

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ УФИМСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(УФИЦ РАН)

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ГЕНЕТИКИ - ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК
(ИБГ УФИЦ РАН)

На правах рукописи

АЛЕКСЕЕВ ВАЛЕНТИН ЮРЬЕВИЧ

**РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *BACILLUS*,
СИНТЕЗИРУЮЩИХ МЕТАБОЛИТЫ С ИНСЕКТИЦИДНЫМИ
СВОЙСТВАМИ, В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К
ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕ *SCHIZAPHIS GRAMINUM***

1.5.4 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Веселова С.В.

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Злаковые тли и механизмы устойчивости растений к вредителям с колюще-сосущим ротовым аппаратом	14
1.1.1. Тли и их значение в сельском хозяйстве	14
1.1.2. Типы устойчивости растений к тлям	16
1.1.2.1. Антиксеноз, антибиоз и толерантность	16
1.1.2.2. Конститутивная и индуцированная типы устойчивости	20
1.2. Бактерии – продуценты биологически активных веществ	37
1.2.1. Метаболиты бактерий и их значение в жизнедеятельности бактерий	37
1.2.2. Липопептиды бактерий рода <i>Bacillus</i>	43
1.2.3. Инсектицидные белки <i>B. thuringiensis</i>	55
1.3. Стимулирующие рост растений бактерии и их роль в защите растений от насекомых	69
1.3.1. Прямые механизмы защиты	71
1.3.2. Косвенные механизмы защиты	73
1.3.3. Рост-стимулирующий эффект бактерий <i>Bacillus</i> spp.	79
1.3.4. Новые подходы для эффективного использования бактерий <i>Bacillus</i> spp.	82
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	87
2.1. Объекты исследования	87
2.2. Условия проведения экспериментов	88
2.3. Микробиологические методы	89
2.3.1. Культивирование бактериальных штаммов	89
2.3.2. Определение эндофитности бактерий в пшенице	90
2.3.3. Метод перпендикулярных штрихов	91
2.4. Изучение типов устойчивости к тлям	92

2.4.1.	Подбор рост-стимулирующих концентраций бактерий, липопептид-бедных фракций и их композиций	92
2.4.2.	Тест на ацидность штаммов, изолятов, рекомбинантных линий или липопептид-богатых фракций	93
2.4.3.	Тест на антибиоз	93
2.4.4.	Тест на выносливость растений	94
2.5.	Биохимические методы	95
2.5.1.	Получение белковых экстрактов	95
2.5.2.	Определение активности оксидоредуктаз	95
2.5.3.	Измерение содержания перекиси водорода	96
2.5.4.	Получение липопептид-богатой фракции из среды культивирования бактериальных штаммов	97
2.5.5.	Определение липопептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)	98
2.5.6.	Измерение активности рибонуклеаз в культуральной жидкости бактерий	99
2.5.7.	Измерение содержания фитогормонов в культуральной жидкости бактерий	99
2.6.	Молекулярно-биологические методы	101
2.6.1.	Выделение ДНК из бактерий	101
2.6.2.	Идентификация генов липопептид-синтаз методом ПЦР	101
2.6.3.	Идентификация генов Cru-белков методом ПЦР	103
2.6.4.	Выделение и очистка РНК из растений	103
2.6.5.	Количественная ПЦР в реальном времени	104
2.7.	Статистическая обработка результатов	106
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	107
3.1.	Эндофитность бактерий, их метаболиты и составление бактериальных смесей для повышения устойчивости пшеницы к злаковой тле	107
3.1.1.	Оценка способности некоторых перспективных бактерий	107

	<i>Bacillus</i> spp. из коллекции ИБГ УФИЦ РАН колонизировать внутренние ткани растений пшеницы (эндофитность) и синтезировать различные метаболиты	
3.1.2.	Подбор концентраций эндофитных штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> и их липопептид-богатых фракций стимулирующих рост пшеницы	118
3.1.3.	Составление комбинаций бактерий, определение их эндофитности и рост-стимулирующих концентраций	122
3.2.	Прямой афицидный эффект бактерий <i>Bacillus</i> spp., липопептид-богатых фракций и их композиций против обыкновенной злаковой тли <i>S. graminum</i>	129
3.2.1.	Оценка афицидной активности эндофитных штаммов, изолятов <i>Bacillus</i> spp. и их липопептид-богатых фракций	129
3.2.2.	Оценка афицидной активности рекомбинантных линий <i>B.</i> <i>subtilis</i> 26Дsfp ^r , <i>B. subtilis</i> 26ДCryChS и их липопептид- богатых фракций против <i>S. graminum</i>	134
3.2.3.	Оценка афицидной активности композиций эндофитных штаммов, изолятов <i>Bacillus</i> spp. и их липопептид-богатых фракций	140
3.3.	Роль эндофитных бактерий <i>Bacillus</i> spp., ЛБФ и их смесей на два типа устойчивости растений к <i>S. graminum</i> – антибиоз и выносливость	145
3.3.1.	Влияние бактерий <i>Bacillus</i> spp., липопептид-богатых фракций и их смесей на выносливость растений пшеницы к <i>S. graminum</i>	145
3.3.2.	Опосредованное растениями пшеницы влияние бактерий <i>Bacillus</i> spp., липопептид-богатых фракций и их смесей на показатели жизнеспособности обыкновенной злаковой тли <i>S. graminum</i>	151
3.4.	Индукция защитных реакций растений пшеницы к	157

	обыкновенной злаковой тле <i>S. graminum</i> бактериями <i>Bacillus spp.</i> их композициями и липопептид-богатыми фракциями	
3.4.1.	Опосредованное влияние бактерий <i>Bacillus spp.</i> , липопептид-богатых фракций и их смесей на окислительно-восстановительный статус растений пшеницы заселенных <i>S. graminum</i>	157
3.4.2.	Опосредованное влияние бактерий <i>Bacillus spp.</i> , липопептид-богатых фракций и их смесей на гормональные сигнальные пути растений пшеницы, заселенных <i>S. graminum</i>	170
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	186
	ВЫВОДЫ	191
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	193
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	195

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. В настоящее время в научной литературе растения рассматривают как сложный холобионт – совокупность хозяина и других организмов, живущих в фитосфере и взаимодействующих между собой и растением сложным образом (Oukala et al., 2021). Микроорганизмы, входящие в филлосферу, эндосферу и ризосферу растений составляют микробиом растения и являются частью сложного холобионта (Santoyo, 2022). Многочисленные полезные микроорганизмы микробиома привлекают огромное внимание ученых из-за их роли в жизни растений. Полезный микробиом или стимулирующие рост растений микроорганизмы (СРРМ) не только усиливают рост растений за счет улучшения доступности питательных веществ, но обеспечивают устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам (Santoyo, 2022). Особое место среди полезного микробиома растений занимают эндофитные микроорганизмы, к которым относятся бактерии и грибы, способные колонизировать растения и жить в их внутренних частях, не нанося при этом видимого ущерба хозяину (Oukala et al., 2021; Santoyo, 2022).

У многих сельскохозяйственных культур описано разнообразие бактериальных эндофитов, в котором наиболее представлены бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Enterobacter* и др. (Rana et al., 2020; Oukala et al., 2021). В настоящее время применение эндофитных микроорганизмов считается одним из наиболее безопасных и перспективных подходов для защиты растений от патогенов и вредителей и контроля до- и послеуборочных потерь сельскохозяйственной продукции (Kashyap et al., 2023). Эндофиты могут служить продуцентами метаболитов, которые могут помочь в методах биоконтроля или в более эффективном ведении сельского хозяйства (Oukala et al., 2021). В течение последних двух десятилетий различные виды микроорганизмов, в том числе бактерии и грибы, были охарактеризованы и использованы в качестве биологических препаратов или агентов биоконтроля

(Kashyap et al., 2023). В том числе во всем мире значительно увеличилось распространение коммерческих препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* (Kaur et al., 2023).

К сожалению, в настоящее время против насекомых-вредителей, питающихся флоэмным соком (тли, белокрылки и цикадки) имеется ограниченное количество биологических препаратов, и борьба с этими вредителями сводится к применению химических системных инсектицидов, загрязняющих окружающую среду (Максимов и др., 2020; Miljakovic et al., 2020). Актуальной задачей является поиск новых перспективных штаммов эндофитных бактерий и изучение механизмов их действия при развитии иммунитета против вредителей. Данная работа посвящена изучению роли бактерий рода *Bacillus* в развитии защитных реакций в растениях пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.).

Обыкновенная злаковая тля *S. graminum* наносит значительный ущерб посевам пшеницы, так как воздействие тлей на растение обусловлено снижением скорости фотосинтеза, и как следствие скорости роста, при изъятии флоэмного сока во время кормления тлей (Morkunas et al., 2011; Koch et al., 2016). Применение биопрепаратов на основе эндофитных бактерий, способных долговременно защищать растения от вредителей, будет способствовать отказу от использования химических инсектицидов, и гарантировать получение экологически чистой продукции, свободной от различных канцерогенов.

Взаимодействия растений и эндофитов изучаются уже много лет, однако механизмы, используемые эндофитными бактериями для смягчения негативного воздействия различных факторов окружающей среды на растения, остаются неясными (Oukala et al., 2021; Lee et al., 2022; Khoshru et al., 2023). В настоящее время полагают, что полезные свойства бактериальных эндофитов реализуются через прямые и опосредованные защитные механизмы за счет секреции широкого спектра различных метаболитов (Miljakovic et al., 2020; Lee et al., 2022). Прямые механизмы защиты растений эндофитами реализуются в основном за счет секреции метаболитов, обладающих биоцидной активностью (преимущественно

антимикробных пептидов – циклических липопептидов, сидерофоров, гидролитических ферментов и др.). Опосредованные механизмы связаны с конкуренцией с патогенами за пространство и питательные вещества, а также со способностью эндофитов стимулировать рост и регулировать работу иммунного ответа растений за счет секреции фитогормонов, липополисахаридов, липопептидов, летучих органических соединений и др. (Miljakovic et al., 2020; Oukala et al., 2021; Lee et al., 2022).

Бактериальные метаболиты являются действующим началом любого биопрепарата. Уже более 80 лет дельта-эндотоксины (Cry и Cyt) бактерий *Bacillus thuringiensis* (Bth-токсины) используют в прямых механизмах защиты как эффективные регуляторы численности насекомых (Palma et al., 2014a). Актуальной задачей на сегодняшний день остается повышение эффективности Bth-токсинов против вредителей из отряда Hemiptera, которую можно решить с помощью поиска и использования эндофитных штаммов *B. thuringiensis*, экспрессирующих афицидные Bth-токсины (Mishra et al., 2022). Инсектицидность, в том числе афицидность, других бактериальных метаболитов – липопептидов (ЛП) была установлена относительно недавно (Guo et al., 2015; Yang et al., 2017; Rodríguez et al., 2018). Также ученых интересует элиситорная роль этих метаболитов в запуске защитных сигнальных путей у растений, которая только начинает изучаться (Maksimov et al., 2020a; Denoirjean et al., 2021; Lee et al., 2022).

Непрямые механизмы защиты связаны с активацией иммунной системы растений, которая осуществляется путем стимуляции защитных сил посредством системной индуцированной устойчивости (СИУ) (Pieterse et al., 2014). В настоящее время в литературе СИУ опосредованная бактериями определяется как – прайминг (Khoshru et al., 2023). Прайминг-защита — это стратегия, позволяющая проявить более быструю защитную реакцию при нападении вредного организма и продлить эту реакцию на весь вегетационный период и даже передать по наследству (Conrath et al., 2015; Khoshru et al., 2023). Защитные ответы, индуцированные бактериальными эндофитами, включают различные стратегии защиты и используют различные механизмы, которые могут включать

накопление защитных PR-белков (от pathogenesis-related proteins), различных ферментов, влияние на редокс-метаболизм и генерацию активных форм кислорода (АФК), а также синтез вторичных метаболитов (Oukala et al., 2021). Известно, что прайминг с помощью бактерий обеспечивает исключительную защиту растений с низкими физиологическими затратами, что привлекает большое внимание ученых (Oukala et al., 2021). В настоящее время количество исследований по этому вопросу увеличивается, и механизмы взаимодействия растений и эндофитов при развитии прайминга продолжают изучаться. Однако в этой новой области исследований остаются нерешенные вопросы, в том числе вопрос о сочетании стимулирования роста растений с защитными механизмами, которые индуцируются бактериальными эндофитами и вопрос о выборе изучения действия одного эндофита или комбинации нескольких эндофитов, что приближает ученых к естественным условиям (Oukala et al., 2021).

Цель исследования:

Оценить роль и взаимодействие метаболитов эндофитных бактерий рода *Bacillus*, обладающих инсектицидными свойствами, в индукции неспецифических защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*, связанных с изменениями в редокс-статусе и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений.

Задачи:

1. Оценить у некоторых штаммов и изолятов перспективных бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИБГ УФИЦ РАН эндофитность и способность синтезировать липопептиды, Vth-токсины и фитогормоны; выделить липопептид-богатые фракции (ЛБФ) нескольких штаммов и изолятов для дальнейшего изучения их функций в индукции устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*;

2. Оценить прямой афицидный эффект отобранных эндофитных штаммов и изолятов бактерий рода *Bacillus* и ЛБФ по отношению к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*; подобрать стимулирующие рост растений пшеницы концентрации эндофитных штаммов и изолятов бактерий рода *Bacillus* и ЛБФ;

оценить влияние бактерий рода *Bacillus* и ЛБФ на различные типы устойчивости (антибиоз, выносливость) растений мягкой яровой пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*;

3. Провести оценку роли Cry-белков в регуляции прямых и опосредованных механизмов устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum* с использованием рекомбинантной линии *B. subtilis* 26DCryChS с интегрированным геном, кодирующим инсектицидный белок Cry1Ia от бактерии *B. thuringiensis*;

4. Провести оценку роли липопептидов (сурфактина, итурина или фенгицина) в формировании устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum* с использованием ЛБФ различных штаммов и рекомбинантной линии *B. subtilis* 26DSfr⁻ дефицитной по синтезу сурфактина.

