

УДК 640

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *B. SUBTILIS* С НОКАУТИРОВАННЫМИ ГЕНАМИ СУРФАКТИН-СИНТЕТАЗЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФИТОПАТОГЕНЕЗ**Е.Р. Сарварова, Д.К. Благова, А.В. Сорокань, И.В. Максимов***Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, г. Уфа, Россия*

Одно из важнейших условий достижения высокой урожайности сельскохозяйственных культур – это комплексная защита растений от различных вредителей и болезней. Современные химические препараты для растений негативно влияют на экологическую обстановку среды обитания. Поэтому на сегодняшний день, перспективным направлением считается разработка и использование в агропромышленности комбинированных препаратов на основе непатогенных бактерий, которые стимулируют рост, проявляют антимикробные и антифунгальные свойства, а так же служат альтернативой химическим препаратам.

В качестве основы таких перспективных средств являются эндофитные микроорганизмы, которые колонизируют внутренние растительные ткани, поддерживают рост и развитие растений, при этом не вызывая у них болезней (Sahu et al, 2017). Одним из таких штаммов является *Bacillus subtilis* 26Д, известный как основа промышленного универсального биопрепарата Фитоспорин-М («Башинком», Россия), который широко применяется в России. Ранее было установлено, что он способен продуцировать сурфактин [Максимов и др., 2020]. Сурфактин – циклический липопептид, проявляющий антибактериальную, противовирусную, антигрибную активности, вызывая лизис клетки, а также способствующий снижению продукции микотоксинов микроорганизмами [Mohammadipour et al., 2009]. Ранее так же было установлено, что геном штамма *B. subtilis* 26Д содержит ген *sfp*, кодирующий сурфактин-синтетазу [Бурханова и др., 2018]. Поэтому штамм *B. subtilis* 26Д был выбран как наиболее подходящий штамм для изучения роли сурфактина в защите растений от фитопатогенных микроорганизмов. Для синтеза сурфактина необходима 4-фосфопантенил-трансфераза, которая посттрансляционно фосфопантенилирует сериновый остаток в доменных белках первых трех субъединиц (SrfABC) сурфактинсинтетазы [Quadri et al, 1998]. Нами были получены штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д *sfp* – с неактивным геном *sfp* (4-фосфопантенил-трансфераза, X63158.1) и *B. subtilis* 26Д SN с неактивным геном *sfp* (L17438.1). Целью данного исследования являлось сравнение рекомбинантных штаммов с исходным *B. subtilis* 26Д и выявление отличительных физиолого-биохимических и фунгистатических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения культурально-биохимических особенностей штаммов были выбраны основные признаки, которые, в соответствии с определителем бактерий Берджи, важны также для выяснения систематического положения бактерий.

Для определения антагонистической активности тест-объекты (*Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Septoria nodorum*) из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН выращивали на картофельно-глюкозном агаре при 27 °С, после образования мицелия с помощью бактериологической иглы вырезали агаровые блоки размером 5*5 мм. В другой чашке Петри на поверхность КГА высевали культуру исследуемого штамма в виде двух перпендикулярных друг другу штрихов и в центр образовавшихся долей чашки переносили агаровые блоки с тест-объектами [Whipps, 1987]. Чашки помещали в термостат при 27 °С на 3 дня. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемого штамма судили по величине радиуса зоны роста тест-объекта в сторону штрихов штамма (R_0) и в сторону краев чашки (R_K) и выражали в процентах проявления фунгистатической активности.

Для определения влияния бактерий на развитие симптомов фитофтороза использовали стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в пробирках со средой Муросиге-Скуга. Через 10 суток культивирования обрабатывали бактериальной суспензией трех изучаемых штаммов путем нанесения 5 мкл суспензии (10^9 клеток/мл). Через 20 суток после обработки часть растений инфицировали спорами возбудителя фитофтороза (10^5 спор/мл) по 20 мкл на растение. Визуальные симптомы болезни наблюдали в течение 10 суток, листья фотографировали, фотографии анализировали в программе ImageJ, о пораженности судили по проценту поврежденной площади от общей площади листа.

Все эксперименты проводили не менее чем 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 $p < 0.95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении биохимических свойств изучаемых штаммов мы не выявили существенных отличий между штаммами (табл. 1). Морфология клеток и колоний, спорообразование, окраска по Граму; рост при различных температурах, на разных средах, в анаэробных условиях и активность ферментов (амилаза, протеиназа, желатиназа, липаза, каталаза), утилизация углеводов (глюкоза, сахароза, маннит, лактоза); выделение индола, H_2S и NH_3 одинаковы у всех штаммов. Отличие было выявлено в продукции рибонуклеазы – *B. subtilis* 26Д – 4,5, *B. subtilis* 26Дsfp – 4 мм и *B. subtilis* 26ДСN – 2 мм.

Таблица 1. Культуральные и биохимические свойства штаммов

Свойства	Штамм		
	<i>B.s.</i> 26Д	<i>B.s.</i> 26Дsfp-	<i>B.s.</i> 26ДСN
Морфология клеток	палочки	палочки	палочки
Окраска по Граму	+	+	+
Спорообразование	+	+	+
Рост при температуре			
4 °C	-	-	-
50 °C	+	+	-
60 °C	-	-	-
Рост на средах:			
КГА	+	+	+
LB	+	+	+
Bacillus agar, цвет	зеленый	зеленый	голубой
2,5 % NaCl	+	+	+
6,5 % NaCl	+	+	+
Рост в анаэробных условиях	-	-	-
Активность ферментов:			
Амилаза	+	+	+
Протеаза	-		
Желатиназа	+	+	+
Липаза	+	+	+
Каталаза	+	+	+
Рибонуклеаза, мм	4,5	4	2
Утилизация углеводов:			
глюкоза	+	+	+
сахароза	+	+	+
маннит	+	+	+
лактоза	-	+	-
Утилизация мочевины	-	-	+
Реакция Фогес-Проскауэра	+	+	+
Выделение NH_3	-	-	-
Выделение индола	-	-	-
Выделение H_2S	-	-	-

Изучение антагонистической активности штаммов (рис. 1) показало отличия в подавлении роста грибов: исходный штамм *B. Subtilis* 26Д проявлял активность в большей степени, чем рекомбинантные штаммы по отношению ко всем тестовым грибам. Наибольшее отличие в подавлении наблюдается на грибы *S. Nodorum* – 73.0, 50.0, 42.0 %, соответственно, и на *P. Infestans* – 89.4, 54.0 и 58.2 % соответственно.

