ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ПРАЙМИНГ-СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ АНТИБИОТИКОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ СТРЕПТОМИЦЕТАМИ

Егорова А.М., Тарчевский И.А.

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия,
E-mail: egorova@kibb.knc.ru

Мы обнаружили, что антибиотик циклогексимид, продуцируемый почвенным стрептомицетом *Streptomyces griseus*, способен выступать в роли прайминг - сигнала, вызывая в корнях гороха существенное повышение содержания ключевых ферментов синтеза терпеноидного и фенольного метаболизма, что сопровождалось повышением суммарного содержания фенольных соединений. Накопление олигомерных антипатогенных фенольных соединений происходило в клетках коровой области корней, а полимерного лигнина – в клетках ксилемы. Сделан вывод, что циклогексимид и синтезируемые в корнях под его влиянием фенольные соединения и терпеноиды могут синергично действовать на население ризосферы.

Ключевые слова: прайминг, защитный ответ, стрептомицеты, циклогексимид, фенолы, терпеноиды

PRIMING-SIGNAL FUNCTION OF ANTIBIOTICS PRODUCED BY STREPTOMYCETES

Egorova A.M., Tarchevsky I.A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan,
E-mail: egorova@kibb.knc.ru

We have found that the antibiotic cycloheximide produced by the soil streptomycete *Streptomyces griseus* can act as a priming signal, causing a significant increase in the content of key enzymes in the synthesis of terpenoid and phenolic metabolism in pea roots, which was accompanied by an increase in the total content of phenolic compounds. The accumulation of oligomeric antipathogenic phenolic compounds occurred in the core region cells of roots, and polymer lignin in the xylem. It was concluded that cycloheximide and phenolic and terpenoid compounds synthesized in the roots under its influence can synergistically affect the rhizosphere population.

Keywords: priming, protective response, streptomycetes, cycloheximide, phenols, terpenoids

Поступила в редакцию: 7.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-504-509

ВВЕДЕНИЕ

Ряд исследователей обнаружил, что непатогенные микроорганизмы могут вызывать у растений процесс т.н. прайминга, обеспечивающего быструю и сильную защитную реакцию при последующей атаке патогенов [Van Loon, 2007; Pieterse et al., 2014; Conrath et al., 2015; Bernsdorff et al., 2016; Mauch-Mani et al., 2017; Tugizimana et al., 2018].

Появление прайминга было найдено у корней растений и под влиянием эндофитных стрептомицетов [Schrey, Tarkka, 2008; Tarkka et al., 2008; Procopio, 2012; Chater, 2016; Patel, 2018; Vurukonda, 2018], но остается неясным, какие сигнальные соединения вызывают этот эффект. Не исключается, что ими могут быть антибиотики, продуцируемые стрептомицетами [Cheema, Haard, 1979; Procopio, 2012; Minden et al., 2017], а также накапливающиеся в растениях при действии на них стрептомицетов салициловая кислота [Schrey, Tarkka, 2008**;** Patel, 2018; Vurukonda, 2018]., жасмоновая кислота [Tarkka, 2008; Oluwafemi et al., 2013] и NO [Delledone et al., 1998; Corpas, Barroso, 2017]. Прайминг-сигналом может быть и экзогенный NO, образуемый стрептомицетами [Arasimowicz-Jelonek, Floriszak-Wieczorek, 2016].

Необходимо отметить, что проблема взаимоотношения корней растений и почвенных микроорганизмов, в том числе стрептомицетов, остается еще слабо изученной, несмотря на ее чрезвычайную важность для теории и практики [Lareen et al. 2016].

К числу достаточно хорошо изученных почвенных стрептомицетов относится *Streptomyces griseus*, способный образовывать целый ряд антибиотиков, в том числе широко используемый циклогексимид (ЦГ), ингибитор синтеза белков 80S рибосомами. Проведенный нами протеомный анализ показал, что обработка корней циклогексимидом привела к снижению содержания почти 30 белков, причем большинство из них относится к числу участвующих в нуклеиновом и белковом метаболизме. ЦГ-индуцируемое снижение содержания белков должно быть вызвано относительно высокой скоростью их оборота, при которой ингибирование синтеза приводит к снижению содержания из-за продолжающегося функционирования протеаз.

