ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

СУРФАКТИН *BACILLUS SUBTILIS* 26Д В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ОТ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *STAGONOSPORA NODORUM* (BERK.)

Черепанова Е.А., Благова Д.К., Бурханова Г.Ф.,
Сарварова Е.С., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: k_cherepanova@mail.ru

В работе изучалась способность штаммов *B. subtilis* 26Д, продуцирующего сурфактин, и *B. subtilis* 26Д *sfp*-, дефицитного по синтезу сурфактина, влиять на рост фитопатогенного гриба *St. nodorum*, площадь инфицирования листьев пшеницы, предобработанной данными штаммами и экспрессию генов защитных белков пшеницы: PR-6, PR-9 и LOX. Показано, что синтез эндофитными бактериями сурфактина играет важную роль в защите пшеницы от возбудителя септориоза, обусловленного как прямыми антифунгальными свойствами, так и опосредованно, через индукцию защитных механизмов растений.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, мягкая пшеница, *B. subtilis* 26Д, сурфактин, *Stagonospora nodorum* (Berk.), экспрессия генов защитных белков растений

SURFACTIN *BACILLUS SUBTILIS* 26D IN WHEAT PROTECTION FROM THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *STAGONOSPORA NODORUM* (BERK.)

Cherepanova E.A., Blagova D.K.,
Burkhanova G.F., Sarvarova E.S., Maksimov I.V.

Institute of biochemistry and genetics of the Ufa Federal
research center of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: k_cherepanova@mail.ru

The ability of *B. subtilis* 26D strains producing surfactin and *B. subtilis* 26D *sfp*- deficient in surfactin synthesis to influence the growth of the phytopathogenic fungus *St. nodorum*, the area of infection of wheat leaves pretreated by these strains and expression of genes of wheat protective proteins: PR-6, PR-9 and LOX was studied. It is shown that the synthesis of surfactin by endophytic bacteria plays an important role in the protection of wheat from the causative agent of Septoria, caused both by direct antifungal properties, and indirectly, through the induction of protective mechanisms of plants.

Keywords: endophytic bacteria, soft wheat, *B. subtilis* 26D, surfactin, *Stagonospora nodorum* (Berk.), gene expression of plant protective proteins

Поступила в редакцию: 30.08.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346)

ВВЕДЕНИЕ

Значительный интерес среди широкого спектра секретируемых эндофитными бактериями биологически активных веществ привлекают липопептиды, представляющие собой низкомолекулярные соединения пептидной природы с жирнокислотным компонентом. Они способны проявлять фунгицидные, антибиотические, антивирусные и инсектицидные свойства, а также фитоиммуно-модулирующую активность. Синтезируются липопептиды с участием специальных мультиферментных комплексов - нерибосомальными пептидными синтетазами. Известно три основных класса циклических липопептидов: сурфактины, итурины и фенгицины [Fira et al., 2018]. Сурфактин является одним из самых широко изучаемых липопептидов. Он обладает свойством сильно снижать поверхностное натяжение воды, а также характеризуется уникальными антифунгальными свойствами [Bais et al., 2004; Jasim et al., 2016; Mardanova et al., 2017].

В качестве основы коммерческого препарата Фитоспорин-М, широко применяемого в России и содержащего бактерии *B. subtilis*, известен штамм *B. subtilis* 26Д. Установлено, что он способен продуцировать сурфактин [Лукиянцев 2010]. Нами ранее в геноме штамма *B. subtilis* 26Д был обнаружен ген *sfp*, кодирующий сурфактин-синтетазу [Бурханова и др.,

2018]. При этом не было обнаружено ни гена *ituD*, ответственного за синтез итурин-синтетаз, ни *fenD*, кодирующего фенгицин-синтетазу.

