

УДК 581.1, 57.047

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus velezensis* M66 НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ПРИ РАЗВИТИИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary¹

© 2024 г. А. В. Сорокань^{а, *}, В. Ф. Габдрахманова^а, И. С. Марданшин^б, И. В. Максимов^а

^аИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра

Российской академии наук, Уфа, Россия

^бБакирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: fourtyanns@googlemail.com

Поступила в редакцию 07.03.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Изучено влияние штамма бактерий *Bacillus velezensis* M66 на устойчивость растений картофеля к оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary., вызывающему фитофтороз. Впервые показано накопление числа эндофитных бактерий *B. velezensis* M66 во внутренних тканях растений после инфицирования возбудителем болезни в сравнении с растениями, инокулированными только бактериями. Выявлено значительное сокращение площади поражения фитофторозом вне зависимости от агрессивности используемого штамма патогена. Формирование устойчивости растений под влиянием клеток *B. velezensis* M66 сопровождалось активацией ингибитора трипсина и пероксидаз, накоплением пероксида водорода и транскриптов генов, кодирующих ингибиторы протеиназ, β -1,3-глюканазу и анионную пероксидазу, а так же снижением уровня транскриптов гена *PR1* — маркера развития салицилат-зависимых реакций. По отношению к системе РНК-интерференции было выявлено, что агрессивный штамм *P. infestans* Sn стимулировал в растениях картофеля накопление транскриптов только гена, кодирующего Dicer-подобный белок (DCL), а менее агрессивный *P. infestans* 1840 — генов *DCL* и *Ago4*. Обработка растений бактериями *B. velezensis* M66 способствовала накоплению транскриптов гена *Ago1* как в здоровых, так и в инфицированных растениях. Инокуляция растений бактериями и последующее инфицирование оомицетом способствовало накоплению транскриптов всех исследованных генов системы РНК-интерференции. Можно полагать, что инокуляция растений клетками эндофитных бактерий штамма *B. velezensis* M66 способствует формированию устойчивости растений картофеля в отношении оомицета *P. infestans* посредством эффективного праймирования фитоиммунного потенциала.

Ключевые слова: *Bacillus velezensis*, *Phytophthora infestans*, картофель, про-/антиоксидантная система, РНК-интерференция, эндофиты, фитоиммунитет

DOI: 10.31857/S0015330324040039, EDN: MODMNQ

ВВЕДЕНИЕ

Совокупность микроорганизмов, ассоциированных с растением — микробиом — важный фактор модификации фенотипа растения-хозяина, обеспечивающий вариативность всей

системы макро- и микроорганизмов, на которую действуют факторы естественного отбора. Эндофитные микроорганизмы принимают активное участие в метаболизме растений [1, 2]. Вместе с тем, исследование трехстороннего взаимодействия между эндофитами, патогенами и растением является сложной, но тем не менее приоритетной задачей для понимания экологии сложных биосистем. Например, действие таких бактерий на устойчивость растений может быть

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324040039

Сокращения: ЖК — жасмоновая кислота; РНКи — РНК-интерференция; СК — салициловая кислота.

основано не только на антибиотическом действии их метаболитов на патогенов, но и на стимуляции защитных механизмов растений [1–3].

Одним из наиболее распространенных типов культивируемых эндофитных бактерий, обнаруженных в различных растениях, являются бактерии рода *Bacillus*, к которым относятся наиболее известные агенты биологического контроля — ассоциированные с растениями штаммы *B. thuringiensis*, *B. subtilis* и *B. velezensis* [1]. Так, эндофитный штамм *B. velezensis* FQ-G3 продемонстрировал превосходную ингибирующую активность в отношении *Botritis cinerea*, а плоды томатов, инокулированные этим штаммом, были меньше подвержены серой гнили [2]. Выделенный из побегов риса штамм *B. velezensis* J17-4 обладал значительным антагонистическим эффектом против патогена *Dickeya zeae* [4]. Важно, что выделенный из растений оливы штамм *B. velezensis* OEE1 проявлял антагонизм против оомицетов *Phytophthora ramorum*, *P. cryptogea*, *P. plurivora* благодаря биосинтезу спектра антибиотических соединений [5]. Неоднократно показана их способность индуцировать устойчивость растений к различным патогенам, в том числе возбудителю фитофтороза, наиболее экономически значимой болезни картофеля — оомицету *P. infestans* (Mont.) de Bary [6, 7]. Этот процесс опосредован праймированием защитных *PR*-генов с вовлечением фитогормонов, таких как жасмоновая (ЖК) и салициловая (СК) кислоты [7–9]. СК — известный участник защиты от биотрофов, индуцирующий экспрессию маркерных генов *PR1* (маркер развития системной приобретенной устойчивости), *PR2* (β -1,3-глюканазы) и *PR5* (тауматин-подобные белки) [9], тогда как ЖК эффективна против некротрофных патогенов и насекомых-вредителей и активирует экспрессию семейств генов *PR3* (хитиназы), *PR4* (белки с нуклеазной активностью), *PR6* (ингибиторы протеиназ) и *PR9* (пероксидазы) [8]. Соответственно, при инфицировании гемибиотрофным патогеном, таким как *P. infestans*, СК-зависимые реакции эффективны во время биотрофной фазы, а ЖК-зависимые — во время некротрофной фазы [7, 8].