Обработка корней гороха циклогексимидом повышала содержание около 25 белков, относящихся, главным образом, к ферментам, катализирующим образование защитных (в том числе антипатогенных) соединений. В несколько раз увеличивалось содержание изопентенил-пирофосфат изомеразы – ключевого фермента биосинтеза терпеноидов, в том числе относящихся к антипатогенным соединениям – фитоалексинам [Singh, Sharma, 2015]. Циклогексимид вызывал индукцию уникально большого числа ферментов фенилпропаноидного пути, катализирующих образование фенольных соединений [Тарчевский, Егорова, 2015; Тарчевский и др., 2017]. К ним относятся ферменты как «подготовительного» этапа этого пути: фосфоглюконат-дегидрогеназа, глутаминсинтаза, S-аденозилметионинсинтазы, три изоформы S-аденозил-метионин-синтазоподобного белка, две изоформы S-аденозилметионин-зависимых метилтрансфераз, так и ферменты «завершающего» этапа: халконредуктаза, две изорформы изофлавон-редуктазы, софорол-редуктаза, белок Hsr203J, а также кофеоил-КоА-метилтрансфераза, принимающая участие в синтезе лигнина. Циклогексимид-индуцируемое повышение содержания кофеоил-КоА-метилтрансферазы и накопление лигнина в клетках ксилемы – это проявление так называемого сосудистого иммунитета, при котором подавляется развитие бактерий и грибов, инфицирующих ксилему и вызывающих вилт [Denance et al., 2013].

Известно, что растворимые фенольные соединения корней обладают антибактериальными свойствми. Они подразделяются на 6 подгрупп: флавоны, флавонолы, флавононы, флаван-3-олы, изофлавоны и антоцианидины. Халконизомераза – ключевой фермент синтеза флавонолов. Сверхэкспрессия ее и халконсинтазы приводили к накоплению фенольных рутина и нарингенина.

Уникальность реакции корней гороха на действие циклогексимида проявляется в том, что причисляемые к прайминг-сигналам ключевые факторы иммунитета – салициловая кислота, метилжасмонат и NO не вызывали в наших опытах настолько сильного и специфического защитного ответа корней [Егорова и др., 2019]. Салициловая кислота индуцировала изофлавон-редуктазо-подобный белок и изофлавон-редуктазу, NO - халкон-изомеразу и халкон-О-метилтрансферазу, метилжасмонат не индуцировал ферментов фенольного метаболизма. Кроме того, СК повышала содержание трех изоформ кислых хитиназ и бета-1,3-глюканазу; метилжасмонат индуцировал хитиназу, эндоглюканазу, ингибитор протеаз и дефенсин; NO - кислую хитиназу. Причисляемая к прайминг-сигналам азелаиновая кислота [Aranega-Bou et al., 2014] индуцировала халконизомеразу, изофлавонредуктазу и софоролредуктазу. Тетрациклин повышал содержание изофлавон-

редуктазы [Weston et al., 2016]. Ни один из упомянутых факторов не индуцировал ферментов терпеноидного метаболизма.

Обнаружение нами вызванного циклогексимидом более чем трехкратного повышения содержания изопентенилпирофосфат изомеразы предполагает возможность ЦГ-индукции защитного терпеноидного метаболизма. Изопентенилпирофосфат изомераза является ключевым ферментом, обеспечивающим вместе с терпенсинтазами образование моно(С10)-сескви(С15)-, ди(С20)-, сес-(С25)-, три(С30)- и тетра(С40) терпеноидов – биологически активных, в том числе летучих соединений, многообразие которых обеспечивается реакциями гидроксилирования, ацилирования, гликозилирования, дегидрогенизации и др. [Dudareva et al., 2013; Singh, Sharma, 2015; Yazaki et al., 2017]. Сесквитерпеноиды и дитерпеноиды проявляют свойства фитоалексинов. Мы не определяли влияния циклогексимида на содержание терпеноидов, но есть основания считать, что их синтез усиливается. Например, ранее было обнаружено циклогексимид-индуцируемое образование терпеноида ришитина у картофеля [Cheema, Haard, 1979]. Установленная важная роль терпеноидов в защите растений от патогенных микроорганизмов, насекомых и нематод вызвала появление работ, направленных на практическое использование терпеноидов в роли агентов биоконтроля для защиты сельскохозяйственных растений от болезней [Dudareva, Pichersky, 2008; Stenberg et al., 2015].