Использование микроорганизмов, дефицитных по продукции изучаемого вещества, – удобный современный метод определения его роли в природе. Поэтому нами для изучения роли бациллярного сурфактина в защите растений пшеницы от патогенного гриба *St. nodorum* был получен штамм *B. subtilis* 26Д *sfp*- с подавленной активностью экспрессии гена сурфактинсинтетазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использованы штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 26Д *sfp*- и выделенные из бактерий образцы ДНК для трансформации. Штамм *B. subtilis* 26Д, выделенный из коммерческого биопрепарата Фитоспорин–М (“Башинком”, Россия) выращивали на среде LB (%), бактотриптон – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.5, NaCl – 0.5) в ротационном инкубаторе при 200 об./мин и 28°C в течение 72 ч до полной споруляции. Для получения штамма *B. subtilis* 26Д *sfp*-, дефицитного по синтезу сурфактина, был использован интеграционный вектор pDG 1662. Фрагменты гена *sfp* встроены в вектор pDG 1662 по сайтам рестрикции XhoI и NdeI соответственно. После трансформации данным вектором в *B. subtilis* 26Д происходит рекомбинация и фрагмент вектора, ограниченный участками гена *sfp*, встраивается в геном бактерии, из-за чего ген *sfp* инактивируется. Бактерии выращивали на жидкой питательной среде LB, культивировали при $t=37^{\circ}\text{C}$ и 170 об⁻¹ 48 часов. РНК из бактерий выделяли с использованием реагента “Trizol” согласно протоколу фирмы “Sigma” (Германия). Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия). Последовательности праймеров, использованные для оценки транскрипции гена *sfp*: F:5-atgaagattacggaatttatatg-3 и R:5-cttcgtacgagaccattgtg-3, размер ампликона 644 п.н. [Nakano et al., 1992].

Степень ингибирования роста фитопатогенного гриба *Stagonospora nodorum* (фунгистатическую активность бактерий) анализировали методом двойной культуры [Whipps, 1987], и выражали в процентах проявления фунгистатической активности (таб.) Степень ингибирования роста в процентах вычисляли по формуле: $(R2-R1)/R2*100\%$, где R1 - радиус колоний грибов в направлениях к бактериям, R2 - радиус колоний грибов в направлениях к краю чашки Петри. Развитие бактериальных колоний фотодокументировали при помощи камеры SP-800UZ Image Stabilization.

Способность эндофитных бактерий контролировать развитие болезней растений (биоконтроль) изучалась на листьях проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Жница, инфицированных *St. nodorum*. Семена пшеницы были предварительно стерилизованы и предобработаны полусухим способом спорами *B. subtilis* из расчета 20 мкл суспензии клеток ($2*10^8$ КОЕ) на 1 грамм семян. Измерение КОЕ для определения конечного титра бактерий проводили с помощью спектрофотометра Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Варианты опыта включали обработку семян каждым штаммом в отдельности. Подсушенные семена высевались на увлажнённую фильтровальную бумагу, выращивались на 10%-ном растворе Хогланда– Арнона в климатической камере КС-200 СПУ (“Смоленский СКТБ СПУ”, Россия) с 16-часовым световым периодом при температуре 20/24 °C (ночь/день), интенсивность света 146 Вт/м² (лампы Osram L36W/77). Полностью развернутые листья шестисуточных проростков срезали, помещали во влажную камеру на фильтровальную

бумагу, срезы прикрывали ватой, смоченной в растворе бензимидазола (40 мг/л) [Palmer et al., 2002]. Листья инфицировали путем нанесения 4 мкл суспензии пикноспор гриба *St. nodorum* (10^5 спор/мл) из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УНЦ РАН. В контрольных вариантах вместо бактериальной суспензии использовали дистиллированную воду.

Площадь зоны поражения измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html), выражали отношением площади некротических пятен светло-коричневого до бурого цвета, окруженных желтым хлорозом, к общей площади поверхности инфицированного листа.

Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных растений пшеницы проводили с использованием реагента “Trizol” согласно протоколу фирмы “Sigma” (Германия), из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 24, 48 и 72 ч после инокуляции патогеном. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре Smart Spec Plus (“Bio-Rad”, США) при A260/A280. Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия).