Особое место в системном и клеточном иммунитете растений занимает механизм, названный Файером и Мэллоу термином “РНК-интерференция” (РНКи), по аналогии с наложением волн в физике — высоко видоспецифичный иммунный компонент, являющийся эволюционно консервативным [10]. РНКи принадлежит ключевая роль в эпигенетических изменениях, контроле перемещения мобильных генетических элементов, регуляции экспрессии генов, стабильности генома и образования гетерохроматина, а также в осуществлении реакций в ответ на действия различных стрессовых факторов [10,

11]. Механизм РНКи регулирует экспрессию генов эукариот по принципу гомологии. В процессе участвуют малые РНК (20–26 п.о.) и взаимодействующий с нуклеиновыми кислотами комплекс белков, включающий РНК-зависимую РНК-полимеразу, Dicer-подобные белки (DCL), белки-аргонауты (Ago) и белки, задействованные в процессе РНК-зависимого ДНК-метилирования. Фермент DCL расщепляет двуцепочечные РНК на короткие фрагменты, включающиеся в белковый комплекс RISC (РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс), связываясь с белками Ago, взаимодействующими затем с целевым гомологичным фрагментом РНК [10, 11].

Посредством механизма РНКи в организме формируется уникальная и эффективная стратегия защиты от патогенных микроорганизмов — хозяин-индуцированный генный сайленсинг. На современном этапе исследований описано формирование этого механизма с участием отвечающих за РНКи белков растений картофеля, инокулированных оомицетом *P. infestans* [12, 13]. Хорошо известно о наличии у оомицетов, представителей рода *Phytophthora*, супрессоров сайленсинга, способствующих инфицированию растения. Описано наличие и механизмы действия супрессоров сайленсинга PSR1 и PSR2 для *Phytophthora sojae* и *P. capsici* [14–17]. Так, заражение растений арабидопсиса *P. capsici* приводит к увеличению производства разнообразного пула вторичных малых интерферирующих РНК (миРНК), которые обнаруживаются во внеклеточных везикулах и, вероятно, подавляют гены-мишени у патогена. Эффектор PSR2 специфически ингибирует биогенез вторичной миРНК у арабидопсиса и способствует увеличению восприимчивости растений к инфекции [16]. У *P. infestans* был найден другой предположительный супрессор сайленсинга — Pi14054 [19]. Так, внедрение последовательности гена Pi14054 в геном вируса морщинистости репы (TCV) на место известного вирусного супрессора РНКи вызывало такие же реакции у растений, как и нативный вирус, в частности, снижение экспрессии генов *Ago* и *DCL* [19]. Наличие в арсенале *Phytophthora* различных видов супрессоров сайленсинга показывает важность механизма РНКи в защите растений от фитопатогенов данного рода, стремящихся его преодолеть [20].

Влияние эндофитов на механизм РНКи растения-хозяина остается крайне малоизученным. Так, по последним данным, под действием *B. amyloliquefaciens* Ba13 количество вирусных частиц вируса желтой курчавости листьев томата (TYLCV) в листьях томата снижалось на 70.1%, а транскрипционная активность генов *Ago3*, *Ago4*, *Ago5* и *Ago7* увеличивалась в 2.44–6.73 раза [3].

В связи с этим целью работы является оценка влияния инокуляции растений картофеля

эндофитными бактериями штамма *B. velezensis* M66 на механизм РНКи при инфицировании их различными по агрессивности штаммами оомицета *P. infestans* 1840 и *P. infestans* Sn.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный и микробный материал. В работе использовали стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя Роза, полученные методом микроклонирования и выращенные в пробирках с МС-средой [21] в климатической камере KBW E6 (Binder GmbH, Германия) с 16-часовым световым периодом при 20–22°C в течение 21 суток.

Бактерии штамма *Bacillus velezensis* M66 были выделены из внутренних тканей стеблей картофеля сорта Удача (Чишминский район, Башкортостан) и депонированы в коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН [22]. Последовательность 16sРНК штамма зарегистрирована в базе GenBank (accession number PP396155). Культуру бактерий выращивали на жидком лизогенном бульоне (LB) (1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.5% NaCl) при 20–22°C на лабораторных шейкерах OS-20 (BioSan, Латвия) (120 об./мин).

Для формирования системы “растение + эндофит” стерильные 15-дневные растения картофеля инокулировали по ранее описанной методике [6, 23] с бактериями *B. velezensis* M66, выращенными на питательной среде LB, путем нанесения мазка бактериальной массы на нижнюю треть стебля.

Фитопатоген и инокуляция. Для инфицирования растений картофеля использовали зооспоры двух штаммов оомицета *P. infestans* 1840 и *P. infestans* Sn. Патоген выращивали на агаризованной ржаной среде в течение 7 дней [24]. Поверхности колоний промывали дистиллированной водой при температуре 4°C в течение 30 мин, после чего оценивали в камере Фукса-Розенталя количество спорангиев. Растения инфицировали 10⁵ спор/мл суспензией на 7 сутки после инокуляции бактериальной массой. Исследование симптомов проводили с использованием фитопатологических газонов, на 10 сутки после заражения растений возбудителем фитофтороза, пораженность определяли в процентах площади поражения к общей площади листьев. Изображения исследовали с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США). В качестве контроля использовали растения, обработанные водой и не зараженные патогеном.