Конфокальная микроскопия показала, что накопление олигофенольных соединений в наших опытах происходит в клетках коры корней, а отложение полифенольного лигнина – в клеточных стенках ксилемы проводящих пучков корней гороха [Тарчевский и др., 2017]. Можно сделать вывод о различной восприимчивости к ЦГ клеток различных тканей корней. В клетках эндодермы и ксилемы ЦГ не ингибирует синтез белков, иначе в них не повышалось бы содержание ферментов, катализирующих синтез антипатогенных фенольных соединений и терпеноидов. По всей вероятности, ЦГ блокирует функционирование 80 S рибосом и синтез ими белков в клетках паренхимы корней. Можно считать, что циклогексимид в клетках одних тканей растений - это классический ингибитор синтеза белков, а в других тканях - индуктор синтеза белков.

Тканевая специфичность фенилпропаноидного метаболизма подтверждается и преимущественной локализацией халконсинтазы и халконизомеразы в эпидермальных и кортексных клетках. Этому соответствовало и преимущественное накопление в этих клетках фенольных соединений [Saslowsky, Winkel-Shirley, 2001; Huang at al., 2014].

Было показано, что фенольные соединения накапливаются в корнях под влиянием атакующих их патогенов, причем могут транспортироваться в окружающую ризосферу как пассивно, так и в результате активной эксудации и оказывать на структуру ризосферного сообщества большее влияние, чем другие соединения корневого экссудата [Huang et al., 2014]. Особенно это относится к антипатогенным монофенольным, дифенольным и трифенольным фитоалексинам флавоноидного и изофлавоноидного рядов.

Так же, как и в случае синтеза фенолов, для терпеноидого метаболизма корней характерна тканевая специфичность. Гены, кодирующие ферменты синтеза терпеноидов, были найдены в эпидермисе и кортексе главного и боковых корней арабидопсиса, но не в паренхиме [Chen et al., 2004]. Была также обнаружена локализация самих терпеноидов в периферических клетках корней арабидопсиса [Vaugham et al., 2013]. Гены терпеноида авенацина также экспрессировались исключительно в эпидермисе у корней овса, а накопление в нем авенацина защищало корни от патогенных микроорганизмов [Haralampidis et al., 2001].

В связи с тем, что ЦГ вызывает индукцию ферментов терпеноидного метаболизма и беспрецедентную активацию образования «фенольных» ферментов и самих фенолов [Тарчевский, Егорова, 2015; Тарчевский и др., 2017], привлекает внимание существование большого числа пренилированных форм фенольных соединений [Yazaki et al., 2017]. По всей вероятности, они могут совмещать и усиливать антимикробные свойства входящих в их состав остатков как фенолов, так и терпеноидов. Было обнаружено, что пренилированные производные фенольного шиконина накапливаются в эпидермальном слое клеток и освобождаются в ризосферу, защищая корни (в качестве химического барьера) от патогенов и растительноядных организмов [Brigham, 1999].

Полученные нами результаты приобретают особую важность в связи с обнаружением синергического подавления микрофлоры при совместном действии антибиотиков и фенолов **[**Amin et al., 2015; Septama, Panichayupakaranant, 2016; Miklasinska-Majdanic et al., 2018**].** Подобный эффект синергизма наблюдался и при совместном влиянии на бактерии антибиотика рифампицина со всеми исследовавшимися терпенами [Sieniawska et al., 2017]. Можно сделать вывод, что освобождаемый в ризосфере стрептомицетом *Streptomyces griseus* антибиотик циклогексимид и синтезируемые в корнях под его влиянием фенольные и терпеноидные соединения могут синергично подавлять в ризосфере конкурентные организмы и изменять структуру ризосферного сообщества.