Таблица 1. Аннотация использованных в работе нуклеотидных последовательностей

Защитный белок	Продукт	Номер последовательности в Генбанке	Источник
PR-6	Ингибитор протеиназ	EU293132.1	Adhikari et al., 2007
PR-9	Пероксидаза	AK333699	Максимов и др., 2014
LOX	Липоксигеназа	BJ223744	Diallo et al., 2014
RLI	Ингибитор РНКаз, ген «домашнего хозяйства»	AY059462	Gimenez et al., 2010

Анализ экспрессии генов PR-белков 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 для каждого гена) определяли относительно референсных генов RLI с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США). Используемые в работе нуклеотидные последовательности приведены в табл. 1.

Все эксперименты проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторностях. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по t-критерию Стьюдента при доверительном уровне $p \leq 0.95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для синтеза сурфактина необходима 4-фосфопантенил-трансфераза, которая посттрансляционно фосфопантетенилирует сериновый остаток в доменных белках первых трех субъединиц (SrfABC) сурфактинсинтетазы [Quadri, 1998]. Тиммуск с соавторами [Timmusk et al., 2015] получили штамм *Paenibacillus polymyxa* с нокаутированным геном *sfp*,

кодирующем 4-фосфопантенил-трансферазу. У данного микроорганизма был утрачен антагонизм к грибу *Fusarium graminearum*.

Рис. 1. Электрофореграмма результата от-ПЦР гена: 1– *B. subtilis* 26Д, 2 – *B. subtilis* 26Д *sfp*-, 3 – отрицательный контроль, М– маркер длин нуклеотидных фрагментов.

Основываясь на этих данных, нами получен штамм *B. subtilis* 26Д *sfp*- с подавленной активностью экспрессии гена сурфактинсинтетазы (рис. 1). Полученный штамм обладает устойчивостью к спектиномицину. Как видно, у штамма *B. subtilis* 26Д *sfp*-, в отличие от исходного *B. subtilis* 26Д, не образуется продукт гена *sfp*, следовательно, трансформация прошла успешно.

В таблице 2 приведены значения степени ингибирования роста гриба в % проявления фунгистатической активности. Видно, что исходный штамм бактерий сильнее тормозит рост гриба, чем трансгенный. Штамм *B. subtilis* 26Д на 23% сильнее снижал рост гриба, чем *B. subtilis* 26Д *sfp*-.

Таблица 2. Площадь поражения листьев пшеницы септориозом и антифунгальная активность бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 26Д *sfp*- против гриба *St. nodorum* Berk.

Показатель	Контроль	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 26Д <i>sfp</i> -
Площадь, % от общей площади листа	30±3.5	13±2	24±3
Степень ингибирования бактериями гриба, % проявления фунгистатической активности	0	73±4	50±3.5

Для оценки роли сурфактина в формирование защитной системы растений были проведены наблюдения за визуальными признаками развития септориоза на листьях пшеницы инфицировали 6-ти суточные листья пшеницы, предобработанной суспензией клеток бактерий штамма *B. subtilis* 26Д и мутанта *B. subtilis* 26Д *sfp*-. Контролем служили инфицированные *S. nodorum* листья пшеницы, необработанные бактериями.

Визуальное наблюдение в течение 7 суток после инфицирования возбудителем септориоза (рис. 2) показало, что контрольные растения пшеницы, а также варианты, обработанные дефицитными по гену сурфактин-синтетазы бактериями *B. subtilis* 26Д *sfp*-, были сильнее подвержены заражению, чем пшеница, предобработанная бактериями *B. subtilis* 26Д. Поскольку антагонистические способности по отношению к возбудителю септориоза выражены сильнее у исходного штамма *B. subtilis* 26Д, чем у *B. subtilis* 26Д *sfp*- можно полагать, что синтез сурфактина является важным показателем, формирующим защиту растений пшеницы от патогена.