5. Выявить предполагаемое участие Cry-белков и липопептидов бактериальных штаммов рода *Bacillus* в регуляции редокс-статуса и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений пшеницы при формировании устойчивости к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*;

6. Оценить совместное действие бактериальных штаммов рода *Bacillus*, синтезирующих Cry-белки и липопептиды на развитие защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* и сформировать принципы использования композиций эндофитных бактерий, синтезирующих разные группы метаболитов.

Научная новизна. Впервые изучена роль эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИБГ УФИЦ РАН и их липопептидов в индукции неспецифических защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Впервые показано, что существенную роль в прямой афидицидный эффект эндофитных штаммов бактерий *Bacillus* spp. по отношению к обыкновенной злаковой тле вносили бактериальные ЛП – сурфактин, итурин и фенгицин. Впервые показано влияние ЛБФ штаммов бактерий *Bacillus* spp. на различные типы устойчивости (антибиоз, выносливость) растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* и на индукцию СИУ растений пшеницы к *S. graminum*, связанную с изменениями в редокс-статусе и экспрессии генов

патоген-индуцируемых белков у растений. С использованием рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДСfr^r с подавленным синтезом сурфактина доказана роль этого ЛП в афицидности бактериального штамма и в запуске СИУ у растений. Впервые показано, что выявленные аддитивные эффекты бактериальных композиций в афицидности, антибиозе, выносливости и индукции СИУ, приводили к повышенной устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. В композиции штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ доказана роль липопептидов сурфактина и итурина в развитии аддитивного эффекта смеси.

Теоретическая и практическая значимость работы. Совокупность полученных новых данных позволяет расширить современные представления о роли бактериальных метаболитов с инсектицидными свойствами (Сгу-белков и ЛП) в индукции физиологических и биохимических механизмов устойчивости растений к злаковой тле. Основные результаты работы могут быть использованы в учебно-исследовательской работе. Практическая значимость работы заключается в формировании принципов создания комплексных биопрепаратов на основе композиций бактериальных штаммов, в которых раскрывается важность спектра синтезируемых метаболитов; антагонизма штаммов по отношению друг к другу; эндофитности бактерий индивидуально и в композиции; ростстимулирования и иммуномодуляции; индукции СИУ по различным гормональным сигнальным путям. Изученные бактериальные штаммы и изоляты рода *Bacillus* могут быть рекомендованы в качестве компонентов биопрепаратов для эффективной биологической борьбы со злаковой тлей *S. graminum* Rond. на посевах пшеницы.

Методология и методы исследования. Методология исследования основывается на использовании системного подхода с применением методов биохимии и молекулярной биологии, физиологии растений, микробиологии, статистики, а также на анализе данных отечественной и зарубежной литературы. Основные методы исследования включали: биохимические методы очистки, выделения и определения различных веществ как из бактериальной культуральной среды, так и из растительного материала, включающие

высокоэффективную жидкостную хроматографию, тонкослойную хроматографию, бутанольную экстракцию и твердофазный иммуноферментный анализ, а также биохимические методы оценки ферментативной активности, методы химической оценки содержания перекиси водорода, полимеразную цепную реакцию, в том числе в режиме реального времени, электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в агарозных гелях, оценку транскрипционной активности генов защитных белков.

Положения, выносимые на защиту.

1. Прямой афицидный эффект изученных бактерий *Bacillus* spp. по отношению к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* проявлялся благодаря синтезу бактериями липопептидов и Cry-белков.

2. Установлено, что ЛБФ и Cry11a белок бактерий *Bacillus* spp. играли важную роль в индукции СИУ растений пшеницы к *S. graminum*, связанной с изменениями в редокс-статусе и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений.

3. Доказана критическая роль ЛП сурфактина в формировании устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum* опосредованной бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д.

4. Установлено, что аддитивный эффект бактериальных композиций будет проявляться при соблюдении некоторых принципов при их составлении, а именно, проверке сочетания разных метаболитов, антагонизма штаммов по отношению друг к другу, степени эндофитности штаммов индивидуально и в композиции, подбора концентраций бактериальных штаммов и индукции бактериальными штаммами СИУ в растениях по различным гормональным сигнальным путям.

5. В композиции штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ доказана роль липопептидов сурфактина и итурина в развитии аддитивного эффекта смеси.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведённых экспериментов, а также наличием положительных и отрицательных контролей,

использованием современного научного оборудования, валидированных методов и анализом результатов с применением статистических методов.

Личный вклад соискателя. Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций и диссертационной работы.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на российских и международных научных конференциях в виде устных и стендовых докладов на VI и VII Всероссийской конференции с международным участием «Экобиотех» 2019, 2021 (Уфа, 2019, 2021); The 6th and 7th International Scientific Conference «PlantGen2021» (Новосибирск, 2021), «PlantGen2023» (Казань, 2023); VII Всероссийской научно-практической конференции «Биологические и технологические основы селекции, семеноводства, размножения и защиты сельскохозяйственных и лесных древесных растений» (Ялта, 2021); V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2022).

Конкурсная поддержка. Исследования поддержаны грантами РФФИ-офи_м 17-29-08014 «Липопептиды эндофитных бактерий *Bacillus* spp. - модуляторы защитных систем растений от вредных организмов», РФФИ Аспиранты 20-316-90021 «Роль эндофитных микроорганизмов рода *Bacillus*, синтезирующих метаболиты с инсектицидными свойствами, в устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*», МК-2543.2022.1.4 «Изучение роли генов-мишеней гормональных сигнальных сетей в развитии системной устойчивости растений пшеницы к злаковым тлям под влиянием эндофитных бактерий *Bacillus* spp.».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах, в том числе 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Злаковые тли и механизмы устойчивости растений к вредителям с колюще-сосущим ротовым аппаратом

1.1.1 Тли и их значение в сельском хозяйстве

Злаковые тли – группа вредителей зерновых культур, которая относится к отряду полужесткокрылых (Hemiptera) и состоит из нескольких разновидностей тлей (обыкновенная злаковая, большая злаковая, черемухово-злаковая, ячменная тля и др.), имеющих сходные морфологические, биологические особенности и хозяйственное значение. Вредоносность злаковых тлей на зерновых культурах проявляется в задержке роста при питании насекомых флоэмным соком, снижении скорости фотосинтеза, что влияет на урожай зерновых культур, и инфицировании растений вирусами, которые переносят тли.

Злаковые тли в зависимости от особенностей развития делятся на 2 группы – немигрирующие и мигрирующие. По месторасположению питания насекомых на растениях разделяют обычно вредителей, сидящих на побеге и сидящих на корне. Яйца немигрирующих насекомых зимуют на дикорастущих злаках, а также на озимых зерновых.

Среди немигрирующих насекомых выделяют:

- **обыкновенную злаковую тлю – *Schizaphis graminum* Rond.** Этот вид обитает повсеместно – в Африке, Америке и на Евразийском континенте в лесостепной и степной зонах Европы, на юге Сибири, в Закавказье и южном Приморье, а также в Индии и Китае (Shavit et al., 2018; Zhang Yong et al., 2019; Vieira et al., 2019). Зимовка тли обычно проходит в состоянии яиц. Отрождение личинок чаще происходит в первой половине мая. Во второй половине мая тля расселяется благодаря крылатым самкам. При установлении благоприятного климата в колониях большую часть составляют бескрылые самки. В середине лета наблюдается наибольшее количество насекомых. Обыкновенная злаковая тля наносит наибольший ущерб озимой и яровой пшенице, озимому и яровому

ячменю, ржи, овсу, кукурузе, сорго, просу и рису, что приводит к серьезным экономическим потерям в сельском хозяйстве. (Crespo-Herrera et al., 2012; Crespo-Herrera et al., 2019).

- **большую злаковую тлю – *Sitobion avenae* F.** Обитает повсеместно. Яйца зимуют обычно на злаковых сорняках и озимой пшенице. Отрождение самок из яиц в средней полосе России начинается обычно в апреле. Наибольшее количество насекомых чаще наблюдается во время формирования зерновки на стадиях молочной и молочно-восковой спелости. Насекомые предпочитают питаться в верхней части растения и у основания колоса. Преимущественно кормовыми растениями для этого вида тли являются различные злаки, самая предпочтительная культура – ячмень (Радченко, 2008).

Мигрирующие виды тлей на злаках живут исключительно летом. Зимовка происходит в фазе яйца. В начале весны личинки дают начало большим количествам колоний на листьях первичных хозяев, которыми являются чаще всего кустарниковые или древесные растения. Когда условия питания ухудшаются, насекомые меняют образ жизни. Расселительницы начинают мигрировать на злаковые растения, где тля размножается партеногенетически в течение всего лета. К концу сезона насекомые переселяются на первичные растения-хозяева (Радченко, 2008). Среди мигрирующих видов наибольшее значение имеет обыкновенная черемуховая тля – *Rhopalosiphum padi* L. (Radchenko et al., 2022).

Обыкновенная черемуховая тля *R. padi* распространена повсеместно, на севере Евразии обнаружена на Кольском полуострове, встречается в Средней Азии, Приморье, Сибири, Казахстане и Закавказье (Gong et al., 2020; Singh et al., 2020). Первичными растениями-хозяевами являются различные виды слив, а также черемуха (Radchenko et al., 2022). Насекомые зимуют в фазе яиц в пазухах почек на молодых побегах черемухи или на злаках. Первые основательницы отрождаются вместе с распусканием почек. На первичном хозяине развивается не менее трех генераций. Максимальное количество насекомых на черемухе соответствует фазе цветения самой черемухи (Радченко, 2008). Массовая

миграция тли с черемухи на злаки совпадает с остановкой роста главных побегов и обусловлена изменениями метаболизма тканей хозяина (Радченко, 2008). Во второй половине августа отрождаются первые ремигранты. На злаках насекомое питается на всех частях побега растения-хозяина (Радченко, 2008). У обыкновенной черемуховой тли широкий круг растений-хозяев, насекомые питаются на злаках и других однодольных представителей семейств Ситниковых, Осоковых и Лилейных (Радченко, 2008; Crespo-Herrera, 2012).

1.1.2 Типы устойчивости растений к тлям

1.1.2.1 Антиксеноз, антибиоз и толерантность

Устойчивость растения-хозяина к насекомым классифицируется по категориям, которые описывают, как растения реагируют на воздействие насекомых. Painter (1941) классифицировал устойчивость к насекомым по следующим трем категориям: отсутствие предпочтения, антибиоз и толерантность. Однако, через 37 лет после классификации Пейнтера (Painter) Kogan и Ortman (1978) предложили термин «антиксеноз» для замены ориентированного на насекомых понятия «не-предпочтение», чтобы все три термина относились к характеристикам устойчивого растения (Crespo-Herrera et al., 2019).

Антиксеноз. Термин антиксеноз происходит от греческого слова хено, что означает гость. Антиксеноз можно рассматривать как первую линию защиты растений от повреждения насекомыми. Этот вид устойчивости негативно влияет на нормальный процесс поиска и принятия хозяина насекомым, при котором задействованы сенсорные системы насекомых-вредителей, т. е. обоняние, зрение, вкус и осязание (Smith, Chuang, 2014).

Пауэлл и соавторы (2006) определили последовательность поведения для процесса выбора хозяина у тлей, состоящую из 6 стадий: а) поведение перед посадкой; б) первоначальный контакт с растением и оценка поверхностных сигналов перед введением стилета; в) прощупывание эпидермиса; г) внедрение стилета в ткани растения-хозяина; д) прокол ситовидных элементов и

слюноотделение и е) принятие флюэмы и продолжительное проглатывание (Powell et al., 2006).

У тлей выбор хозяина в основном основан на химических сигналах. Хеморецепция включает обоняние и вкус, участвующие в наиболее важных поведенческих реакциях для различения хозяина насекомыми. Все растения выделяют летучие вещества, и они могут действовать как репелленты или аттрактанты для насекомых. Смеси летучих веществ различаются по составу и концентрациям, поэтому эти смеси являются сложными растительными сигналами для насекомых-вредителей. Существуют общие для всех растений и специфичные для определенных видов растений летучие вещества (Crespo-Herrera, 2012; Luo et al., 2022). Метилсалицилат одно из таких летучих веществ. Было показано, что для нескольких видов тлей *R. padi*, *S. avenae* и *S. graminum* метилсалицилат является репелентом (Pickett, Glinwood, 2007). Еще одно косвенное воздействие метилсалицилата на тлей заключается в том, что он стимулирует устойчивость растений (Pickett, Glinwood, 2007). Летучие производные жасмонатов растений также играют роль в устойчивости самих хозяев и могут выделяться ими при повреждении насекомым. Эти производные жасмонатов могут действовать как репелленты против различных видов тлей. Интересно, что летучие производные жасмонатов являются аттрактантами для некоторых естественных врагов тлей, таких как божьи коровки и паразитоиды (Birkett et al., 2000).

Как только насекомые садятся на растения, на их поведение дополнительно влияют морфология и химический состав растений. Из морфологических характеристик растений на поведение насекомых, например, на кормление и размножение может влиять опушение листьев (Smith, Chuang, 2014). После приземления наиболее важным фактором, определяющим решение тли отклонить или принять растение в качестве хозяина, является информация, полученная при введении стилета (Powell et al., 2006). Считается, что тля высасывает мелкие пробы сока, которые при прощупывании быстро транспортируются к глоточному

вкусовому органу. Именно на уровне флоремы принимается окончательное решение о принятии или отклонении растения.

Антибиоз определяется как механизм устойчивости, который прямо и отрицательно влияет на физиологию насекомого. Антибиотическое воздействие на насекомых сильно различается и может быть обусловлено морфологическими и химическими факторами растений. Антибиотическое воздействие может привести к более высокой смертности, уменьшению размера и массы тела, удлинению периодов развития и/или снижению плодовитости насекомых (Smith, Chuang, 2014; Luo et al., 2022).

Основными признаками антибиотической защиты являются аллелохимические вещества растений, которые представляют собой непитательные химические вещества, вырабатываемые растениями и влияющие на биологию или поведение других видов. Аллелохимические реакции могут быть конститутивными или индуцированными. Такие соединения могут быть активны в низких концентрациях, например, гидроксамовые кислоты (Smith, Chuang, 2014). Известно токсическое действие присутствующих в злаковых культурах гидроксамовых кислот – 2,4-дигидрокси-7-метокси-(2Н)-1,4-бензоксазин-3(4Н)-она (ДИМБОА) и 2,4-дигидрокси-(2Н)-1,4-бензоксазин-3(4Н)-она (ДИБОА), а также родственных им соединений – бензоксазолинонов 6-метоксибензоксазолин-2(3Н)-она (МБОА) и бензоксазолин-2(3Н)-она (БОА) на некоторых фитофагов и возбудителей болезней (Radchenko et al., 2022; Luo et al., 2022).