Проведенные нами исследования и данные литературы показывают, что прайминг эффект циклогексимида объясняется главным образом активацией синтеза фенольных и терпеноидных антипатогенных соединений. Информация о синергизме антипатогенного действия антибиотиков (в том числе циклогексимида), фенольных соединений и терпеноидов может быть использована при создании эффективных препаратов, предотвращающих болезни растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егорова А.М., Тарчевский И.А., Петрова Н.В., Агеева М.В. Использование природного антибиотика циклогексимида для создания препаратов, защищающих сельскохозяйственные растения от болезней // Нива Татарстана. 2019. № 1-2, С. 14-17.
2. Тарчевский И.А., ЕгороваА.М. Протеомный анализ влияния циклогексимида на корни гороха // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 893-905.
3. Тарчевский И.А., Егорова А.М., Петрова Н.В., Агеева М.В., Акулов А.Н.: Циклогексимид-индуцируемый “фенольный взрыв” в корнях гороха // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 497–501.
4. Amin M.U., Khurram M., Khattak B., Khan J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant Staphylococcus aureus. BMC Complement Altern Med. 2015. V. 59. P. 1-12.
5. Aranega-Bou P., de la O Leyva M., Finiti I., Garcia-Agustin P., Gonzalez-Bosch C. Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model // Front Plant Sci. 2014. V. 5. 488.
6. Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J. Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens // Front Plant Sci. 2016. V.7. 252
7. Bernsdorff F., Do``ring A-C., Gruner K., Schuck S., Bra``utigam A., Zeier J. Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and –independent pathways // Plant Cell. 2016. V. 28. P. 102-29.

8. Brigham L.A., Michaels P.J., Flores H.E. Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of Lithospermum erythrorhizon // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 417–428.
9. Chater K.F. Recent advances in understanding Streptomyces // F1000Res. 2016. V. 5: P. 2795.
10. Cheema A.S., Haard N.F. Induction of rishitin and lubimin synthesis in potato tuber slices by non-specific elicitors – role of gene derepression // J. Food Protect. 1979. V. 42. P. 512-518.
11. Chen F., Ro D.-K., Petri J., Gershenzon J., Bohlmann J., Pichersky E., Tholl D. Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1956–1966.
12. Conrath U., Beckers G.J.M., Langenbach C.J.G., Jaskiewicz M.R. Priming for enhanced defense // Annu. Rev. Phytopathol. 2015. V. 53. P.97-119.
13. Corpas F.J., Barroso J.B. Nitric oxide synthase-like activity in higher plants // Nitric Oxide. 2017. V. 68. P. 5-6.
14. Delledone M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance // Nature. 1998. V. 394. P. 585-588.
15. Denancé N., Ranocha P., Oria N., Barlet X., Riviere M., Yadeta K. Arabidopsis wat1 (walls are thin1)-mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, Ralstonia solanacearum, is accompanied by cross-regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism // Plant J. 2013. V. 73. P. 225–239.
16. Dudareva N., Pichersky E. Metabolic engineering of plant volatiles // Curr. Opin. Biotechnol. 2008. V. 9. P. 181–189.
17. Dudareva N., Klempien A., Muhlemann K., Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds // New Phytologist. 2013. V. 198. P. 16–32.
18. Haralampidis K., Bryan G., Qi X., Papadopoulou K., Bakht S., Melton R., Osbourn A. A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 13431–13436.
19. Huang X-F., Chapporro J.M., Reardon K.F., Zhang R., Shen Q., Vivanco J.M. Rhizosphere interaction: root exudates, microbes and microbial communities // Botany. 2014. V. 92. P. 267-275.
20. Lareen A., Burton F., Schäfer P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes // Plant Mol. Biol. 2016. V. 90. P. 575–587.
21. Mauch-Mani B., Baccelli I., Luna E., Flors V. Defense priming: an adaptive part of induced resistance // Annual Review of Plant Biology. 2017. V. 68. P. 485-512.
22. Miklasinska-Majdanic M., Kepa M., Wojtyczka R.D., Idzik D., Wasik T.J. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of Staphylococcus Aureus clinical strains. Int. J. Environ Res. Public Health. 2018. V. 15. pii: E2321.
23. Minden V., Deloy A., Volkert A.M., Leonhardt S.D., Pufal G. Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations // AoB Plants. 2017. V. 9.
24. Oluwafemi S., Dewhirst S.Y., Veyrat N., Powers S., Toby J. A., Bruce T.J.A., Caulfield J.C., Pickett J.A., Birkett M.A. Priming of production in maize of volatile organic defense compounds by the natural plant activator cis-jasmone // PloS One. 2013. V. 8. 6. e62299
25. Patel J.K., Madaan S., Archana G. Antibiotic producing endophytic Streptomyces spp. colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops // Microbiol Res. 2018. V. 215. P. 36-45.