Определение титра эндофитных микроорганизмов в тканях растений. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) эндофитных микроорганизмов определяли через 24 ч после инфицирования растений *P. infestans*. Для этого

навески по 100 мг экспериментальных растений (из верхушечной части или корней 3 разных растений), поверхностно стерилизовали по следующей схеме: 70% этанол — 1 мин; 5% раствор пероксида водорода — 3 мин; дистиллированная вода. Стерильность поверхности определяли по отсутствию роста бактерий в отпечатках листьев и корней на поверхности агаризованной среды LB. Навески растений гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением 2 мл стерильной воды. Аликвоты гомогената после разбавления (100 мкл) распределяли по поверхности агаризованной среды LB при помощи шпателя Дригальского до полного высыхания. Чашки Петри инкубировали при температуре 28°C в термостате ТС-1/20 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) в течение 24 ч. Подсчет КОЕ производили во втором и третьем разведении, и их количество пересчитывали на 1 г сырой массы растений [6, 23].

Биохимические исследования. Навеску пробирочных растений растирали в 0.025 М фосфатном буфере (pH 6.2) в соотношении 1 : 5, экстрагировали 30 мин при 4°C, затем центрифугировали 10 мин при 8000 g на микроцентрифуге 5415R (Eppendorf, США). Активность пероксидазы измеряли микрометодом с использованием орто-фенилендиамина в качестве субстрата. Концентрацию пероксида водорода измеряли с использованием красителя ксиленолового оранжевого. Для определения активности ингибитора трипсина использовали реакцию с субстратом Nα-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид (БАПНА). Оптическую плотность определяли на спектрофотометре LS-55 (Perkin Elmer, США) при длине волны 409 нм [6].

Выделение тотальной РНК и проведение ПЦР в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК проводили через 24 ч после инокуляции растений картофеля суспензией спор *P. infestans*, с использованием реактива “Лира” (Биолабмикс, Россия), согласно протоколу фирмы-поставщика. Для этого растения фиксировали в жидком азоте. Содержание нуклеиновых кислот измеряли по A260/A280 на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США), предварительно растворив образцы в трис-ЭДТА буфере.

Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика “Синтол” (Россия). Анализ экспрессии генов *StPR*-белков (*S. tuberosum* PR-гены) и генов системы РНКи проводили методом количественной ПЦР 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) определяли относительно референсного гена актина с помощью программного обеспечения iCycler iQ5 Real Time Detection System software (Bio-Rad, США). Используемые в работе нуклеотидные последовательности праймеров приведены в табл. 1 (Дополнительные материалы).

Статистика. Все опыты проведены в 3–5 биологических и 3 аналитических повторностях. Экспериментальные данные выражали в виде средних значений $\pm$ стандартные ошибки, значения которых рассчитывали для всех вариантов обработок с использованием MS Excel. Значимость различий оценивали с применением дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Дункана ($P < 0.05$) с помощью программного обеспечения STATISTICA 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из двух исследованных штаммов возбудителя фитофтороза штамм *P. infestans* Sn обладал несколько большей агрессивностью, что выражалось в более сильном, чем в случае *P. infestans* 1840, проявлении симптомов болезни на листьях растений картофеля (рис. 1а). При этом обработка растений клетками бактерий *B. velezensis* M66 сокращала площадь развития характерных для фитофтороза симптомов на листьях в равной степени для обоих штаммов.

Оценка числа клеток эндофитного штамма *B. velezensis* M66 в тканях растений картофеля, инфицированных возбудителем фитофтороза, показала присутствие до $66.75 \pm 9.9 \times 10^4$ КОЕ *B. velezensis* M66/г сырой массы побегов к восьмым суткам после инокуляции бактериями

(рис. 1б). Интересно, что уже к первым суткам после инфицирования растений картофеля суспензией спор патогена *P. infestans* Sn наблюдалось до $199.3 \pm 18.0 \times 10^4$ КОЕ *B. velezensis* M66/г сырой массы побегов, а при инфицировании *P. infestans* 1840 – до $109.3 \pm 13.2 \times 10^4$ КОЕ/г сырой массы побегов. Таким образом, инфицирование преобработанных клетками *B. velezensis* M66 растений картофеля разными штаммами патогена увеличивало численность клеток бактерий в растениях.

Анализ биохимических показателей выявил, что штамм *P. infestans* Sn вызывал резкое снижение содержания пероксида водорода и препятствовал увеличению активности пероксидаз в инфицированных растениях, в случае же со слабовирулентным штаммом *P. infestans* 1840 наблюдалась активация пероксидаз, на фоне отсутствия выраженного накопления H_2O_2 (рис. 2). В обоих случаях активность ингибиторов протеиназ была выше контрольных показателей. Под действием бактерий *B. velezensis* M66 в неинфицированных растениях увеличивалась активность ингибиторов протеиназ и пероксидаз, однако окислительного взрыва не наблюдалось. Инфицирование обработанных эндофитными бактериями растений *P. infestans* Sn частично предотвращало резкое снижение уровня H_2O_2 , но не влияло на остальные показатели относительно наблюдаемых в не содержащих эндофиты инфицированных растениях. При этом в обработанных *B. velezensis* M66 растениях после инфицирования *P. infestans* 1840 наблюдалось двукратное превышение содержания H_2O_2 , активности ингибиторов протеиназ и увеличение на 40% активности пероксидаз относительно контрольных показателей (рис. 2).