Хотя химические вещества являются наиболее ярким примером антибиоза, морфологические факторы также могут напрямую негативно влиять на физиологию насекомых. Например, высокая плотность трихом на поверхности листовой пластины пшеницы приводит к прокалыванию и высыханию яиц и гибели личинок у злакового листоеда *Oulema melanopus* (L.) (Crespo-Herrera, 2012).

Минеральное питание и первичный метаболизм растений также могут оказывать антибиотическое действие на насекомых (Smith, Chuang, 2014). Было показано, что орнитин, играющий роль в метаболизме мочевины, отрицательно

влият на скорость размножения большой злаковой тли *S. avenae*, питавшейся на озимой пшенице (Crespo-Herrera, 2012).

С другой стороны, тли способны изменять химический состав восприимчивых растений-хозяев. Так, было показано, что питание ячменной тли *Diuraphis noxia* на растениях восприимчивой пшеницы приводило к увеличению незаменимых аминокислот в этих растениях, заселение растений обыкновенной злаковой тлей *S. graminum* вызывало значительное увеличение содержания белка у четырех линий пшеницы (Crespo-Herrera, 2012).

Толерантность. Толерантность, рассматривается как самостоятельная категория устойчивости, благодаря способности растения восстанавливаться после травм или выдерживать их без заметного воздействия на вредителя (Koch et al., 2016; Luo et al., 2022). В литературе описаны пять основных физиологических механизмов толерантности к насекомым-вредителям: (1) повышенная чистая скорость фотосинтеза после повреждения, (2) высокие относительные темпы роста, (3) повышенное ветвление или кущение после повреждения, (4) предварительно высокий уровень накопления углерода в корнях, и (5) способность перераспределять углерод после повреждения между корнями и побегами (Smith, Chuang, 2014; Koch et al., 2016). На сегодняшний день наиболее изученными у толерантных растений являются два специфических физиологических механизма: (1) повышенная фотосинтетическая активность (Luo et al., 2014; Cao et al., 2015; Luo et al., 2022) и (2) повышенная регуляция механизмов детоксикации для устранения вредоносного воздействия насекомых-вредителей на организм растения (Kerchev et al., 2012; Luo et al., 2022).

Несмотря на то, что толерантность к насекомым вредителям интенсивно изучалась последнее время, подробные характеристики механизмов, лежащих в основе толерантности, остаются слабо изученными (Crespo-Herrera et al., 2019; Luo et al., 2022).

Таким образом, устойчивость к тле считается сложной и комплексной, поскольку задействованы различные механизмы растений, связанные с распределением и поглощением питательных веществ, выработкой

антиоксидантов, производством биомассы, фотодыханием, фотосинтезом и ростом растений. Несмотря на концептуальное разделение устойчивости на три категории, их трудно выделить с точки зрения реальных механизмов, вызывающих устойчивость (Crespo-Herrera et al., 2019; Luo et al., 2022).

1.1.2.2 Конститутивная и индуцированная типы устойчивости

Растения развили сложную систему защиты от атаки насекомых-вредителей, объединив конститутивную базальную защиту с индуцируемой защитой. Более того, растения разработали непрямой защитный механизм, использующий летучие вещества и нектары для привлечения естественных врагов вредителей (Santamaria et al., 2013; Mostafa et al., 2022).

Конститутивная устойчивость включает в себя физические барьеры, такие как модификации кутикулы и клеточных стенок, поверхностные воски, трихомы, шипы, препятствующие доступу насекомых-вредителей, а также производство химических средств защиты, в основном токсинов, для снижения вкусовых качеств и влияния на рост, развитие и пищеварение вредителей (Santamaria et al., 2013; Mostafa et al., 2022).

Среди множества структурных защит наиболее изучена защитная роль трихом. Трихомы представляют собой волосовидные эпидермальные структуры, в основном расположенные на листьях и стеблях, которые мешают движениям травоядных или даже заманивают их в ловушку. Они также могут предотвращать прикрепление яиц насекомых/клещей к тканям растений. Железистые трихомы продуцируют, хранят и выделяют различные классы токсичных метаболитов и репеллентов, связанных с устойчивостью к вредителям (Glas et al., 2012). Основные классы химических веществ, которые продуцируются трихомами, включают терпеноиды, фенилпропены, флавоноиды, метилкетоны, ацилсахара и защитные белки (Glas et al., 2012; Kortbeek et al., 2021; Chun et al., 2022). Например, госсипол и родственные соединения, представляющие собой димерные дисесквитерпены, продуцируемые трихомами хлопка (*Gossypium hirsutum*),

обладают сильной противогрибковой активностью и являются потенциальными природными пестицидами (Glas et al., 2012).

Морфология, размер и плотность трихом также влияют на устойчивость растений-хозяев к вредителям. Так плотность трихом типа I/IV у диких томатов, связанная с продукцией ацилсахаров, коррелировала с устойчивостью к белокрылке *Bemisia tabaci* (Kortbeek et al., 2021). Технологии трансгенных растений, включая манипулятивные и генетические методы, оказались очень полезными при изучении защитной функции трихом (Santamaria et al., 2013; Mostafa et al., 2022).

Растения с большим количеством шипов были более устойчивы к насекомым; например, гусеницы *Manduca sexta* росли быстрее у трех видов *Solanum* (*Solanum carolinense*, *Solanum atropurpureum* и *Solanum aethiopicum*) с экспериментально удаленными шипами, чем у растений с интактными шипами (Mostafa et al., 2022).

Индукцированная устойчивость. Питание тлей индуцирует различные защитные сигнальные механизмы у растений. Эти сигналы индуцируются как механическими повреждениями, так и химическими веществами, которые присутствуют в слюне (Morkunas et al., 2011; Mostafa et al., 2022; Mou et al., 2023). Приземлившись на растение, тля заглатывает флоэмный сок своих хозяев через узкие колюще-сосущие ротовые органы, называемые стилетами. Во время зондирования стилеты тлей кратковременно прокалывают клетки эпидермиса, мезофилла и паренхимы до флоэмы, и это механическое повреждение может влиять на защитную реакцию растений (Morkunas et al., 2011). После механической работы стилета начинается секреция слюны и проглатывание сока (Tjallingii, 2006). Тли сначала выделяют гелеобразную слюну, а затем водянистую. (Morkunas et al., 2011; Zhang et al., 2020). Гелеобразующая слюна в основном состоит из белков (включая фенолоксидазы, пероксидазы, пектиназы, β-глюкозидазы), фосфолипидов и углеводов. Водянистая слюна представляет собой более сложную смесь различных белков, ферментов и других компонентов, различающихся между видами тлей и способных вызывать защитные реакции

растений (Morkunas et al., 2011; Nicolis et al., 2022; Mou et al., 2023). Протеазы слюны участвуют в расщеплении белков ситовидных элементов, что приводит к нарушению защиты растений и увеличению доступности органических соединений азота. Полифенолоксидазы, пероксидазы и оксидоредуктазы слюны осуществляют детоксикацию растительных фенолов. Кроме того, фрагменты хитина в слюне могут вызывать защитные реакции (например, отложение каллозы) (Van Bel, Will, 2016; Mou et al., 2023). В последние годы все большее число белков водянистой слюны классифицируют под термином «эффектор». Эффекторы могут подавлять (C002) или индуцировать (Mp10 или Mp42) защиту растений соответственно (Van Bel, Will, 2016). Анализ транскриптома выявил 725 транскриптов, кодирующих, предположительно, специфичные для *Diuraphis noxia* секретлируемые белки. Шесть из семи исследованных предполагаемых эффекторов *D. noxia*, названных DnE (*Diuraphis noxia* effectors), проявляли специфичную для слюнных желез экспрессию (Nicolis et al., 2022).

Растения разработали различные механизмы для защиты от тли. Было высказано предположение, что в выработке защитных реакций растений участвуют два разных процесса: первый процесс – специфическое ген-на-ген узнавание элиситоров (эффекторов) тли генами устойчивости растений с последующей активацией устойчивости у растений; второй процесс – неспецифическое распознавание повреждений тканей, вызванных тлей, что приводит к изменениям в химическом составе растений с последующим синтезом сигнальных молекул, которые запускают общую стрессовую реакцию, аналогичную базовой защите растений от фитопатогенов (Morkunas et al., 2011; Luo et al., 2022). В то время как общие или неспецифические защитные реакции участвуют в передаче сигналов у устойчивых и восприимчивых к тле растений, межгенные взаимодействия специфичны только для устойчивых к тле растений (Morkunas et al., 2011; Luo et al., 2022).

Для индукции этих реакций растений требуются соответствующие системы распознавания элиситоров, ассоциированных с вредителями (Herbivore-Associated Elicitors (HAEs)), молекулярных паттернов, ассоциированных с вредителями

(Herbivore Associated Molecular Patterns (HAMPs)), или эффекторов насекомых. Это распознавание HAMPs осуществляется рецепторами (PRR, от pattern recognition receptors), что приводит к развитию базального иммунитета, известного как PAMP-триггерный иммунитет (PTI, от pattern triggered immunity) (Santamaria et al., 2013; Mostafa et al., 2022). Эффекторы, которые подавляют реакции растений, распознаются соответствующими белками устойчивости, индуцирующими второй уровень защиты, иммунитет, запускаемый эффекторами (ETI, от effector-triggered immunity) (Santamaria et al., 2013; Mostafa et al., 2022). За распознаванием следует передача каскадов защитных реакций, в которых участвуют различные сигнальные молекулы. Сигнальные пути растений управляются фитогормонами, такими как жасмоновая кислота (ЖК), салициловая кислота (СК), этилен (ЭТ), абсцизовая кислота (АБК), гибберелловая кислота (ГК) и АФК, в основном перекись водорода (H_2O_2), которые индуцируют защиту растений при атаке тлей (Gao et al. 2007). Эти сигнальные пути могут действовать по отдельности или вместе, с антагонистическими или синергическими взаимодействиями в сигнальной сети растений (Morkunas et al., 2011; Luo et al., 2022).

Жасмоновая кислота в реакции растений на питание тлей. Жасмоновая кислота (ЖК) и сложный эфир-метилжасмонат (МеЖК) представляют собой производные линолевой кислоты, ключевые молекулы октадеканоида сигнального пути. Путь биосинтеза ЖК с участием липоксигеназы (LOX, от lipoxygenase) широко изучался в связи с устойчивостью к насекомым (Bostock 1999). Помимо ЖК, несколько других родственных оксипинов также функционируют как сигнальные молекулы. Примеры включают 12-оксофитодиеновую кислоту (12-oxophytodienoic acid – OPDA) и динор-оксофитодиеновую кислоту (dinor-oxo-phytodienoic acid – DN-OPDA) (Morkunas et al., 2011). Основываясь на большей части доступной литературы, ЖК и ее производные МеЖ являются основными фитогормонами в защите растений от насекомых с грызущим ротовым аппаратом (Smith, Boyko, 2007; War et al., 2012). Между тем, все больше экспериментальных данных показывают, что заражение

тлей запускает экспрессию генов, связанных с синтезом ЖК (Luo et al., 2020). Например, относительная экспрессия генов синтеза ЖК *LOX* и аленоксид синтазы *AOS* (allene oxide synthase), значительно увеличилась в проростках устойчивой линии пшеницы 35-E4 после предварительного кормления *R. padi* (Luo et al., 2020). *LOX*, ключевой фермент в пути биосинтеза ЖК, был изучен на многих видах растений в ответ на питание тлей. Например, транскрипты гена *LOX* сильно индуцировались при питании картофельной тли (*Macrosiphum euphorbiae*) листьями томата и при заселении *Myzus persicae* на листья арабидопсиса (Morkunas et al., 2011). Мутанты арабидопсиса по генам биосинтеза ЖК (*aos* и *opr3*) были более восприимчивы к насекомым по сравнению с растениями дикого типа (Wasternack et al., 2018).

ЖК в растениях конъюгирует с аминокислотой изолейцином (Ile) с образованием комплекса JA-Ile, а затем с белком JAR1 (jasmonate-resistant1) и связывается с COI1 (coronatine insensitive1). COI1 способствует деградации репрессоров ЖК-сигналинга белков JAZ (jasmonate-ZIM domain) через 26S-протеасом-опосредованный путь (Luo et al., 2016). После восприятия COI1-JAZ сигнальный путь ЖК можно разделить на две отдельные ветви: MYC-ветвь и ERF-ветвь (Vos et al. 2013; Li et al., 2019). MYC-ветвь в основном отвечает за защитные реакции, развивающиеся при атаке насекомыми и поранении (Pieterse et al., 2009). Эта ветвь контролируется факторами транскрипции MYC2, MYC3 и MYC4. Активация MYC-ветви приводит к экспрессии большого набора ЖК-чувствительных генов, включая экспрессию генов синтеза ЖК *LOX* и маркерного гена *VSP2* (vegetative storage protein 2) (Li et al., 2019). Ветвь ERF индуцируется при заражении некротрофными патогенами, регулируется сигнальным путем этилена и контролируется транскрипционными факторами AP2/ERF-Domain ORA59 (octadecanoid-responsive arabidopsis AP2/ERF 59) и ERF1 (ethylene response factor 1), которые непосредственно активируют экспрессию маркерных генов ERF-ветви, таких как *PDF1.2* (plant defensin 1.2) (Vos et al. 2013; Li et al., 2019).