26. Pieterse C.M.J., Zamiodis C., Berendsen R.L., Weller D.M., van Wees S.C.M., Bakker P.A.H.M. Induced systemic resistance by beneficial microbes // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. P. 347-375.
27. Procopio R.E.de Lima, da Silva I.R., Martins M.K., de AzevedoJ.L., de Araujo J.M. Antibiotics produced by Streptomyces // Brazil. J. Infect. Diseases. 2012. V. 16. P. 466-471.
28. Saslowsky D., Winkel-Shirley B. Localization of flavonoid enzymes in Arabidopsis roots // Plant J. 2001. V. 27. P. 37-48.
29. Schrey S.D., Tarkka M.T. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis // AntonieVanLeeuwenhoek. 2008. V. 94. P. 11-19.
30. Septama A.W., Panichayupakaranant P. Synergistic effect of artocarpin on antibacterial activity of some antibiotics against methicillin-resistant Staphyllococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Escherichia coli // Pharm. Biol. 2016. V. 54. P. 686-691.
31. Sieniawska E, Swatko-Ossor M, Sawicki R, Skalicka-Woźniak K, Ginalska G. Natural terpenes influence the activity of antibiotics against isolated Mycobacterium tuberculosis // Med Princ Pract. 2017. V. 26. P. 108–112.
32. Singh B., Sharma R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications // Biotech. 2015. V. 5. P. 129-151.
33. Stenberg J.A., Heil M., Åhman I., Björkman C. Optimizing crops for biocontrol of pests and disease // Trends Plant Sci. 2015. V. 11. P. 698-712.
34. Tarkka M.T., Lehr N.A., Hampp R., Schrey S.D. Plant behavior upon contact with Streptomycetes // Plant Signal. Behav. 2008. V. 3. P. 917–919.
35. Tugizimana F., Mhlongo M.I., Piater L.A., Dubery I.A. Metabolomics in plant priming research: the way forward? // Int. J. Mol.Sci. 2018. V. 19. P. 1759.
36. Van Loon L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 119. P. 243-254.
37. Vaughan M.M., Wang Q., Webster F.X., Klemle D., Hong Y.J., Tantillo D.J., Coates R.M., Wray AT., Askew W., O'Donnell C., Tokuhisa J.G., Tholl D. Formation of the unusual semivolatile diterpene rhizathalene by the Arabidopsis class I terpene synthase TPS08 in the root stele involved in defense against belowground herbivory // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 1108-1125.
38. Vurukonda S.S.K.P., Giovanardi D., Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol activity of Streptomyces spp. as endophytes // Int. J. Molec. Sci. 2018. V. 19. P. 952
39. Weston L.A., Ryan P.R., Margas M., Piotrowicz-Cieslak A.I., Ziolkowska A, Adomas B. tetracycline accumulation in pea seedlings and its effects on proteome and enzyme activities // Int. J. Agricult. Biol. 2016. V. 18. P. 789-796.
40. Yazaki K., Arimura G., Ohnishi T. "Hidden" terpenoids in plants: their biosynthesis, localization and ecological roles // Plant Cell Physiol. 2017. V. 58. P. 1615-1621.