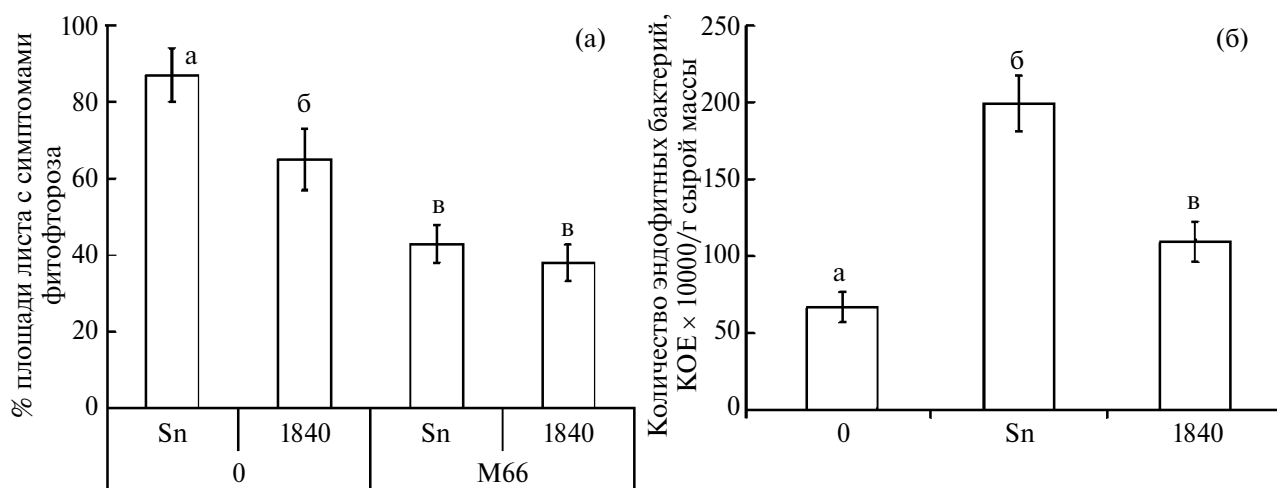


Рис. 1. Процент площади листовой пластинки с видимыми симптомами фитофтороза на растениях картофеля под влиянием бактерий *Bacillus velezensis* M66 на 8 сутки после нанесения спор патогена (а); количество КОЕ эндофитных бактерий *B. velezensis* M66 в тканях картофеля через 24 ч после инфицирования возбудителем фитофтороза (б). 0 – неинфицированные растения. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$).

Под воздействием возбудителей фитофтороза *P. infestans* Sn и *P. infestans* 1840 активность транскрипции гена *StPR1* значительно увеличивалась, в особенности, в случае агрессивного штамма *P. infestans* Sn, под воздействием которого также снижалось количество транскриптов гена *StPR9*. Инфицирование растений *P. infestans* 1840 вызывало также увеличение транскрипционной активности гена *StPR2* (рис. 3).

При контакте растений с *B. velezensis* M66 относительное содержание транскриптов гена *StPR1*, напротив, снижалось, а других рассматриваемых генов оставалось без изменений. В случае воздействия *P. infestans* Sn на растения, обработанные *B. velezensis* M66 наблюдалось 1.5–2-кратное увеличение относительного содержания транскриптов исследуемых генов (*StPR1*, *StPR2*, *StPR9*) по отношению к неинфицированным и неинокулированным растениям (рис. 3). В случае инфицирования *P. infestans* 1840 растений, обработанных *B. velezensis* M66, уровень транскриптов поднимался на 50% относительно контрольных растений только для генов *StPR6* и *StPR9* (рис. 3).

Под воздействием возбудителей фитофтороза штаммов *P. infestans* Sn и *P. infestans* 1840 активность транскрипции гена *StAgo1* значительно не изменялась, а количество транскриптов гена *StAgo4* увеличивалось в 2 раза относительно контрольных показателей только в случае инфицирования штаммом *P. infestans* 1840 (рис. 4). При этом транскрипционная активность гена *StDCL1* увеличивалась под воздействием обо-

их исследуемых штаммов, причем в случае *P. infestans* 1840 — более значительно.

Во всех вариантах воздействия на растения *B. velezensis* M66, как в здоровых, так и инфицированных обоими штаммами *P. infestans* наблюдалось увеличение относительного содержания транскриптов гена *StAgo1* на 30% относительно неинфицированных и неинокулированных растений (рис. 4), чего не наблюдалось под воздействием оомицета в отдельности. При этом присутствие *B. velezensis* M66 в тканях здоровых растений снижало содержание транскриптов гена *StDCL1* на 50% относительно контрольных растений, что было прямо противоположно эффекту заражения оомицетом. Так, в случае инфицирования содержащих эндофитные клетки *B. velezensis* M66 растений *P. infestans* Sn происходило двукратное увеличение содержания транскриптов гена *StDCL1*, а под воздействием *P. infestans* 1840 превышение содержания транскриптов достигало 70%, что соответствует тенденции, наблюдаемой в инфицированных растениях, не содержащих эндофитных бактерий (рис. 4). Интересно, что при совместном влиянии на растения бактериального штамма и обоих исследуемых штаммов оомицетов транскрипционная активность гена *StAgo4* увеличивалась в той же степени, что и под индивидуальным воздействием менее агрессивного штамма *P. infestans* 1840, что говорит о важности его продукта в защитных реакциях от фитофтороза и возможном подавлении транскрипции этого гена более агрессивным штаммом *P. infestans*.