Фактор транскрипции MYC2 положительно регулирует ЖК-опосредованную устойчивость к насекомым и толерантность к окислительному

стрессу, возможно, за счет усиления биосинтеза флавоноидов и окислительно-восстановительного цикла аскорбата (Morkunas et al., 2011). Тройной мутант *mys2/3/4* и четырехкратный мутант *mys2/3/4/5* чрезвычайно восприимчивы к насекомым вредителям (Boter et al., 2004; Schweizer et al., 2013; Wang et al., 2019). Было обнаружено, что транскрипционные факторы семейства MYC контролируют биосинтез некоторых вторичных метаболитов, которые имеют решающее значение для защиты растений от насекомых (Wang et al., 2019). Так хорошо известна роль белков MYC в индукции ингибиторов протеаз (PI), которые нарушают функцию пищеварительной системы насекомых (Boter et al., 2004). Ингибиторы протеаз являются защитными белками и маркерами ЖК-сигнального пути, относятся к группе PR6 белков и выделены у многих групп растений (Van Loon et al., 2006; Яруллина и др., 2016). Как правило, наибольший защитный ответ при атаке насекомых способны оказывать ингибиторы трипсина- и хемотрипсиноподобных протеаз (Конарев, 2002). Так у гороха ингибиторы сериновых протеаз проявляли афицидную активность, а рост популяции и плодовитость гороховой, хлопково-бахчевой тли, картофельной тли и персиковой тли были ниже при кормлении рационом, содержащим цистеиновые ингибиторы протеаз (Nalam et al., 2019). Более того, белки MYC2, MYC3 и MYC4 способствуют синтезу глюкозинолатов (GS), класса азот- и серосодержащих тиоглюкозидов, которые катаболизируются в токсичные соединения при питании насекомыми (Schweizer et al., 2013). Также, MYC2 может напрямую активировать экспрессию генов синтеза терпенов (*TPS10*, *TPS21* и *TPS11*). Известно, что терпены играют важную роль как в прямой, так и в косвенной устойчивости к насекомым (Wang et al., 2019).

В недавней работе были показаны множественные эффекты накопления ЖК у растений пшеницы, заселенных индийской зерновой тлей *Sitobion miscanthi* (Yan et al., 2023). Обработка растений МеЖК не оказала серьезного негативного влияния на продуктивность *S. miscanthi* при колонизации растений, при этом уровень транскрипции маркерных генов ЖК-сигнального пути *WRKY3*, *PDF1.2* и *PR-4* был значительно повышен (Yan et al., 2023). Также уровень транскрипции

гена *TaTDC*, кодирующего фермент триптофандекарбоксилазу, который способствует превращению L-триптофана в триптамин, также быстро активировался после обработки растений МеЖК или заселения тлей *S. miscanthi*. Основные продукты превращения триптамина могут играть решающую роль в подавлении СК-зависимых защитных реакций (Yan et al., 2023). Впоследствии триптамин может стать возможным субстратом для образования ауксинов или серотонина, которые значительно изменяют физиологические свойства растений или непосредственно приносят пользу питающимся насекомым (Luo et al., 2022; Yan et al., 2023). Таким образом, обработка МеЖК, вероятно, запускает альтернативные пути, которые изменяют физиологические свойства растений для тонкой настройки защитных реакций в растениях пшеницы, чтобы уменьшить СК-зависимые ответы, ЖК может стимулировать синтез серотонина (Yan et al., 2023).

Салициловая кислота в реакции растений на питание тлей. Салициловая кислота (СК), также как и ЖК, играет решающую роль в опосредовании сигнальных сетей, участвующих в индуцированных защитных реакциях против тлей (Smith, Boyko, 2007). Считается, что сигнальный путь СК участвует в защите растений от насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом (Smith, Boyko, 2007; War et al., 2012).

У СК выявлено две отдельные ветви пути биосинтеза — изохоризматный путь, катализирующийся изохоризмат синтазой (isochorismate synthase – ICS) и фенилпропаноидный путь, который катализируется фенилаланин-аммиаклиазой (phenylalanine ammonia lyase – PAL), но обе ветви требуют химического хоризмата, полученного из шикиматного пути (Li et al., 2019). Генетические исследования показали, что на параллельный путь изохоризматов приходится большая часть индуцированного патогенами накопления СК (Li et al., 2019). Изохоризматный путь происходит в пластидах. Сначала фермент ICS1 превращает хоризмат в изохоризмат, а затем изохоризмат превращается в СК с помощью изохоризматпируват лиазы (isochorismate pyruvate lyase – IPL) (Li et al., 2019). Было выделено два фактора транскрипции, которые регулируют

экспрессию ICS1 — SARD1 (SAR-deficient 1) и кальмодулин-связывающий белок CBP_{g60} (calmodulin-binding protein 60-like g), оба связываются с промотором ICS1 и регулируют индукцию его экспрессии (Zhang et al., 2010). Индукция ICS1 приводит к накоплению СК, что запускает окислительно-восстановительные изменения в цитоплазме, которые переключают главный регулятор СК-сигналинга NPR1 (non-expresser of pathogenesis-related genes 1) из олигомерной формы в мономерную (Li et al., 2019). Недавние исследования показали, что СК напрямую связывается с NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes1) и его гомологами NPR3 и NPR4, которые являются ядерными рецепторами СК (Fu et al., 2012). Активная форма NPR1 взаимодействует с активаторами транскрипции семейства факторов транскрипции TGA (TGACG-binding factor), вызывая экспрессию маркерных генов СК-пути, таких как *PR1* (pathogenesis-related protein 1) (Li et al., 2019).

PR1 белки – маркеры СК-сигнального пути и развития системной приобретенной устойчивости (СПУ) – представляют собой первое открытое семейство PR-белков (Van Loon et al., 2006). PR1 белки в большом количестве синтезируются в растениях при атаке патогенами, вирусами, насекомыми-вредителями (Van Loon et al., 2006; Luo et al., 2020; Rubil et al., 2022). Биологические функции PR1 белков еще до конца не выяснены, однако на сегодняшний день установлено, что PR1 белок обладает противомикробной и протеолитической активностями, является мишенью для эффекторов патогенов, может связываться с другими PR белками, липидами и стеролами (Han et al., 2023). Установлено, что при атаке тлей PR1 белок участвует в регуляции отложения каллозы, которая играет важную роль в защитных реакциях растений на заселение тлей (Silva-Sanzana et al., 2020; Rubil et al., 2022). Активация гена *PR1* была локализована в пространстве и времени с отложением каллозы вокруг мест питания капустной тли *Brevicoryne brassicae* в листьях *Arabidopsis thaliana* (Rubil et al., 2022). Экспрессия генов растительных ферментов β-1,3-глюканаз, объединенных в семейство патоген-индуцируемых белков PR2, также

регулируется СК, а ген *PR2* считают маркерным геном СК-сигнального пути (Van Loon et al., 2006).

Роль СК в ответ на питание тлей наблюдали у многих видов растений, таких как *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*, ячмень, *Medicago truncatula* и *Phaseolus lunatus* (Morkunas et al., 2011). Было показано, что широкий спектр защитных реакций у *Arabidopsis thaliana* на атаку капустной тлей *Brevicoryne brassicae* зависит от передачи сигналов СК (Kusnierczyk et al., 2008). Была установлена индукция следующих генов: факторов транскрипции – *WRKY15*, *WRKY26*, *WRKY30*, *WRKY38*, *WRKY46*, *WRKY50*, *WRKY51* и *WRKY54*, генов, участвующих в синтезе СК (*ICS1* и *ICS2*), регулирующих синтез СК (*EDS1* (enhanced disease susceptibility1), *EDS5* и *PAD4* (phytoalexin deficient4) и СК-зависимых генов (*PR1*, *PR2*, *PR4*, *PR5* и *SABP2-like*) (Kusnierczyk et al., 2008). Некоторые из этих генов индуцировались уже через 6 ч после заражения, что указывает на раннее распознавание атаки *B. brassicae* (Kusnierczyk et al., 2008). Накопление СК обнаружили у двух сортов ячменя, UNA-80 и LM-109, в ответ на заселение *Schizaphis graminum* (Chaman et al., 2003). У устойчивых и восприимчивых растений *Medicago truncatula* после заселения голубой люцерновой тлей *Acyrtosiphon kondoi* накапливались транскрипты генов *PAL*, *PR1*, *PR5* и *PR10* (Gao et al., 2007). Заселение растений пшеницы черемуховой тлей *R. padi* значительно повышало уровень экспрессии гена *PR1* и генов синтеза СК у устойчивой линии озимой пшеницы 35-E4 (Luo et al., 2020).

В совокупности эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что СК-сигнальный путь участвует в реакциях растений против насекомых-вредителей, питающихся флоэмным соком.

Этилен в реакции растений на питание тлей. Этилен представляет собой газообразный гормон, который уже более века считается регулятором роста растений. Путь биосинтеза ЭТ, также известный как цикл Янга, начинается с аминокислоты метионина (Li et al., 2019). АЦК-синтаза (синтаза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты) превращает S-аденозилметионин (SAM) в АЦК и является ферментом, ограничивающим скорость биосинтеза

этилена, поскольку этилен является диффундирующим, газообразным и неразлагаемым гормоном, его необходимо строго контролировать (Li et al., 2019). Этилен воспринимается локализованными на эндоплазматическом ретикулуме рецепторами ETR1 (Ethylene Response 1), которые действуют как негативные регуляторы (Шишова и др., 2008; Li et al., 2019). В отсутствие этилена CTR1 (constitutive triple response 1) фосфорилирует EIN2 (ethylene insensitive2), и путь этилена блокируется. В присутствии этилена, когда он воспринимается рецептором, киназная активность CTR1 инактивируется, EIN2 CEND (C-terminal end of EIN2) дефосфорилируется и расщепляется. Затем стабилизированный белок EIN3 (ethylene insensitive3) активирует факторы транскрипции ERF (ethylene-response factor) (т.е. ERF1 и ORA59), вызывая этилен-зависимый ответ (Li et al., 2019), который заключается в активации генов PR-белков, в том числе хитиназ (PR3) и глюканаз (PR2) (Chen et al., 2008). Так трансгенные линии пшеницы сверхэкспрессирующие *ERF1* очень сильно увеличивали экспрессию генов *PR3* и *PR2*, при этом у этих линий пшеницы повышалась устойчивость к патогенному грибку *Rhizoctonia cerealis* (Chen et al., 2008).

Этилен вырабатывается при нападении насекомых, и предполагается, что он играет важную роль в индуцированной резистентности к вредителям (Lu et al., 2014). Этилен положительно регулирует накопление защитных белков и вторичных метаболитов, в том числе фенолов, алкалоидов и терпеноидов, а также летучих органических соединений, скорее всего, за счет синергизма передачи сигналов ЖК (Lu et al., 2014). Так, влияние сигнального пути этилена на питание цикадок, вероятно, связано с повышенным выделением репеллентных летучих веществ риса, таких как 2-гептанон и линалоол (Lu et al., 2014). Также передача сигналов этилена может опосредовать устойчивость растений к вредителям за счет усиления структурных или химических барьеров в клеточной стенке (Lu et al., 2014).

Ранее сообщалось, что этилен накапливается при поранении (Morkunas et al., 2011). Также сообщали, что гены, участвующие в биосинтезе этилена АЦК-оксидаза (*ACO*), а также гены сигналинга этилена *ERF1* индуцировались как у

чувствительных, так и у устойчивых растений *Medicago truncatula* после заселения голубой люцерновой тлей *Acyrtosiphon kondoi* (Gao et al., 2007). Было показано, что этилен синтезируется и накапливается как у устойчивых, так и у восприимчивых сортов люцерны, пшеницы и ячменя после заселения разными видами тлей (Morkunas et al., 2011). Исследуя влияние этилена на развитие защитных реакций ячменя против обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* и против обыкновенной черемуховой тли *Rhopalophum padi*, заметили, что при заселении тлей производство этилена было выше у устойчивого сорта Фронтера, чем в Арамуре, более восприимчивом к тле сорте. Производство этилена также увеличивалось со степенью заражения, и тля *Schizaphis graminum* индуцировала большее выделение этилена, чем *Rhopalophum padi* (Argandona et al., 2001).

В целом, сигнальный путь этилена играет важную, но изменчивую роль в регуляции устойчивости растений к насекомым-вредителям. Например, у *A. thaliana* этиленовый путь отрицательно регулирует устойчивость растений к насекомым-универсалам, жующим листья *Spodoptera littoralis* и *Spodoptera exigua*, тогда как он не влияет на устойчивость к насекомым-специалистам, жующим листья *Pieris rapae* и *Plutella xylostella*, а также к тлям, питающимся флоэмой *Myzus persicae* и *Brevicoryne brassicae* (Lu et al., 2014). Фармакологические исследования кукурузы показали, что этилен положительно опосредует устойчивость растений к насекомому-универсалу, жующему листья *S. frugiperda* (Harfouche et al., 2006). У риса передача сигналов этилена положительно регулирует устойчивость к специалисту с грызущим ротовым аппаратом рисовой желтой огневке *Chilo suppressalis*, но отрицательно модулирует устойчивость к специалисту с колюще-сосущим ротовым аппаратом бурой рисовой цикадке *Nilaparvata lugens* (Lu et al., 2014; Huang et al., 2022).

Один из главных белков сигнального пути этилена EIN2 (ethylene insensitive2) вместе с транскрипционным фактором MYB44 регулируют устойчивость растений к тлям через флоэму (Phloem-Based Defense (PBD)) (Dong et al., 2004; Liu et al., 2010; Fu et al., 2014; Lu et al., 2023). Этот защитный механизм

заключается в полимеризации лектиновых белков флоэмы (PP2-A1 и PP2-A2) и глюканов с образованием полимеров с высокой молекулярной массой, которые блокируют поры ситовидной пластинки флоэмы и, следовательно, препятствуют питанию тлей (Dong et al., 2004; Liu et al., 2010). Такая защита была продемонстрирована на растениях Арабидопсиса заселенных *M. persicae* и на растениях пшеницы пораженных большой злаковой тлей *Sitobion avenae* (Fu et al., 2014; Lu et al., 2023). И было показано, что именно этиленовый сигнальный путь необходим для активации лектиновых белков флоэмы (Fu et al., 2014; Lu et al., 2023).

Взаимосвязь между гормональными путями в реакции растений на кормление тлей. Сигнальные пути не функционируют независимо, а вовлечены в сложную сеть, в которой разные пути влияют друг на друга посредством позитивных и негативных регуляторных взаимодействий. Взаимодействия между путями передачи сигнала играют важную роль в тонкой настройке сложных защитных реакций (Pieterse et al., 2014; Li et al., 2019).