Рис. 2. Проявление симптомов септориоза на листьях пшеницы, предобработанной:
А – дистиллированной водой; Б -бактериями *B. subtilis* 26Д, В – бактериями *B. subtilis* 26Д *sfp*-.

Известно, что кроме прямого фунгицидного воздействия бактериальные липопептиды характеризуются и опосредованным воздействием на фитопатогенов, активируя у растений хозяев фитоиммунный потенциал. Для оценки роли сурфактина в развитии защитных реакций растений от патогенов нами были проведены эксперименты по анализу влияние штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 26Д *sfp*- на транскрипционную активность некоторые гены, кодирующих защитные белки пшеницы: PR-6 (ингибитор протеиназы), PR-9 (анионная апопластная пероксидаза) и LOX (липоксигеназа).

Белки группы PR-6 являются ингибиторами протеиназ, предположительно нацеленными на микробные протеиназы и протеазы насекомых. Как видно из рис. 3А, в инфицированных возбудителем септориоза растениях, предобработанных бактериями *B. subtilis* 26Д, ген PR-6 обладает очень высокой чувствительностью к сурфактину. Его транскрипционная активность была более чем в 200 раз выше на протяжении всего опыта в сравнении как с контрольными растениями, так и пред-обработанными мутантной линией *B. subtilis* 26Д *sfp*-.

PR-9 белки - пероксидазы III класса, представляют важное звено антиоксидантной системы защиты растений и относятся к группе белков неспецифической ответной реакции на инфицирование [Максимов, Черепанова, 2006]. В случае атаки патогена пероксидазы реализуют один из самых ранних механизмов защиты, связанный с повышением уровня АФК. Лигнификация, осуществляемая пероксидазой, играет чрезвычайно важную роль в защите растений от фитопатогенов.

Как и следовало ожидать, инфицирование растений пшеницы грибом *S. nodorum* способствовало активации транскрипции гена PR-9, кодирующего анионную пероксидазу, в растениях, обработанных изучаемыми штаммами бактерий, уже через 24 часа в 3 раза сильнее, по сравнению с контрольными растениями. То есть бактерии и *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 26Д *sfp*- на начальных стадиях инфицирования патогенным грибом в одинаковой степени активировали ген PR-9. В последующем (24 и 48 часов после инфицирования), как видно (рис. 3Б) экспрессия гена PR-9 транзитно возвращалась в норму, но все же была выше в растениях, обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д.

Липоксигеназы (LOX), негемовые железосодержащие белки, являются ключевым звеном липоксигеназного сигнального пути растений. Они катализируют окисление некоторых ненасыщенных жирных кислот и их эфиров до гидроперекисей. Последние представляют собой субстраты для различных семейств ферментов. Среди множества продуктов ферментативных реакций ключевую роль играют сигнальные соединения растений, такие как жасмонаты, альдегиды, спирты и дивиниловые эфиры полиненасыщенных жирных кислот из листьев (антимикробные и антигрибковые соединения). Экспрессия гена, кодирующего LOX, существенно индуцировалась только в

растениях, предобработанных *B. subtilis* 26Д, через 24 часа после инфицирования. Как в необработанных, так и в обработанных *B. subtilis* 26Д *sfp*- растениях транскрипционная активность гена *LOX* практически не изменялась под влиянием гриба.

Рис. 3. Влияние бактерий рода *Bacillus* на уровень транскрипционной активности генов защитных белков пшеницы: PR-6 (А), PR-9 (анионной пероксидазы, Б) и LOX (В) в листьях растений пшеницы, через 24, 48 и 72ч после инфицирования грибом *St. nodorum*: 1 – непредобработанные бактериями, 2 - предобработанные *B. subtilis* 26Д, 3 - предобработанные *B. subtilis* 26Д *sfp*-.

Таким образом, *B. subtilis* 26Д, вероятно, благодаря способности продуцировать сурфактин, активирует ряд защитных генов растений, в то время, как дефицитный по гену сурфактин-синтез штамм почти не влиял на них. Причём особенной чувствительностью к сурфактину в наших опытах отличались гены ингибиторов протеиназ и липоксигеназ.