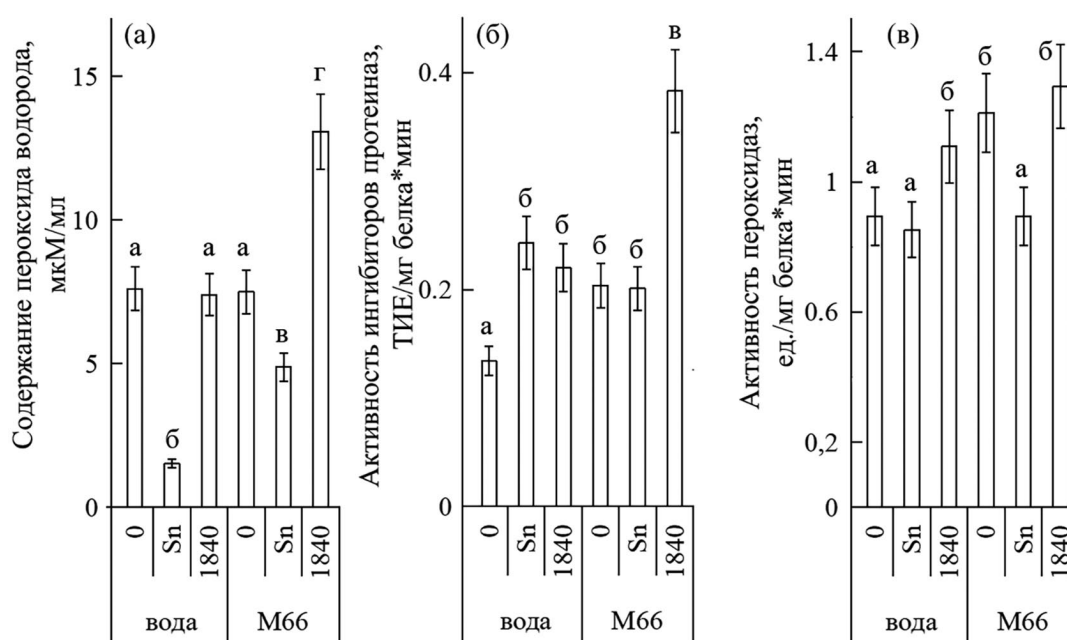


Рис. 2. Влияние бактерий *Bacillus velezensis* M66 на содержание пероксида водорода (а), активность ингибиторов трипсина (б) и пероксидаз (в) в здоровых и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* 1840 и *P. infestans* Sn растениях картофеля через 24 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$).

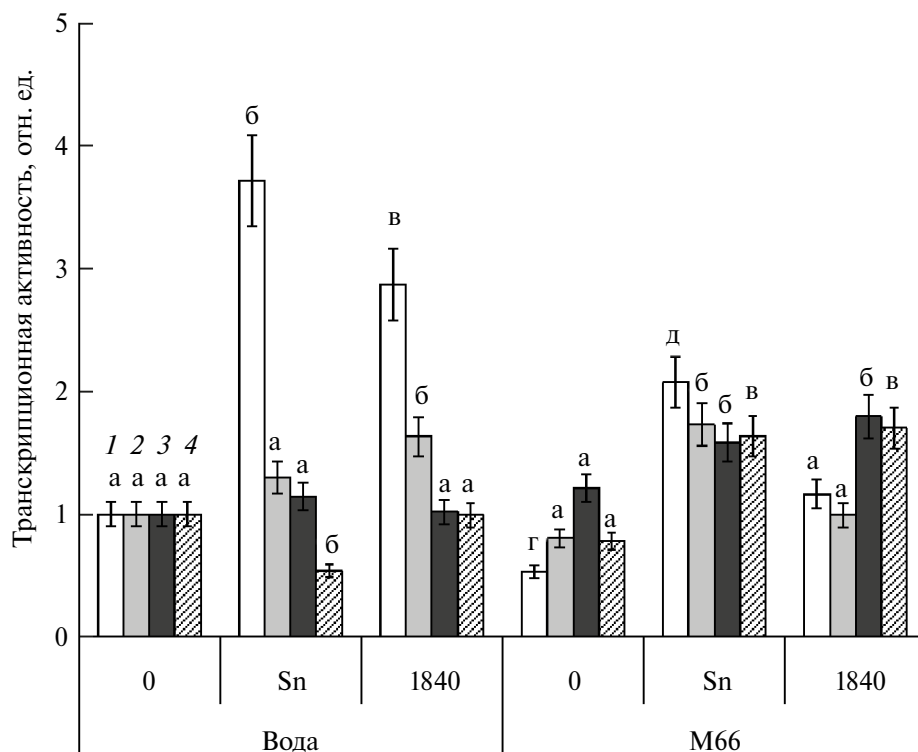


Рис. 3. Влияние бактерий *Bacillus velezensis* M66 на относительное количество транскриптов генов ингибитора трипсина *StPR6* (1), основного защитного белка – индикатора развития системной приобретенной устойчивости *StPR1* (2), хитиназы *StPR2* (3) и анионной пероксидазы *StPR9* (4) в здоровых и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* 1840 и *P. infestans* Sn растениях картофеля (24 ч после нанесения спор патогена). Транскрипционная активность каждого исследуемого гена нормализована относительно референсного гена актина картофеля. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$). Сравнение производилось для каждого конкретного гена в отдельности.