Хорошо изучен антагонизм сигнальных путей СК и ЖК при ответе растений на атаку патогенов (Pieterse et al., 2014; Li et al., 2019). Так СК подавляет передачу сигналов ЖК с помощью транскрипционных факторов TGA и ORA59. СК уменьшает накопление ORA59 и его способность стимулировать экспрессию ЖК-зависимых генов (Li et al., 2019). Главный регулятор СК-пути NPR1 необходим для СК-индуцированной экспрессии *WRKY70* и *ROXY19*, которые используются для репрессии ЖК/этиленового-сигнального пути (Bostock 1999). Главный транскрипционный фактор ЖК-пути MYC2 косвенно контролирует антагонизм ЖК/СК, благоприятствуя ветви ЖК/этилен (Goossens et al., 2016).

Однако когда растения атакуют тли, питающиеся флоэмой, ЖК и СК-зависимые пути скоординировано регулируют экспрессию защитных генов. Анализ профиля экспрессии генов при заражении тлей показал активацию как СК, так и ЖК-чувствительных генов (*PR1*, *PR2*, *PDF* и *LOX*) у арабидопсиса при питании капустной тлей (*Brevicoryne brassicae*) и хлопковой тлей (*Aphis gossypii*), а у растений томатов повышались уровни РНК *LOX* и *PR1* в листьях после

заселения картофельной тлей (*Macrosiphum euphorbiae*) и персиковой тлей (*M. persicae*) (Morkunas et al., 2011). У картофеля, тля *M. euphorbiae* индуцировала как ЖК, так и СК-зависимые пути передачи сигналов, в растениях заселенных вредителем увеличивалась экспрессия генов *PR1*, *LOX*, *PI-I* и *PI-II*, как при совместимых, так и при несовместимых взаимодействиях (Morkunas et al., 2011). Заражение чувствительных линий арабидопсиса персиковой тлей *M. persicae* и восприимчивого сорта сорго обыкновенной злаковой тлей *S. graminum* приводило к активизации генов СК-пути и ЖК-пути (Morkunas et al., 2011).

Гороховая тля *Acyrtosiphon pisum* в растениях *Medicago truncatula* запускала экспрессию генов *PR1* и ингибитора протеазы *PI*, соответствующих маркеров салицилового и жасмонового путей (Pandharikar et al., 2020). В случае взаимодействия растения с насекомым часто было показано, что ЖК- и этилен-зависимые пути синергически индуцируют защитные реакции растений против вредителей. Например, ЖК и этилен показали синергическую взаимосвязь в продукции ингибиторов протеиназ и дефензинов у арабидопсиса, такая же положительная совместная регуляция, ЖК-этилен наблюдалась при индукции защитных реакций у тыквы *Cucurbita moschata* в ответ на питание серебристолистной белокрылкой — *Bemisia argentifolii* (Morkunas et al., 2011). В недавней работе изучение транскриптома показано, что кормление тлей *S. avenae* и *S. graminum* на пшенице индуцировало гены сигналинга и биосинтеза всех трех гормональных путей – СК, ЖК и этилена (Zhang et al., 2019).

Однако, с другой стороны, накоплено много данных о том, как насекомые используют различные стратегии для манипулирования антагонизмом СК-ЖК, чтобы они лучше приспособивались к питанию на своих растениях-хозяевах (Zhang et al., 2017). Например, некоторые насекомые, при питании на растениях, секретируют СК различными способами, чтобы подавить ЖК сигнал. Личинки колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*, используют микробных симбионтов в своих оральных выделениях, чтобы вызвать выработку СК, которая антагонистически подавляет ЖК-опосредованную защиту от насекомых (Zhang et al., 2017). Schmiesing с соавторами (2016) показали, что экстракты яиц

капустницы *Pieris brassicae* не только запускают передачу сигналов СК, но также опосредуют дестабилизацию белков MYC зависимым от СК образом. Некоторые насекомые используют внутрипутевой антагонизм между ERF-ветвью и MYC-ветвью в ЖК-сигнальном пути для лучшего размножения. Элиситоры в секрете ротовой полости гусениц *Pieris rapae* активируют ERF-ветвь у *Arabidopsis*, что придает устойчивость к некротрофным патогенам и подавляет MYC-ветвь и ослабляет устойчивость к насекомым (Zhang et al., 2017).

Так же было показано, что ЖК, СК и этилен вызывают накопление АФК/ H_2O_2 в реакциях растений на кормление тлей, но молекулярный механизм, лежащий в основе этих взаимодействий, не ясен (Kerchev et al., 2012). АФК являются активаторами защитных сигнальных путей и, как известно, участвуют в возникновении реакции растений на нападение тли.

АФК участвует в реакции растений на питание тлей. АФК, в основном перекись водорода, H_2O_2 , представляют собой молекулы защитных сигнальных путей с известным участием в индукции защитных реакций растений на кормление тлей (Morkunas et al., 2011). Клетки растений производят повышенное количество H_2O_2 в ответ на различные биотические факторы, что является общей реакцией растений на стрессовые условия (Koch et al., 2016; Podgórska et al., 2017). Насекомые также оказывают глубокое влияние на фотосинтез, как через физиологические механизмы, так и через сдвиги в транскрипционном профиле генов, связанных с фотосинтетическими реакциями, а фотосинтез является основным источником АФК на свету, реакции в хлоропластах производят ряд форм АФК, включая синглетный кислород, супероксид и перекись водорода (Kerchev et al., 2012). Генерируемая растением H_2O_2 , в ответ на заселение тлей имеет большое значение и участвует в передаче сигнала для активации защитных генов. Например, пероксидазы участвуют в стимуляции реорганизации клеточной стенки и индуцируют перекрестное связывание богатых пролином белков клеточной стенки растений (Koch et al., 2016). Кроме того, высокий уровень H_2O_2 может оказывать токсическое действие на тлю, вызывая ее повреждения (Morkunas et al., 2011; Koch et al., 2016).

Сигнальная роль АФК при ответе на атаку насекомых была показана во многих работах (Kusnierzyk et al., 2008; Kerchev et al., 2012; Zhang et al., 2019). Результаты, представленные Kusnierzyk с соавт. (2008) показали участие АФК в ранней передаче сигналов у *Arabidopsis thaliana* после заражения тлей *Brevicoryne brassicae*. Перекись водорода активировала MAPK-каскад (митоген-активирующие протеинкиназы), который модулировал экспрессию генов в ответ на внешние раздражители. Уровни экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом, были изменены в ответ на атаку *B. brassicae*, эти гены кодировали аскорбатредуктазы, L-аскорбатоксидазу, четыре белка семейства глутаредоксинов; тиоредоксин (TRX5), глутатион-S-трансферазу, НАДФН-оксидазу и предшественники пероксидаз (Kusnierzyk et al., 2008).

Например, сильный всплеск накопления H_2O_2 наблюдался у устойчивой линии пшеницы, но не у восприимчивой линии после заражения ячменной тлей *Diuraphis noxia*. Накопление H_2O_2 сопровождалось повышением активности НАДФН-оксидазы, необходимость которой в развитии защитной реакции была подтверждена ингибиторным анализом. Применение ингибитора НАДФН-оксидазы дифенилен йодониума предотвращало не только накопление АФК, но и ингибировало последующую индукцию β -1,3-глюканазы, индуцируемой тлей (Kerchev et al., 2012).

Zhang с соавт. (2019) показали, что кормление злаковых тлей *S. graminum* и *S. avenae* на растениях пшеницы вызывало накопление H_2O_2 и индуцировало экспрессию различных генов окислительно-восстановительного метаболизма. В растениях заселенных *S. graminum* активировались 66 генов пероксидаз, восемь генов аскорбатпероксидаз, пять генов каталаз, восемь генов супероксиддисмутаз и семь генов глутатионпероксидаз. В растениях заселенных *S. avenae* активировалось гораздо меньше генов, 15 генов пероксидаз и один ген аскорбатпероксидазы, что может предполагать менее сильный окислительный взрыв в таких растениях, чем в растениях заселенных *S. graminum* (Zhang et al., 2019).

В других исследованиях с использованием трансгенных линий пшеницы было показано участие транскрипционного фактора WRKY53 в активации гена фенилаланин-аммиак лиазы (PAL) и накоплении H_2O_2 , в листьях заселенных ячменной тлей *D. noxia*, а также была показана необходимость WRKY53 для распространения сигнала АФК в растениях (Kerchev et al., 2012).

Пероксидазы – защитные белки группы PR9 и ферменты про-/антиоксидантной системы, образующие в растениях мультигенное семейство ферментов класса III (Минибаева, Гордон, 2003; Almagro et al., 2009). Индуцибельные пероксидазы активируются в растениях при поранении, атаке патогенов и насекомых-вредителей (Almagro et al., 2009; War et al., 2012; Zhang et al., 2019). Главная функция пероксидаз - защита растений от разрушающего воздействия АФК и их утилизация (War et al., 2012). Кроме этого, пероксидазы являются важным компонентом непосредственной реакции растений на атаку насекомых. При питании насекомых пероксидазы, полифенолоксидазы, аскорбатпероксидазы и другие пероксидазы, окисляющие моно- или дигидроксифенолы до хинонов нарушают усвоение питательных веществ насекомыми, так как хиноны связываются с белками листьев и препятствуют их перевариванию в кишечнике насекомых (Gulsen et al., 2010). Кроме этого, хиноны также проявляют прямую токсичность по отношению к вредителям (Gulsen et al., 2010). И пероксидазы обладают прямой токсичностью в кишечнике насекомых (Zhu-Salzman et al., 2008). Фенолы составляют одну из наиболее распространенных групп защитных соединений, играющих основную роль в устойчивости против вредителей (War et al., 2012). Пероксидазы в присутствии высоких концентраций H_2O_2 окисляя субстраты и в дальнейшем взаимодействуя с фенольными соединениями участвуют в образовании лигнина или суберина (Минибаева, Гордон, 2003; Almagro et al., 2009). Лигнин, фенольный гетерополимер, играет центральную роль в защите растений от насекомых и патогенов. Он физически увеличивает прочность листа, снижает содержание питательных веществ в листе, чем уменьшает потребление растительных тканей насекомыми (War et al., 2012). Участие H_2O_2 и пероксидаз в стимуляции

реорганизации клеточной стенки было показано у ячменя после заражения тлями *S. graminum* и *R. padi* (Argandona et al., 2001). Кормление *S. graminum* на растениях пшеницы индуцировало экспрессию многих генов, кодирующих ферментативные или неферментативные белки, связанные с динамикой клеточной стенки растений (Zhang et al., 2019).

Антиоксидантная система растений – это система защиты от избытка АФК, в которой основную роль играют антиоксидантные ферменты супероксиддисмутаза, снижающая концентрацию супероксид радикала, и каталаза, устраняющая избыток перекисей (Podgórska et al., 2017).

Каталаза - гем-содержащий фермент, превращающий H_2O_2 в кислород и воду. В системе растение-патоген или растение-вредитель, каталазы, утилизируя H_2O_2 , продуцируемую растением в качестве защитного механизма, могут инициировать систему совместимости (Lei, Zhu-Salzman, 2015). В случае с насекомыми повышенные уровни каталазы связывают с уменьшением окислительного взрыва и поддержанием благоприятных условий для питания тлей в растениях (Zhu-Salzman et al. 2004; Lei, Zhu-Salzman, 2015). Известно, что в кишечнике насекомых существует высокая активность ряда антиоксидантных ферментов, включая супероксиддисмутазу, каталазу и все ферменты цикла аскорбат-глутатиона для обезвреживания радикалов и таннинов (Kerchev et al., 2012). В нескольких исследованиях изучалось влияние манипулирования антиоксидантным статусом растений на продуктивность насекомых, и было показано, что ускорение темпов роста личинок насекомых может быть связано с измененным антиоксидантным статусом растений (Kerchev et al., 2012).

АФК и редокс-ферменты взаимодействуют с широким спектром фитогормонов, включая ауксин, абсцизовую кислоту, ЖК, СК, этилен, гиббереллины и цитокинины (Kerchev et al., 2012). Секреты слюны насекомых гусеницы табачного бражника (*Manduca sexta*) или хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*) индуцируют накопление АФК в растениях, после чего быстро запускается сигнальный путь ЖК (Mostafa et al., 2022). Продукция АФК вызывает накопление ЖК и СК, высокие концентрации СК индуцируют продукцию АФК,

тогда как СК влияет на метаболизм АФК и их утилизацию (Mostafa et al., 2022). В растениях СК может восприниматься и связываться множеством СК-связывающих белков, включая каталазу и аскорбатпероксидазу, что приводит к накоплению H_2O_2 в апопласте и симпласте хозяина (Luo et al., 2022). Это приводит к гиперчувствительной реакции и запрограммированной гибели клеток, которая изолирует последующих колонизаторов тлей и лишает их питательных веществ, необходимых для последующего роста и размножения (Luo et al., 2022). Было показано, что СК влияет на активность каталазы и пероксидазы у растений пшеницы заселенных ячменной тлей *Diuraphis noxia* (Morkunas et al., 2011).

1.2 Бактерии – продуценты биологически активных веществ

1.2.1 Метаболиты бактерий и их значение в жизнедеятельности бактерий

В настоящее время спорообразующие аэробные бактерии, или бациллы, объединяют в отдельный род *Bacillus* семейства *Bacillaceae* (Харвуд, 1992). Фердинанд Кон в 1872 г. впервые ввел родовое название *Bacillus* для палочковидных бактерий, которые росли в виде нитей. Независимо друг от друга в 1876 г. Кон (Cohn, 1876) и Кох (Koch, 1876) показали, что два вида этого рода, *B. subtilis* и *B. anthracis*, образовывали особые структуры - бактериальные эндоспоры, которые были устойчивы к нагреванию и не гибли при кипячении.

В настоящее время в род *Bacillus* объединены 415 видов бактерий (по данным на 2022 год, <http://www.bacterio.net/bacillus.html>), которые характеризуются по нескольким признакам: прямые или почти прямые палочковидные бактерии, образующие термоустойчивые эндоспоры, окраска по Грамму положительна. Большинство видов *Bacillus* - не нуждаются в факторах роста, так как они ассимилируют минеральные формы азота как единственный его источник. Молекулярный кислород служит конечным акцептором электронов в дыхательном метаболизме. Представители рода *Bacillus* являются облигатными аэробами.

