomy10091343)
33. Pauw B, Memelink J. Jasmonate-responsive gene expression. *J Plant Growth Regulation*. 2004;23:200-210. doi: [10.1007/s00344-004-0033-3](https://doi.org/10.1007/s00344-004-0033-3)
34. Zhang K, Wang Y, Sun W, Han K, Yang M, Si Z, Li G, Qiao Y. Effects of exogenous salicylic acid on the resistance response of wild soybean plants (*Glycine soja*) infected with Soybean mosaic virus. *Canadian J Plant Pathology*. 2020;42:84-93. doi: [10.1080/07060661.2019.1641750](https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1641750)

*Received 31 August 2020; Revised 17 November, 2020;
Accepted 21 February 2021; Published 31 March, 2021.*

Author info:

Sorokan Antonina V, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRS RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>

E-mail: fourtyanns@gmail.com

Burkhanova Guzel F, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRS RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation.
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2346-3502>

E-mail: guzel_mur@mail.ru

Alekseev Valentin Yu, Junior Researcher, Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRS RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation.
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4441-3360>

E-mail: valentin-1994@yandex.ru

Maksimov Igor V, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Biochemistry of Plant Immunity, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences (IBG UFRS RAS), 71, Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russian Federation.
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0443-7547>

E-mail: igor.mak2011@yandex.ru