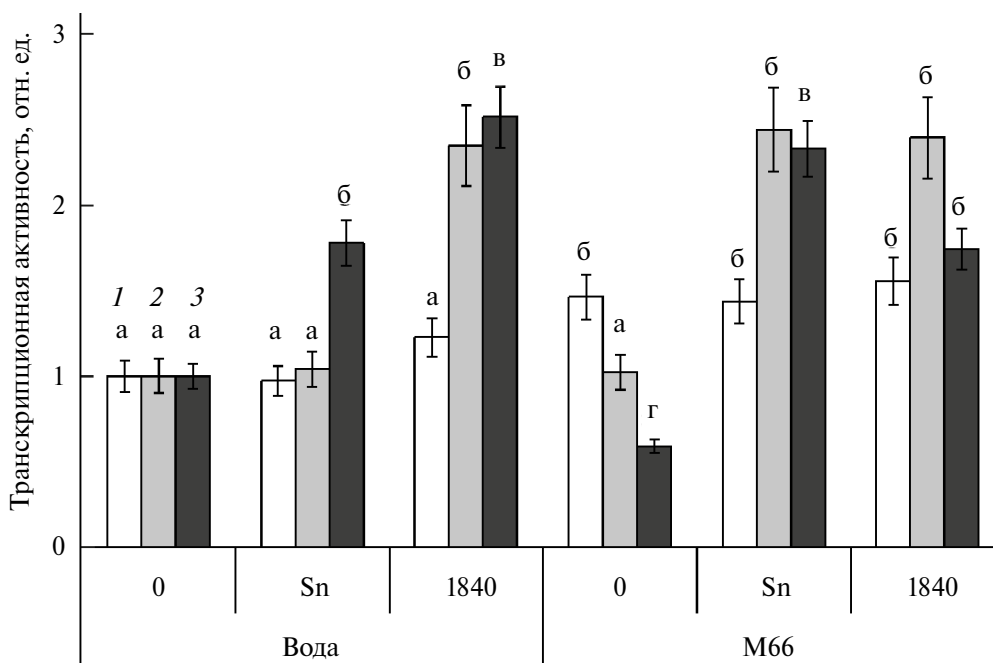


Рис. 4. Влияние бактерий *Bacillus velezensis* M66 на относительное количество транскриптов генов системы РНК-интерференции *StAgo1* (1), *StAgo4* (2) и *StDCL* (3) в здоровых и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* 1840 и *P. infestans* Sn растениях картофеля (24 ч после нанесения спор патогена). Транскрипционная активность каждого исследуемого гена нормализована относительно референсного гена актина картофеля. Разными буквами обозначены варианты, показавшие статистически значимые отличия друг от друга ($P \leq 0.05$). Сравнение производилось для каждого конкретного гена в отдельности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Совместная эволюция предковых растений с микроорганизмами, вероятно, насчитывает более 450 млн лет [25], с заселения ими суши. Эндوفиты, как и патогенные микроорганизмы, наиболее тесно встроены в экологическую нишу, предоставляемую растением, но меньше всего мы располагаем информацией об основных принципах организации их “трехчастного” симбиоза [1, 2, 25].

Так, если эндифитно существующие в тканях макросимбионта бактерии способны участвовать в биоконтроле фитопатогенов и праймировать иммунные реакции растений [1, 2, 25], то патоген вступает во взаимодействие со всей этой системой, и, соответственно, может оказывать прямое и опосредованное иммунными реакциями растения влияние на состав мутуалистической флоры. В нашей работе впервые показано, что инфицирование растений возбудителем фитофтороза вызвало увеличение числа клеток эндифитных микроорганизмов в тканях хозяина, причем в случае с инфицированием растений более агрессивным штаммом *P. infestans* Sn наблюдался более выраженный эффект на этот параметр. Важно отметить, что снижение площади симптомов фитофтороза на листьях содержащих эндифитные бактерии *B. velezensis* M66 растений было одинаковым в случае обоих штаммов, что говорит о вероятной значимости количества ассоциированных с растением микроорганизмов в реализации защитного ответа целостной системы растение/сообщество эндифитов. Так, ранее нами было показано, что под влиянием СК происходит увеличение количества КОЕ *B. subtilis* 26Д, что может быть одним из факторов, обуславливающих более высокий защитный эффект против фитофтороза, чем в варианте обработки *B. subtilis* 26Д индивидуально на фоне крайне низкого воздействия взятой концентрации СК на устойчивость растений к патогену [26].

Обработка растений *B. velezensis* M66 стимулировала в них активность ингибиторов протеиназ и пероксидаз растений в отсутствие патогена, формируя некоторый конститутивный барьер для инфицирования. Это, по-видимому, являлось одним из факторов, обеспечивающих защитный эффект, так как, например, высокая агрессивность штамма *P. infestans* Sn могла быть связана именно подавлением иммунного ответа растений, в частности, реакций, связанных с развитием окислительного взрыва (снижение содержания пероксида водорода, активности пероксидаз и транскрипционной активности гена анионной пероксидазы (*StPR9*), и, вероятно, других ЖК-зависимых механизмов). Об этом косвенно свидетельствует многократное на-

копление транскриптов маркера СК-зависимых реакций, гена *StPR1*, в инфицированных *P. infestans* Sn растениях [7].

Большинство ассоциированных с растениями микроорганизмов активируют индуцированную системную устойчивость через ЖК-зависимый сигнальный путь [25]. Ранее нами было показано участие ЖК в защитном ответе картофеля на возбудитель фитофтороза *P. infestans* и увеличение транскрипционной активности ЖК-зависимых генов и генов биосинтеза ЖК под действием штамма *B. subtilis* 26Д [6]. В данной работе показано, что обработка растений суспензией клеток эндифитного штамма *B. velezensis* M66 приводила к накоплению транскриптов ЖК-зависимых генов *StPR6* и *StPR9* в растениях, инокулированных двумя штаммами возбудителя фитофтороза, а также полностью нивелировала увеличение транскрипции СК-зависимых генов в инфицированных менее агрессивным штаммом, и снижала таковое в инфицированных более агрессивным штаммом растениях. Следует отметить, что выбранная временная точка соответствует переходу возбудителя фитофтороза из биотрофной фазы в некротрофную, и, вероятно, увеличение транскрипционной активности ЖК-зависимых генов является ключевым событием на этом этапе [7, 8].