Бактерии *Bacillus* spp. широко распространены и встречаются повсеместно - в почве, водной среде, пищевых продуктах и кишечной микробиоте членистоногих и млекопитающих (Caulier et al., 2019). Однако основной средой обитания бактерий рода *Bacillus* является почва. Штаммы этих бактерий были выделены из почв в пустыне и в Антарктике. В почвах с низким содержанием органических веществ разнообразие бактерий обычно ограничено. В таких почвах доминируют *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. cereus*. Однако разнообразие видов увеличивается по мере повышения плодородия почвы.

Клетки бацилл обитают как в морской, так и в пресной воде. В морской воде преобладают виды *B. licheniformis*, *B. subtilis* и *B. pumilus*. К другим видам, встречающимся в незагрязненных районах относятся *B. brevis*, *B. sphaericus* и *B. firmus*. Бациллы, которые обнаруживают в пресной воде, имеют, вероятно, почвенное происхождение. Бактерии рода *Bacillus* чаще всего представляют собой типичные почвенные организмы, такие как *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. cereus* и *B. pumilus* (Allen et al., 1983).

Бактерии рода *Bacillus* знамениты своими способностями синтезировать широкий спектр биологически активных веществ. В настоящее время считается, что, по крайней мере, 4–5% генома бактерий группы *Bacillus* отвечает за синтез антимикробных соединений (АМС), которые являются в основном антимикробными пептидами (Caulier et al., 2019). Из-за большого разнообразия АМС, их классификация довольно сложна и может основываться на различных критериях, таких как механизм биосинтеза, биологические функции и свойства, трехмерная структура и др. Одна из распространенных классификаций АМС группы *Bacillus* основана на различиях в путях их биосинтеза и химической природе, а также биологической активности. По этой классификации АМС делятся на рибосомные пептиды (RPs) (бактериоцины и ферменты), поликетиды (PKs), нерибосомные пептиды (NRPs) и летучие органические соединения (Caulier et al., 2019).

Встречается классификация вторичных метаболитов бактерий рода *Bacillus* по их функциям. Например, метаболиты рост-стимулирующих бактерий,

связанные с защитой растений от патогенов и вредителей, делятся на метаболиты с антибиотической активностью, такие как антибиотики, циклические липопептиды, сидерофоры и др.; на гидролитические ферменты - хитиназы, глюканазы, протеазы, липазы, амилазы, лактамазы, целлюлазы, которые могут разрушать клетки патогенных грибов и ряд других соединений (Van de Mortel et al, 2009); на бактериальные детерминанты (MAMPs, от *microbe-associated molecular patterns*), обладающие элиситорной активностью, благодаря которым происходит индукция системной устойчивости, это - флагеллин, липополисахариды (ЛПС), а также летучие органические соединения и др. (Van Loon et al, 2006). Кроме того, бактерии оказывают прямое действие на рост растений, которое связывают с повышением доступности для растений элементов минерального питания и продукцией метаболитов с гормональными и сигнальными функциями (ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая, салициловая и жасмоновая кислоты) (Максимов и др., 2015; Miljakovic et al., 2020). Например, синтез бактериями *B. subtilis* FZB24 ауксинов способствует стимуляции развития корневой системы, позволяет растениям более активно поглощать воду и питательные вещества и, соответственно, усиливает не только устойчивость растений к болезням, но и позволяет им ускоренно проходить чувствительные к патогенам стадии своего развития (Максимов и др., 2015). Цитокинины могут продуцироваться представителями *Bacillus*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*. При инокуляции растений цитокинин-продуцирующими бактериями *B. subtilis* было установлено, что в самих растениях повышалось содержание хлорофилла и накопление цитокининов и приводило к увеличению массы, как побегов, так и корней (Kudoyarova et al., 2014).

Бактериоцины - это пептиды, секретируемые бактериями, которые обладают антимикробной активностью и действуют на другие штаммы того же вида или родственных видов (Caulier et al., 2019). Бактериоцины синтезируются многими бактериями. Бактериоцины обладают низкой токсичностью и имеют как широкий, так и узкий спектр действия, поэтому они рассматриваются как

альтернатива антибиотикам. Кроме того, в недавнее время появилась информация о возможности применения бактериоцинов против рака (Sumanpreet et al., 2015).

Ферменты. Бактерии рода *Bacillus* обладают разнообразной ферментативной активностью. У бацилл особенно развита система гидролаз, включающая синтез хитиназ, глюконаз, амилазы, протеаз, лактамаз, целлюлаз и многие другие ферменты (Caulier et al., 2019). Такие ферменты как хитиназы и β -1,3-глюканазы, способны разрушать структурные элементы клеточной стенки гриба (глюканы и хитин) и разрушать грибные гифы (Журавлева, Лукьянов, 2004). Показано, что из ряда миколитических ферментов *B. subtilis* 739 наиболее активно в лизисе мицелия разных видов фитопатогенных грибов *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani* принимали участие β -1,3-глюканазы, протеазы, хитиназы и хитозаназы (Журавлева, Лукьянов, 2004). Хитин также является компонентом кутикулы большинства насекомых и очищенная хитиназа из различных штаммов *Bacillus* spp., может вызывать повышенную смертность некоторых из них (Chandrasekaran et al., 2014; Kahia et al., 2021). Хитиназа блокировала активность большинства кишечных ферментов, необходимых для питания насекомых (Chandrasekaran et al., 2014). Хитиназа из штаммов *B. subtilis* повышала смертность гусениц табачной совки *Spodoptera litura*, а хитиназа из штамма *B. subtilis* РТВ185 увеличивала смертность бахчевой тли *Aphis gossypii* и картофельной тли *Aulacorthum solani* (Chandrasekaran et al., 2014; Kahia et al., 2021).

Бактерии также секретируют внеклеточные нуклеазы и протеазы, поэтому могут связывать и разрушать вирусы, которые часто переносят насекомые, особенно тли (Maksimov et al., 2020a). В настоящее время обнаружено более 20 внеклеточных РНКаз *Bacillus*. Например, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* и *B. licheniformis* продуцируют внеклеточные РНКазы, называемые барназами, биназами и балифазами, соответственно (Pinskaya et al., 2018).

Ферментные комплексы микроорганизмов также применяются в сельском хозяйстве при решении проблемы кормовой базы в животноводстве и птицеводстве. Так амилазы, продуцируемые бациллами, способствует

расщеплению крахмалсодержащих компонентов кормов, протеазы воздействуют на протеины, липазы – на жиры (Caulier et al., 2019). Также ферментные комплексы синтезируемые бактериями представляют интерес для пищевой промышленности, медицины и ветеринарии.

Поликети́ды - это одна из самых больших групп вторичных метаболитов бактерий, которые представляют собой ансамбли из жирных кислот. Отличительной особенностью поликетидов является их специфический биосинтез, который осуществляется сложноорганизованными ферментами поликетидсинтазами (PKS). Поликети́ды отличаются различной химической структурой и множественностью функций, к ним относятся антибиотики, ингибиторы роста опухолей, статины и многие другие фармацевтические соединения (Caulier et al., 2019). Все поликетиды объединены в семь семейств по их углеродному скелету и химической структуре – полиены, тетрациклины, макролиды и др (Caulier et al., 2019).

Из всех поликетидов полиены обладают наибольшей противогрибковой активностью. Они связываются с эргостеролом в мембране грибковых клеток и вызывая утечку ионов K^+ и Na^+ , ослабляют клетку, что приводит к ее гибели (Празднова и др., 2018).

Типичными представителями поликетидов синтезируемых бактериями группы *B. subtilis* являются макролактин, бациллаен и диффицидин (Caulier et al., 2019). Бациллаен является полиеном и проявляет антимикробную активность против различных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Mycococcus xanthus*,) и грибов (*Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*) (Caulier et al., 2019). Диффицидин относится к полиенам, он оказывает подавляющий эффект на патогенные микроорганизмы, такие как *Erwinia amylovora*, *Clostridium perfringens*, *Xanthomonas oryzae* и *Escherichia coli*. Макролактин является макролидом и проявляет антибактериальную и антифунгальную активности против *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia solanacearum*, *S. aureus*, *Fusarium oxysporum*.

Нерибосомные пептиды (НП) большое разнообразное семейство вторичных метаболитов бактерий, при биосинтезе которых формирование

пептидной связи происходит без участия рибосом. НП проявляют широкий спектр биологических активностей, в это семейство входят антибиотики, сидерофоры, липопептиды, пигменты, иммунодепрессанты и противоопухолевые соединения (Caulier et al., 2019). Нерибосомные пептидсинтазы (НРПС или NRPS) – это мультиэнзимные комплексы, на которых синтезируются нерибосомные пептиды. Нерибосомные пептиды имеют разветвленную или циклическую структуру и содержат в своем составе непротеиногенные аминокислоты, которые могут быть ацилированы, гликозилированы, гидроксильированы или галогенированы. Нарушение циклической структуры приводит к потере биологической активности.

Антибиотики – это разнообразная группа низкомолекулярных органических соединений, замедляющая или подавляющая развитие и рост фитопатогенных грибов и других микроорганизмов (Максимов и др., 2020). Антибиотики вызывают у микроорганизмов нарушение функционирования мембран, влияют на синтез клеточной стенки и синтез белка и ингибируют работу дыхательных ферментов (Максимов и др., 2020). Антибиотики, продуцируемые штаммами *B. subtilis* эффективно подавляют рост различных грамположительных бактерий, включая патогенные для человека. Большинство антибиотиков *Bacillus* spp. активны против фитопатогенных грибов *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryosphaeria ribis*, *Helminthosporium maydis*, *F. oxysporum*, *Phomopsis gossypii*.

Сидерофоры – это пептиды, которые имеют высокое сродство к ионам трехвалентного железа, выделяются многими бактериями для растворения и усвоения биологически-недоступного Fe^{3+} из большинства органических и минеральных комплексов (Lee et al., 2012). Бактериальные сидерофоры классифицированы в 4 группы: гидроксаматы, карбоксилаты, пиовердины и фенолкатехелаты. Основным механизмом действия сидерофоров - это конкуренция за Fe^{3+} между патогенными микроорганизмами и бактерией. Штаммы *B. subtilis* продуцируют сидерофор бациллибактин, который способен ограничивать рост *F. oxysporum* (Caulier et al., 2019).

Липопептиды (ЛП) - поверхностно-активные вещества, обладающие антибиотическими свойствами по отношению ко многим патогенным микроорганизмам (Ongena et al., 2010; Andric et al., 2020) а, кроме того, способные запускать в растениях механизмы системной индуцированной устойчивости. Липопептиды представляют собой низкомолекулярное соединение из пептида с «хвостом» жирной кислоты. Курстакины, сурфактины, фенгицины и итурины – это липопептиды четырех семейств, которые продуцируют бактерии рода *Bacillus*. ЛП сурфактины, фенгицины и итурины синтезируют штаммы группы *B. subtilis*, тогда как курстакины производятся штаммами *B. thuringiensis*. Из трех семейств ЛП *B. subtilis* на сегодняшний день описано 13 сурфактинов, 8 фенгицинов, и 14 итуринов (Caulier et al., 2019; Andric et al., 2020).

К числу важных свойств этих соединений нужно отнести способность снижать коэффициент поверхностного натяжения воды и формировать гели с трудно растворимыми гидрофобными соединениями, повышая их доступность для корней растений, а также образовывать на поверхности корней биопленки (Andric et al., 2020). Все это, с одной стороны, может защищать сами клетки бактерий от различных внешних факторов среды, а с другой, – от патогенов. Обнаружена определенная антибиотическая избирательность ЛП. Так, сурфактины проявляют антивирусную, антимикоплазную и антибактериальную активность, а фенгицины и итурины проявляют антигрибную активность (Ongena et al., 2010). Антагонизм с другими микроорганизмам ЛП проявляют благодаря своей способности разрушать структуру плазматической мембраны. Так фенгицины и итурины образуют поры в мембране, а сурфактины растворяют мембрану (Ongena et al., 2010).

1.2.2 Липопептиды бактерий рода *Bacillus*

В 1949 году среди выделяемых бактерией *Bacillus (Paenibacillus) polymyxa* штамма IAM1213 метаболитов было детально описано соединение - полимиксин, представляющее собой циклический низкомолекулярный пептид с

жирнокислотным компонентом. С тех пор, многие исследователи детально изучают липопептиды, выделяя их и из как клеток, так и культурального фильтрата различных штаммов рода *Bacillus*, а также из других грамотрицательных бактерий, актиномицетов и грибов (Raaijmakers et al., 2010; Andric et al., 2020).

Липопептиды (ЛП) – это небольшие соединения, которые синтезируются различными микроорганизмами в качестве вторичных метаболитов. В своей структуре ЛП содержат гидрофобные цепи жирных кислот и гидрофильные пептиды. Молекулы ЛП содержат 4 - 16 аминокислот в D- или L-конфигурации (Raaijmakers et al., 2010). На основании их химической структуры, ЛП делятся на циклические и линейные. Циклические ЛП содержат циклический компонент, который сформирован гидроксильной группой жирной кислоты или аминокислотой пептидной цепи и карбоксильной группой С-конца пептидной цепи. У линейных ЛП аминокислоты располагаются линейно и соединены друг с другом или с жирной кислотой, гидроксильным остатком или альфа-аминогруппой. ЛП благодаря особенностям своего строения амфифильны и устойчивы к гидролизу протеазами и пептидазами, а также устойчивы к окислению и действию относительно высоких температур (Ongena et al., 2010).

Благодаря своим амфипатическим структурам ЛП обладают множественной биологической активностью, включая антибактериальную, противогрибковую, противовирусную и противоопухолевую активность, и поэтому представляют большой интерес для разработки инструментов для химической, сельскохозяйственной, фармацевтической и пищевой промышленности (Zhao et al., 2017; Miljakovic et al., 2020).

Классификация и структурное разнообразие ЛП. Среди ЛП, продуцируемых родом *Bacillus*, существует значительное структурное разнообразие из-за различий в длине и составе липидного фрагмента, а также в типе, количестве и конфигурации аминокислот в пептидной цепи (Raaijmakers et al., 2010).