Из рис. 2. Видно, что наиболее эффективным штаммом, снижающим развитие симптомов фитофтороза на листьях растений картофеля, является *B. Subtilis* 26Д. У штаммов *B. Subtilis* 26ДСN и *B. Subtilis* 26Дsfp-, не продуцирующих сурфактин, выявлено усиление восприимчивости растений к возбудителю фитофтороза по отношению к исходному штамму.

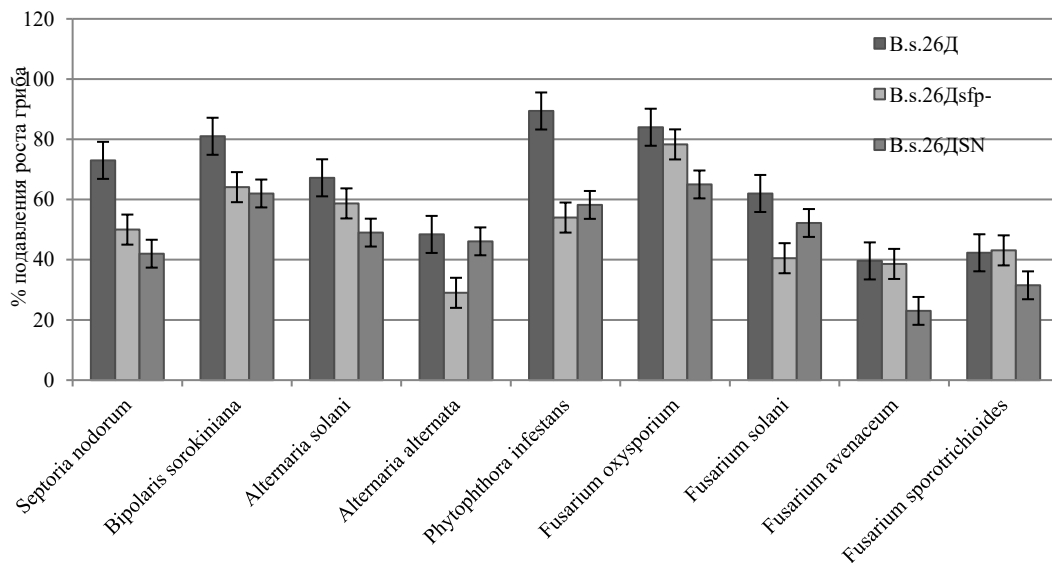


Рис. 1. Антагонистическая активность штаммов по отношению к фитопатогенным грибам

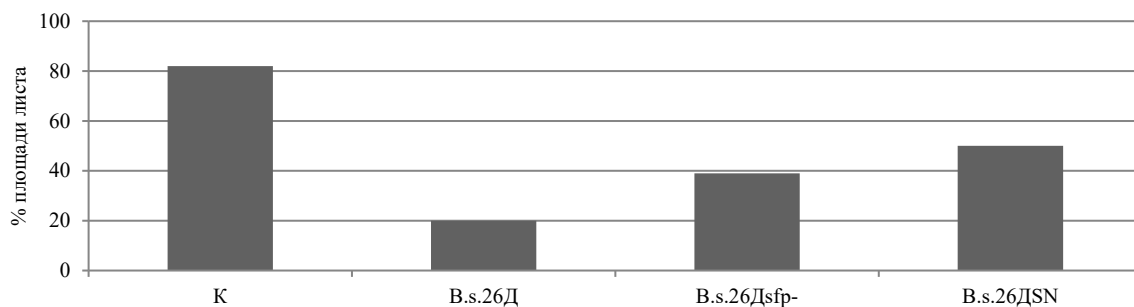


Рис. 2 Влияние бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 26Дsfp- и *B. subtilis* 26ДСN на развитие симптомов фитофтороза на листьях растений картофеля на 10 сутки после инфицирования *P. infestans*

Таким образом, полученные рекомбинантные штаммы не отличаются от исходного штамма по основным культурально-биохимическим показателям и полученные результаты позволяют нам сделать вывод, что продукция сурфактина бактериальным штаммом *B. Subtilis* 26Д повышает устойчивость растений к фитопатогенным грибам.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-офи_м № 17–29–08014.

ЛИТЕРАТУРА

- Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Благова Д.К., Максимов И.В. // Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего. Материалы межд. Научн. Конф. PLAMIC 2018, Уфа. 2018. С. 15
- 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. Yu., 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. V. 144. Art. 104242. DOI 10.1016/j.biocontrol.2020.104242.
- Mohammadipour M. et al. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides* // Canadian Journal of Microbiology. 2009. T. 55. №. 4. – С. 395–404.
- Quadri L.E.N. et al. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases // Biochemistry. 1998. T. 37. №. 6. P. 1585–1595.
- Sahu P.K. et al. Bacterial Endophytes: Potential Candidates for Plant Growth Promotion // Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives. Springer, Singapore, 2017. P.611–632.
- Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. // New phytologist 1987. V. 107. P. 127–142