В развитии устойчивости растений к патогенам важную роль играет эпигенетическая регуляция, включающая механизмы РНКи. Белки DCL и Ago являются неразрывно связанными компонентами механизма РНКи, поскольку при их совместном участии генерируются микроРНК (miRNA), подавляющие гены-мишени патогена [27]. Поэтому увеличение транскрипции исключительно гена *StDCL1* при инфицировании *P. infestans* Sn, вероятно, было индуцировано патогеном и не обеспечивало эффективной защиты от внедрения патогена в ткани. В экспериментах с использованием риса и арабидопсиса при грибной инфекции сайленсинг гена *DCL1* приводил к усилению устойчивости к *Magnaporthe oryzae* и *Sclerotinia sclerotiorum*, соответственно [28, 29]. Присутствие эндифитных бактерий в тканях растений без инфицирования патогеном, напротив, подавляло транскрипционную активность данного гена, что, однако, не было препятствием для увеличения этого параметра в присутствии патогена.

Менее агрессивный штамм *P. infestans* 1840, помимо *StDCL1*, воздействовал на транскрипционную активность гена *StAgo4*, который считается важным компонентом в регуляции устойчивости растений к биотическим воздействиям [27]. Так, *Ago4* оказался важным в формировании защитной реакции у растений ди-

кого табака *Nicotiana attenuata* к возбудителю стеблевых гнилей грибу *Fusarium brachygibbosum*, а замалчивание его синтеза нарушало работу жасмонатной сигнальной системы [30]. Транскрипционная активность этого гена была высокой в инфицированных обоими штаммами растениях, обработанных *B. velezensis* M66, что могло обусловить их возросшую устойчивость к фитофторозу.

Обработка растений *B. velezensis* M66 приводила к увеличению уровня транскриптов гена *StAgo1*, в равной степени в неинфицированных и инфицированных штаммами возбудителя фитофтороза растениях, что являлось специфической особенностью растений, содержащих эндофитные микроорганизмы. Основная функция белков Ago в растениях — связывание siRNA и miRNA, генерируемых с участием DCL белков, а также их использование в качестве “направляющего” при узнавании и последующем расщеплении РНК генов-мишеней на транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях [1, 2]. Имеющая гомологию с участком гена, кодирующего транскрипционный фактор семейства AP2/ERF (факторы, участвующие в регуляции ЖК-зависимых реакций), miR172 идентифицирована как регулятор устойчивости растений томатов к оомицету *P. infestans* [31]. Важно отметить, что в нашей работе в растениях картофеля, обработанных *B. velezensis* M66 наблюдалась повышенная относительно контрольных значений активность транскрипции как генов *Ago*, так и зависимых от ЖК генов *StPR6* и *StPR9*.

Таким образом, эндофитные микроорганизмы, такие как *B. velezensis* M66, могут быть эффективными агентами для защиты растений от патогенов благодаря очень глубокой интеграции в систему регуляции фитоиммунного потенциала растений, и их использование в качестве компонентов биопрепаратов для защиты растений является весьма перспективным.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu X., Wang Z., Zhang R., Xu T., Zhao J., Liu Y. Diversity of endophytic bacteria in hybrid maize seeds and *Bacillus mojavensis* J2416-7 may be capable of vertical transmission // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. P. 213.
<https://doi.org/10.1007/s00203-022-02824-x>
2. Kim J.A., Song J.S., Kim P.I., Kim D.H., Kim Y. *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a promising agent for biocontrol of plant pathogenic fungi // J. Fungi (Basel). 2022. V. 8. P. 1053.
<https://doi.org/10.3390/jof81010532>
3. Guo Q., Sun Y., Ji C., Kong Z., Liu Z., Li Y., Li Y., Lai H. Plant resistance to tomato yellow leaf curl virus is enhanced by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 through modulation of RNA interference // Front. Microbiol. 2023. V. 14. P. 1251698.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1251698>
4. Shi Z., Hong W., Wang Q. Complete genome resource of *Bacillus velezensis* J17-4, an endophyte isolated from stem tissues of rice // Plant Dis. 2022. V. 106. P. 727.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0996-A>
5. Cheffi M., Bouket A.C., Alenezi F.N., Luptakova L., Belka M., Vallat A., Rateb M.E., Tounsi S., Triki M.A., Belbahri L. *Olea europaea* L. root endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 counteracts oomycete and fungal harmful pathogens and harbours a large repertoire of secreted and volatile metabolites and beneficial functional genes // Microorganisms. 2019. V. 7. P. 314.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7090314>
6. Sorokan A., Benkovskaya G., Burkhanova G., Blagova D., Maksimov I. 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. V. 9: 1115.
<https://doi.org/10.3390/plants9091115>
7. Coles D.W., Bithell S.L., Mikhael M., Cuddy W.S., Plett J.M. Chickpea roots undergoing colonisation by *Phytophthora medicaginis* exhibit opposing jasmonic acid and salicylic acid accumulation and signaling profiles to leaf hemibiotrophic models // Microorganisms. 2022. V. 10: 2. P. 343.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020343>
8. Li N., Han X., Feng D., Yuan D., Huang L.-J. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 671.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030671>
9. Huang S., Zhang X., Fernando W.G.D. Directing trophic divergence in plant-pathogen interactions: antagonistic phytohormones with NO doubt? // Front. Plant Sci. 2020. V. 11: 600063.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.600063>
10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by