ЛП бактерий рода *Bacillus* наиболее широко изучены и представляют собой метаболиты циклической структуры, состоящие из 7–10 аминокислот (включая 2–4 D-аминокислоты) и содержащие бета-гидроксильную жирную кислоту с 13–19 атомами углерода. В зависимости от структуры, циклические ЛП подразделяются на три класса или семейства: 1) сурфактины (эсперин, лихеницин, пумилацидин, сурфактин); 2) итурины (итурин А, микосубтилин и бацилломицины); 3) фенгицины (фенгицин, плипастатин) (рис. 1.1.) (Ongena et al., 2010). Каждое семейство содержит варианты с одинаковой длиной пептида, но с разными остатками в определенных положениях. Более того, каждый вариант может иметь несколько гомологов разной длины и изомерии цепи жирных кислот, что приводит к значительной структурной гетерогенности (Raaijmakers et al., 2010).

Сурфактин был впервые идентифицирован из культуральной среды *B. subtilis* в 1968г. Сурфактин является очень мощным сурфактантом, и типичный сурфактин содержит гептапептид с аминокислотной последовательностью: (L-) Glu- (L-) Leu- (D-) Leu- (L-) Val- (L-) Asp- (D) Leu- (L-) Leu (рис. 1.1).

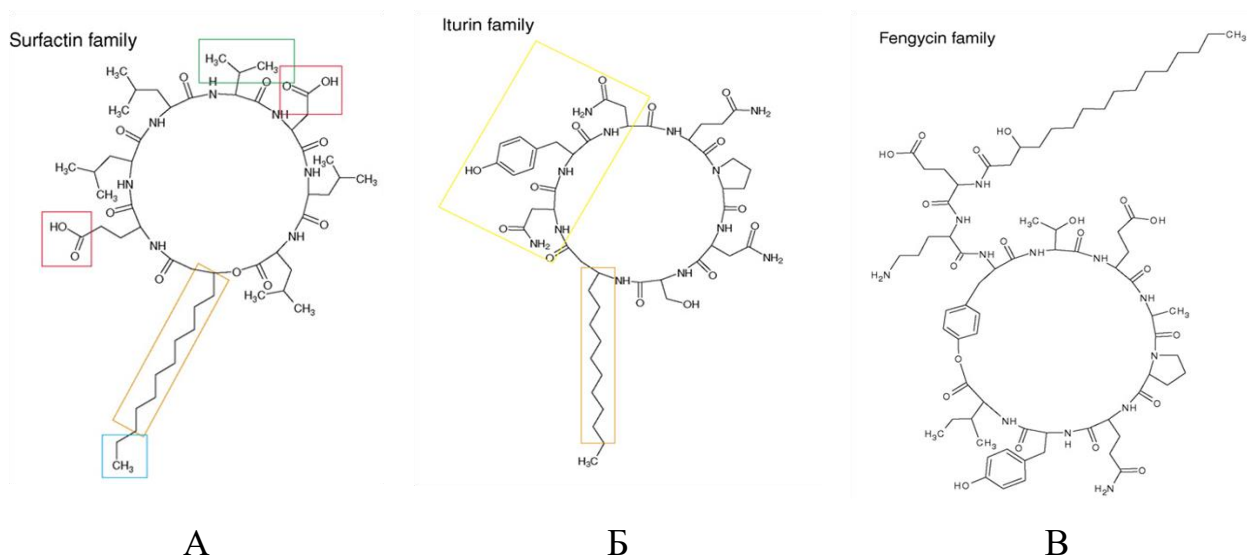


Рисунок 1.1. – Структурное разнообразие липопептидов бактерий рода *Bacillus*: А – семейство сурфактинов; Б – семейство итуринов; В – семейство фенгицинов.

Пептид связан через лактоновую связь с бета-гидрокси жирной кислотой с 13-15 атомами углерода. Семейство сурфактинов включает гептапептидные варианты групп эсперина, лихенизина, пумилацидина и сурфактина. Различные гомологи сурфактина различаются по идентичности аминокислот во втором, четвертом и седьмом местах, по количеству атомов С в цепи жирной кислоты или даже по структурной конформации (Zhao et al., 2017).

Итурин также является циклом липогептапептида. Седьмое положение гептапептида - это Ser (серин), который связан β -аминокислотным остатком цепи жирной кислоты с 14–17 атомами углерода (рис. 1.1.). Аминокислотная последовательность эхептапептида (L-) Asn- (D-) Tyr - (D-) Asn- (L-) Gln-(L-) Pro- (D) Asn- (L-) Ser. Гомологи А, С, D и Е имеют разные цепи жирных кислот (Zhao et al., 2017). В семействе итурина шесть основных вариантов представляют собой итурин А и С, бацилломицин D, F и L и микосубтилин. Если Asn⁷ и Ser⁶ (аспарагин и серин) изменены, этот гомолог итурина называется микосубтилином. Бацилломицин и бациллопептин отличаются аминокислотами в третьей, четвертой и пятой позициях (Zhao et al., 2017).

Фенгицин является другим видом противогрибкового липопептидного комплекса, продуцируемого *Bacillus*. В дополнение к гидроксигирной кислоте с 15 ~ 19 атомами углерода, фенгицин обычно состоит из пептидной цепи (L -) G lu - (D -) O m - (L -) Ty r - (D -) Thr- (L-) Glu- (D-) Ala (Val) - (L-) Pro- (L-) Gln- (D-) Ty r- (L-) - Ile (рис. 1.1). Tyr (тирозин) в положении 3 связан с Ile (изолейцин) в положении 10 с образованием циклического пептида через лактоновую связь. Существует два основных варианта фенгицина, фенгицина А и В, которые отличаются по идентичности аминокислоты в положении 6 (Zhao et al., 2017). У пипастатина Tyr⁹ имеет D-конфигурацию. Эти декапептиды связаны с цепью β -гидроксильной жирной кислоты (C14-C18), которая также может быть в линейной, изо или антеизо форме и которая может быть насыщенной или нет.

Сурфактины и фенгицины представляют собой макролактоновые кольца, но замыкание кольца катализируется между β -гидроксильной жирной кислотой и C-концевым пептидом в случае сурфактина, в то время как в циклазе фенгицина

используется боковая цепь Туг в положении 3 в пептидной последовательности образуют сложноэфирную связь с С-концевым остатком, образуя тем самым внутреннее кольцо, как во многих ЛП *Pseudomonas* (Raaijmakers et al., 2010). Как и в случае сурфактинов, цепь жирных кислот участвует в процессе циклизации итуринов, но благодаря своей б-амино природе амидная связь образуется с С-концевой группой, образуя макролактаманную структуру. Фенгицин и плипастатин отличаются от итурина и сурфактина присутствием таких необычных аминокислот, как орнитин и алло-треонин. Подробные структурные характеристики представительных членов трех семейств были недавно выполнены с помощью двумерного ЯМР и нейтронной рефлектометрии (Raaijmakers et al., 2010).

В дополнение к этим трем основным семействам ЛП были идентифицированы другие ЛП у видов *Bacillus*, включая курстакин из *Bacillus thuringiensis*, 12-АК-содержащие мальтазины из *Bacillus subtilis*, полимиксины из *Bacillus polymyxa* с высоким содержанием диаминомасляной кислоты и сурфактиноподобный бамилоцин А из *Bacillus amyloliquefaciens* (Hagelin et al., 2007; Field et al., 2012).

Биосинтез ЛП и его регуляция у бактерий рода *Bacillus*. К сегодняшнему дню показано, что многие вторичные метаболиты бактерий синтезируются с помощью мультидоменных ферментных мегасинтаз: поликетидсинтаз (PKS, от polyketide synthases), нерибосомных пептидсинтаз (НРПС или NRPS, non ribosomal peptide synthetases) и их гибридных комплексов PKS/NRPS (Ongena, Jacques, 2008).

НРПС состоит из нескольких элементов (доменов) или отдельных белков, они осуществляют отбор аминокислот, нерибосомное образование пептидной связи и последующее освобождение синтезированного пептида. Домены вместе составляют модуль. Каждый модуль обеспечивает встраивание одной аминокислоты в пептид, который синтезируется. НРП-синтазы, состоят из одного или нескольких модулей. Гены НРП-синтаз собраны в оперон в бактериальном геноме. Типичный модуль НРП-синтазы включает 1000 остатков аминокислот,

отвечает за один реакционный цикл и разделен на несколько функциональных доменов. Так, оперон синтеза сурфрактина состоит из 4х генов *srfA*, *srfB*, *srfC*, *srfD*, которые представлены в виде 7 модулей с открытой рамкой считывания (Ongena, Jacques, 2008).

Ферментная сборка ЛП реализуется разными активными центрами НРП-синтазы. Существует несколько стадий сборки окончательной молекулы. 1 - стадия инициации: на А-домене (около 50 кДа) происходит активация аминокислоты и ее удержание на ферменте; 2 - элонгация: на домене конденсации (также около 50 кДа) образуется пептидная связь между двумя активными аминокислотами, в этой стадии также принимают участие и другие домены, осуществляющие модификации аминокислот, например, домен эпимеризации, осуществляет смену изоформ аминокислот, метилтрансферный домен, переносит метильную группу к соответствующей аминокислоте; 3 – стадия терминации, когда активируется работа доменов ТЕ, которые осуществляют тиюэстеразную реакцию (Ongena, Jacques, 2008).

Для разработки систем диагностики штаммов с потенциальной антибиотической активностью имеет смысл использовать один или несколько ключевых генов в опероне каждой синтазы (Ongena, Jacques, 2008). В качестве таких генов для 3 основных классов НРП-синтаз можно предложить: *srfA* (сурфрактины), *ituC* (итурины), *fenC* (фенгицины) (табл.1.1).

Основные механизмы реализации антибиотического эффекта бактерий рода *Bacillus* в общих чертах изучены, однако детальное изучение работы некоторых из них, к примеру, нерибосомальных пептидсинтаз, затруднено широкой вариабельностью синтеза метаболитов и нестрогой генетической детерминацией этого процесса. Впрочем, для предварительного скрининга бактериальных штаммов для возможного использования их при разработке биопрепаратов, можно применить анализ по наиболее консервативным генам оперонов НРП-синтаз, представленным в данном обзоре (табл. 1.1).

Таблица 1.1 Ключевые гены оперонов НРП-синтаз

Метаболит	Свойства метаболита	Оперон	Ген
Сурфактин	Подавляет биопленкообразование, является ПАВ, ингибитор роста грибов.	SrfA-D	srfA
Фенгицин	Подавляет работу стеролов, фосфолипидов, олеиновых кислот.	fenA-E	fenC
Итурин	Фунгицид, разрушающий клеточную стенку.	ituA-D	ituA

Синтез каждого семейства ЛП регулируется факторами окружающей среды, такими как источники углерода, доступность кислорода, pH и температура (Caulier et al., 2019). Высокие температуры ($\geq 37^{\circ}\text{C}$) и анаэробные условия увеличивают выработку сурфактинов, а при более низких температурах ($25\text{--}37^{\circ}\text{C}$) и аэрированных биореакторах синтезируются метаболиты семейств фенгицинов и итуринов (Caulier et al., 2019). Так, например, экспрессия генов сурфактина связана с повышением плотности клеток и происходит, особенно при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста, тогда как биосинтез фенгицинов и итуринов обычно происходит позже в стационарной фазе (Raaijmakers et al., 2006).

Функции ЛП и их применение. Значительное структурное разнообразие ЛП, продуцируемых *Bacillus* и другими бактериальными родами, позволяет предположить, что эти метаболиты выполняют разные природные функции, некоторые из которых могут быть уникальными для биологии продуцирующей бактерии. Тремя основными природными функциями ЛП, описанными на сегодняшний день, являются их роль в антагонизме по отношению к другим микроорганизмам, подвижности бактерий и образовании биопленок (Zhao et al., 2017). Также показано, что ЛП из *Bacillus* функционируют как сигнальные молекулы для скоординированного роста и дифференцировки (Zhao et al., 2017; Miljakovic et al., 2020).

Роль ЛП в антагонизме. ЛП из *Bacillus* проявляют литическую и ингибирующую рост активность против широкого спектра микроорганизмов, включая микоплазмы, бактерии, грибы и оомицеты, а также вирусов.

Антивирусная активность ЛП. Многие липопептиды *B. subtilis* проявляют значительную антивирусную активность к специфическим вирусам. Сурфактин эффективен против нескольких вирусов, включая вирус простого герпеса (HSV-1а HSV-2), вирус везикулярного стоматита, вирус иммунодефицита обезьян и вирус мышинного энцефаломиокардита благодаря физико-химическому взаимодействию с поверхностью вирусной оболочки. Инактивация сурфактином вирусов с оболочкой, особенно вирусов герпеса и ретровирусов, была значительно более эффективной, чем вирусов без оболочки (Zhao et al., 2017). Во время инактивации сурфактин включается в липидный бислой, вызывая полную дезинтеграцию оболочки, которая содержит вирусные белки, участвующие в адсорбции и проникновении вируса (Zhao et al., 2017).

Антибактериальная активность ЛП. Для сурфактина показана антибактериальная активность против *B. cereus* и растительных патогенов *Xanthomonas campestris* и *P. syringae* (Raaijmakers et al., 2006). Итурины и фенгицины менее активны в отношении бактерий (Miljakovic et al., 2020). Бацитрацины представляют собой циклические декапептиды, продуцируемые *B. licheniformis*, *B. subtilis* и *B. sonorensis*, активность которых в первую очередь направлена против грамположительных бактерий (Adimpong et al., 2012). Полимиксины представляют собой циклические декапептиды, продуцируемые *Raenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*), которые ингибируют клетки грамотрицательных бактерий. Грамицидины и тироцидины представляют собой циклические декапептиды, продуцируемые *Bacillus brevis*, активные против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий (Wan et al., 2018).

Антифунгальная активность ЛП. Противогрибковая активность ЛП бактерий рода *Bacillus* представляет особый интерес. ЛП могут проявлять противогрибковую активность при высокой концентрации, чтобы вызвать

формирование пор в клеточной мембране, и при низкой концентрации, чтобы индуцировать апоптоз. ЛПП также могут ингибировать образование клеточной стенки. Кроме того, они могут влиять на адгезию микроорганизмов путем разделения поверхности раздела жидких фаз с различными полярностями и водородной связью (Zhao et al., 2017). Сообщалось об антифунгальной активности для различных ЛПП. Например, фенгицины обладают активностью против *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, а итурины против *Colletotrichum dematiatum* и *Penicillium roqueforti* (Raaijmakers et al., 2006; Miljakovic et al., 2020). Сурфактины проявляли антифунгальный эффект против грибкового рисового патогена *Magnaporthe grisea* и против различных представителей рода *Fusarium* (Miljakovic et al., 2020).