Совокупность полученных результатов позволяет нам сделать вывод, что бациллярный сурфактин играет важную роль в защите растений от септориоза злаков и она заключается не только в прямом его фунгицидном влиянии на гриб, но и опосредованно – через усиление экспрессии генов защитных белков растений.

Работа выполнена в рамках научного гранта РФФИ-офи_м № 17-29-08014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Благова Д.К., Максимов И.В. Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего// Материалы межд. научн.конф. PLAMIS. 2018. С. 15.
2. Лукьянцев М.А. Особенности биологической активности эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* Cohn. с различной степенью антагонизма к фитопатогенным грибам: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.А. Лукьянцев. Саратов, 2010.
3. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи соврем. биологии. 2006. Т. 126. № 3. С. 250-261.
4. Максимов И.В., Валеев А.Ш., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф. Влияние хитоолигосахаридов различной степени ацетилирования на активность патоген-индуцируемой анионной пероксидазы пшеницы// Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. N 1. С. 95-100.
5. Adhikari T.B., Balajib B., Breedena J., Goodwin S.B. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression//Physiological and Molecular Plant Pathology, V. 71, Is. 1–3, P. 55-68.
6. Diallo A.O., Agharbaoui Z., Badawi M.A., Ali-Benali M.A., Moheb A., Houde M., Sarhan F. Transcriptome analysis of an mvp mutant reveals important changes in global gene expression and a role for methyl jasmonate in vernalization and flowering in wheat //Journal of Experimental Botany. 2014. V. 65 Is. 9. P. 2271–2286.
7. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production// Plant Physiol. 2004. V. 134. № 1. P. 307-319;
8. Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens// J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. № 7. P. 869–878.
9. Farace G., Fernandez O., Jacquens L. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine // Mol. Plant Pathol. 2015. V. 16 № 2. P. 177-187.
10. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus species*// J. Biotechnology. 2018. V. 285. № 1. P. 44–55.
11. Gimenez M.J., Piston F., Martin A., Atienza S.G. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication// Food Chem, 2010. V. 118. P. 482–487.

12. Jasim B., Sreelakshmi K.S., Mathew J., Radhakrishnan E.K. Surfactin, Iturin and Fengycin Biosynthesis by Endophytic *Bacillus* sp. from *Bacopa monnieri*// Microb. Ecol. 2016. V. 72. № 1. P. 106–119.
13. Mardanov A.M., Hadieva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R. *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi // Agricultural Sciences. 2017. V. 8. P. 1-20.
14. Nakano M.M., Corbell N., Besson J. and Zuber P. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis* // Mol. Gen. Genet. 1992. V. 232. № 2, P. 313-321.
15. Ongena M., Jacques P. *Bacillus* Lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol // Trends in Microbiology. 2007. V. 16. P. 115 – 125.
16. Quadri L.E., Weinreb P.H., Lei M., Nakano M.M., Zuber P., Walsh C.T. Characterization of *Sfp*, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases// Biochemistry. 1998. V. 37. № 6. P. 1585-1595.
17. Sarosh B.R., Danielsson J., Meijer J. Transcript profiling of oilseed rape (*Brassica napus*) primed for biocontrol differentiate genes involved in microbial interactions with beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* from pathogenic *Botrytis cinerea*// Plant Mol. Biol. 2009. V. 70. № 1-2. P. 31-45.
18. Timmusk S., van West P., Gow N. A., Huffstutler R. P. *Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum* //J. Appl. Microbiol. 2015. V. 106. P.1473–1481.
19. Waewthongrak W., Leelasuphakul W., McCollum G. Cyclic Lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS–S14 Elicit Defense-Related Gene Expression in Citrus Fruit// PLoS One. 2014. V. 9. Is. 10. P. 1-11.
20. Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi // New Phytol. 1987. V.107. № 1. P. 127-142.