- double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. 1998. V. 391: 6669. P. 806.
<https://doi.org/10.1038/35888>
11. Maksimov, I.V., Shein, M.Y. & Burkhanova, G.F. RNA Interference in plant protection from fungal and oomycete infection // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 16–31.
<https://doi.org/10.1134/S000368382210106>
 12. Jahan S.N., Asman A.K., Corcoran P., Fogelqvist J., Vetukuri R.R., Dixelius C. Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 2785.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv094>
 13. Sanju S., Siddappa S., Thakur A., Shukla P.K., Srivastava N., Pattanayak D., Sharma S., Singh B.P. Host-mediated gene silencing of a single effector gene from the potato pathogen *Phytophthora infestans* imparts partial resistance to late blight disease // Funct. Integr. Genomic. 2015. V. 15. P. 697.
<https://doi.org/10.1007/s10142-015-0446-z>
 14. Qiao Y., Liu L., Xiong Q., Flores C., Wong J., Shi J., Wang X., Liu X., Xiang Q., Jiang S., Zhang F. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors // Nat. Genet. 2013. V. 45. P. 330.
<https://doi.org/10.1038/ng.2525>
 15. Gui X., Zhang P., Wang D., Ding Z., Wu X., Shi J., Shen Q.-H., Xu Y.-Z., Ma W., Qiao Y. *Phytophthora* effector PSR1 hijacks the host pre-mRNA splicing machinery to modulate small RNA biogenesis and plant immunity // Plant Cell. 2022. V. 34: 9. P. 3443.
<https://doi.org/10.1093/plcell/koac176>
 16. Hou Y., Zhai Y.I., Feng L.I., Karimi H.Z., Rutter, B.D., Zeng L., Choi D.S., Zhang B., Gu W., Chen X., Ye W., Innes R.W., Zhai J., Ma W. A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility // Cell Host Microbe. 2019. V. 25. P. 153.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.007>
 17. de Vries S., von Dahlen J.K., Uhlmann C., Schnake A., Kloesges T., Rose L.E. Signatures of selection and host-adapted gene expression of the *Phytophthora infestans* RNA silencing suppressor PSR2 // Mol. Plant Pathol. 2017. V. 18. P. 110.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12465>
 18. Xiong Q., Ye W., Choi D., Wong J., Qiao Y., Tao K., Wang Y., Ma W. *Phytophthora* suppressor of RNA silencing 2 is a conserved RxLR effector that promotes infection in soybean and *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. P. 1379.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0190-R>
 19. Vetukuri R.R., Whisson S.C., Grenville-Briggs L.J. *Phytophthora infestans* effector Pi14054 is a novel candidate suppressor of host silencing mechanisms // Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 149. P. 771.
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1222-9>
 20. Parperides E., El Mounadi K., Garcia-Ruiz H. Induction and suppression of gene silencing in plants by nonviral microbes // Mol. Plant Pathol. 2023. V. 24. P. 1347.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13362>
 21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 22. Каталог штаммов и изолятов коллекции эндофитных микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (2018), Уфа. <http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc>
 23. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Максимов И.В. Влияние совместной обработки эндофитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* В-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 109.
<https://doi.org/10.17223/19988591/53/6>
 24. Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding // Plant Dis. 2012. V. 96(1). P. 4-17.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0458>
 25. Kumawat K.C., Razdan N., Saharan K. Rhizospheric microbiome: bio-based emerging strategies for sustainable agriculture development and future perspectives // Microbiol. Res. 2022. V. 254: 126901.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126901>
 26. Sorokan A., Burkhanova G., Gordeev A., Maksimov I. Exploring the role of salicylic acid in regulating the colonization ability of *Bacillus subtilis* 26D in potato plants and defense against *Phytophthora infestans* // Int. J. Plant Biol. 2023. V. 14. P. 242.
<https://doi.org/10.3390/ijpb14010020>
 27. Huang Ch.-Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H. Small RNAs – big players in plant-microbe interactions // Cell Host Microbe. 2019. V. 26. P. 173.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021>
 28. Zhang D., Liu M., Tang M., Dong B., Wu D., Zhang Z., Zhou B. Repression of microRNA biogenesis by silencing of *OsDCL1* activates the basal resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice // Plant Sci. 2015. V. 237. P. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.002>
 29. Cao J.Y., Xu Y.P., Li W., Li S.S., Rahma, H., Cai X.Z. Genome-wide identification of *Dicer-like*, *Argonaute*, and *RNA-dependent RNA polymerase* gene families in *Brassica* species and functional analyses of their *Arabidopsis* homologs in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1614.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01614>
 30. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute4 modulates resistance to *Fusarium brachygibbosum* infection by regulating jasmonic acid signaling // Plant Physiol. 2020. V. 184. P. 1128.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00171>
 31. Luan Y., Cui J., Li J., Jiang N., Liu P., Meng J. Effective enhancement of resistance to *Phytophthora infestans* by overexpression of miR172a and b in *Solanum lycopersicum* // Planta. 2018. V. 247. P. 127.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2773-x>