Инсектицидная и афицидная активность ЛПП. В последнее время стали изучать активность ЛПП против различных насекомых. Появляются работы, в которых показана инсектицидная активность ЛПП против отрядов Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera (Максимов и др, 2020; Yang et al., 2017; Rodríguez et al., 2018; Maksimov et al., 2020b; Denoirjean et al., 2021; Lee et al., 2022). Впервые инсектицидные свойства сурфактина были изучены Guo с соавторами (2015), где была показана инсектицидная активность сурфактина против нескольких видов тлей (Hemiptera), но не против капустной моли *Plutella xylostella* (Lepidoptera) или огуречного жука *Diabrotica balteata* (Coleoptera). Позже Yang с соавт. (2017) показали афицидную активность сурфактина из изолята *Bacillus* sp. Y9 в отношении зеленой персиковой тли *Myzus persicae*, а недавно Denoirjean с соавторами (2021) обнаружили инсектицидную активность сурфактина против розовой яблоневого тли *Dysaphis plantaginea*. Недавно в двух работах была показана инсектицидная активность других липопептидов, таких как бациллопептин и плипастатин (семейство фенгицинов) (Rashid et al., 2018, Denoirjean et al., 2021). Из культурального фильтрата бактериального штамма *B. atrophaeus* L193, были выделены различные ЛПП – сурфактины, бацилломицины (семейство итуринов), фенгицин, итурин – эта натуральная смесь ЛПП проявляла

афицидную активность против обыкновенной черемуховой тли *Rhopalosiphum padi* (Rodríguez et al., 2018).

Сигнальная роль ЛП. Большой интерес ученых вызывает элиситорная роль ЛП в запуске защитных сигнальных путей (Cawoy et al., 2014; Rashid et al., 2018, Tunsagool et al., 2019; Miljakovic et al., 2020; Maksimov et al., 2020b). На сегодняшний день накоплено много работ, в которых показана элиситорная роль ЛП в запуске сигнальных путей на различных растениях против широкого спектра патогенов (Chandler et al., 2015; Waewthongrak et al., 2014; Tunsagool et al., 2019; Jiang et al., 2021). Фенгицин и сурфактин вызывали реакцию сверхчувствительности и гибель клеток, индуцировали ЖК/этилен-, АБК- и ауксин-зависимые сигнальные пути, что блокировало рост и развитие патогена на ранней стадии патогенеза (Chandler et al., 2015). Фенгицины индуцировали экспрессию генов фенолпропаноидного пути и этиленовый сигнальный путь (Waewthongrak et al., 2014; Tunsagool et al., 2019), а сурфактины запускали ряд компонентов оксипиноидной сигнальной системы и салицилатный сигнальный путь (Farace et al., 2015). Недавно появилось несколько работ о роли итурина в запуске СИУ против патогенов, где этот ЛП индуцировал этилен- и СК-сигнальные пути, повышал активность липоксигеназы и пероксидазы в цитрусовых и помидорах черри (Waewthongrak et al., 2014; Tunsagool et al., 2019; Jiang et al., 2021).

Однако информация об элиситорной роли ЛП в запуске СИУ в растениях против насекомых-вредителей ограничена одной работой, где эндофит *Bacillus velezensis* YC7010, продуцирующий ЛП бациллопептин индуцировал устойчивость риса против бурой цикадки (ВРН; *Nilaparvata lugens* Stål) через запуск СК- и ЖК-сигнальных путей, отложения лигнина и синтеза вторичных метаболитов (Rashid et al., 2018). Информации об индукции ЛП системной устойчивости в растениях против тлей нет.

Роль ЛП в подвижности бактерий. Движение бактерий на поверхностях тщательно изучено *in vitro*, и выявлено несколько различных форм, в том числе плавание, роение и подергивание (Raaijmakers et al., 2006). При плавании

бактериальные клетки перемещаются индивидуально, тогда, как при роении клетки перемещаются группами и могут дифференцироваться. Вязкость поверхности может регулировать эту клеточную дифференцировку, а биосурфактанты могут изменять вязкость поверхностей, влияя, таким образом, на дифференциацию клеток и их подвижность. В растительной среде, связанной с растениями, биосурфактанты могут выступать в качестве увлажняющих агентов гидрофобной кутикулы листьев, что может способствовать не только подвижности клеток, но и даже солюбилизации (растворение) и диффузии субстратов для роста (Raaijmakers et al., 2006).

Роль ЛП в образовании биопленок. ЛП обладают способностью уменьшать поверхностное и межфазное натяжение биопленок. Кроме того, благодаря различным механизмам ЛП могут в конечном итоге нарушать структуру мембраны. Многие исследователи утверждают, что именно этот основной механизм позволяет осуществлять биологическую активность ЛП. ЛП бактерий *Bacillus* и *Pseudomonas* играют важную роль в прикреплении к поверхности и формировании биопленки, хотя результат может отличаться в зависимости от типа ЛП.

Сурфактин является поверхностно-активным веществом. Сурфактин внедряется в липидный бислой, солюбилизует жидкую фосфолипидную фазу, хелатирует одновалентные и двухвалентные катионы и модифицирует проницаемость мембраны путем образования каналов или солюбилизации мембран с помощью механизма поверхностно-активных веществ (Deleu et al., 2014). Некоторые исследования показывают, что сурфактин может формировать независимые от напряжения каналы в биопленках при разных уровнях проводимости. Эти каналы могут нарушать целостность мембраны и проницаемость ионов в том числе Ca^{2+} и K^{+} , что может вызвать разрушение мембраны (Ines, Dhouha, 2015).

Применение ЛП. Сурфактин и фенгицин действуют как стимуляторы системной резистентности у растений (Zhao et al., 2017). Некоторые из липопептидов *B. subtilis* могут эффективно ингибировать рост микроорганизмов в

пищевых продуктах и могут использоваться в качестве биологических консервантов для сохранения пищевых продуктов. Кормление липопептидами *B. subtilis* поросят-отъемышей способствовало размножению кишечных бактерий, улучшало кишечную микробиологическую среду и улучшало системный иммунитет. Липопептиды также используются в области медицины в качестве противовирусных агентов, противоопухолевых агентов, тромболитических агентов и пероральных адъювантов, в качестве дополнительного компонента вакцины против гепатита В, и при лечении диабета (Zhao et al., 2017).

Помимо быстрого роста, низких требований к питанию, безопасности для людей и животных и высокой антибактериальной активности, *B. subtilis* является одним из наиболее широко используемых микроорганизмов в промышленности для получения активных липопептидов. *B. subtilis* также может выделять различные ферменты и антибиотики и поэтому широко используется в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, медицине и производстве кормов, в нефтяной промышленности, в восстановлении окружающей среды – биоремедиация загрязнённых почв (Fenibo et al., 2019). ЛП из *B. subtilis* используются в других отраслях промышленности, таких как производство стиральных порошков, текстиля, краски, кожи, бумаги, а также в горнодобывающей промышленности, нанотехнологиях, а в последнее время энергосберегающих технологиях (Fenibo et al., 2019).

Множественная активность ЛП стимулировала значительный интерес к использованию этих веществ в качестве антибиотиков, кормовых добавок, противоопухолевых средств, срочных тромболитических терапевтических средств и систем транспортировки лекарственных средств. Понимание естественной функции структурно разнообразных ЛП у бацилл дает представление о регуляторных программах микробов. Однако в настоящее время все еще недостаточно известно о прямых функциях ЛП, и необходимы дальнейшие изучения этого процесса.

1.2.3. Инсектицидные белки *B. thuringiensis*

В 1901 году Ишивата выделил из тутового шелкопряда *Bombyx mori* бактерию и назвал ее *Bacillus sotto*, а в 1915 году в Тюрингии Берлинер выделил эту бактерию из мельничной огневки *Ephestia kuehniella* и назвал ее *Bacillus thuringiensis* (Mendoza-Almanza et al., 2020). *Bacillus thuringiensis* (Bth) — это грамположительные палочковидные спорообразующие бактерии, которые были выделены из самых разнообразных экосистем, включая почву, воду, насекомых, листья лиственных и хвойных деревьев, насекомоядных млекопитающих, а также из тканей человека с выраженным некрозом (Höfte, Whiteley, 1989; Roh et al., 2007; Palma et al., 2014a). Штаммы Bth продуцируют широкий спектр инсектицидных белков, активных против личинок самых разных отрядов насекомых, а также, в некоторых случаях, против видов из других типов. Это привело к тому, что продукты на основе Bth стали самыми продаваемыми биологическими инсектицидами на сегодняшний день (Palma et al., 2014a; Chattopadhyay, Banerjee, 2018; Mendoza-Almanza et al., 2020; Mishra et al., 2022).

Штаммы Bth синтезируют кристаллические (Cry, от Crystal) и цитолитические (Cyt, от cytolytic) токсины (также известные как дельта-эндотоксины) в начале спорообразования и во время стационарной фазы роста в виде параспоральных кристаллических включений (Palma et al., 2014a). После проглатывания насекомыми эти кристаллы растворяются в средней кишке, затем токсины протеолитически активируются протеазами средней кишки и связываются со специфическими рецепторами, расположенными в клеточной мембране насекомых, что приводит к разрушению клеток и гибели насекомых (Palma et al., 2014a). В дополнение к двум основным семействам токсинов, Bth продуцируют другие важные токсины, такие как параспорины, SLP (от Surface layer proteins) белки, Vip (vegetative insecticidal protein) и Sip (secreted insecticidal protein) белки (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Классификация и номенклатура инсектицидных белков. С момента идентификации и клонирования первого гена инсектицидного кристаллического

белка в 1981 г. число генов, кодирующих новые инсектицидные белки, постоянно увеличивалось (Palma et al., 2014a). В последние десятилетия было идентифицировано более 700 последовательностей генов *cry*, которые располагаются в плазидах (Palma et al., 2014a; Mishra et al., 2022). В 1989 г. Hofte и Whiteley была предложена классификация *Bth*-белков в соответствии с их инсектицидной активностью, при этом белки *CryI* были токсичны для чешуекрылых насекомых (Lepidoptera), *CryII* — для чешуекрылых и двукрылых (Diptera), *CryIII* — для жесткокрылых (Coleoptera), а *CryIV* — только для двукрылых. В свое время эта классификация оказалась очень полезной, однако, растущее число новых открытых белков с гомологичными последовательностями, но разной инсектицидной активностью требовало обновления классификации. В 1998 г. была введена новая номенклатура, в которой белки классифицировались исключительно по аминокислотным последовательностям (Crickmore et al., 1998). В этой системе токсину давалось четырехранговое название, в котором первый ранг определял идентичность последовательности не менее 45% (*Cry1*, *Cry2* и т. д.), второй ранг делил первичную группу на подгруппы с идентичностью менее 78% (*Cry1A*, *Cry1B* и т. д.), третий уровень делил белки вторичного ранга на подгруппы, которые имели идентичность последовательности менее 95% (*Cry1Aa*, *Cry1Ab* и т. д.), четвертый уровень использовался для белков того же третичного уровня, которые имели идентичность более 95% (*Cry1Aa1*, *Cry1Aa2* и т. д.) (Palma et al., 2014a; Crickmore et al., 2020). Этот подход оказался неидеальным, но использовался более 20 лет (Crickmore et al., 2020). С распространением методов секвенирования генома и усовершенствованием процедур определения структуры белка было получено большое разнообразие инсектицидных белков из различных бактерий, и появилась потребность в обновлении классификации (Crickmore et al., 2020). Обновленная классификация была предложена Neil Crickmore с соавторами (2020) и была основана на структуре белковой молекулы.

По номенклатуре от 1998 г. *Bth* токсины были классифицированы на *Cry*-белки, которые содержали 78 семейств, *Cyt*-белки с 3 семействами, параспорины состояли из 6 семейств, *Vip* состояли из 4 семейств, а *SLP* и *Sip* содержали по 1

семейству (Palma et al., 2014a; Crickmore et al., 2020). В большой класс Cry-белков входили белки с различной структурой. Самое распространенное семейство Cry-белков это 3d-Cry (от three-domain Cry toxins), имеющее трехдоменную структуру. Также к Cry были отнесены некоторые другие семейства неродственных токсинов, такие как Etx/Mtx2 (от Epsilon toxin/metaxin 2) и Bin (от Binary) токсины или семейство Toxin-10, а также параспорины и неклассифицированные Cry-белки (Chattopadhyay, Banerjee, 2018; Crickmore et al., 2020).

В соответствии с обновленной в 2020 г. номенклатурой Bth токсины переименовали в бактериальные пестицидные белки (BPPs, от bacterial pesticidal proteins), которые разделены на 16 классов (Crickmore et al., 2020). Три из них (Cry, Cyt и Vip3) не изменились по сравнению с предыдущей номенклатурой токсинов Bth. Для Cyt и Vip3 все белки, ранее входившие в эти классы, сохраняют свои существующие названия. Класс Cry теперь включает только белки с 3-доменной структурой. Семейство Etx/Mtx2 переименовано в Mpp (от Mtx2 pesticidal proteins), семейство Bin (Toxin-10) переименовано в Tpp (от Toxin-10 pesticidal proteins), семейство Vip2 переименовано в Vpa (от Vip proteins with ribosyltransferase active), а Vip1 и Vip4 переименованы в Vpb (от Vip proteins related to the binding component of binary toxins) (Crickmore et al., 2020). Класс Xpp будет включать белки, для которых недостаточно информации (Crickmore et al., 2020). В связи с пересмотренной номенклатурой была создана онлайн база данных, доступ к которой можно получить на сайте www.bpprc.org. Интерфейс к базе данных позволяет пользователям просматривать и загружать последовательности, а также сравнивать свои собственные последовательности с общедоступными.

Cry токсины или Cry бактериальные пестицидные белки. Семейство 3d-Cry токсинов представляет самую большую группу из 53 различных подгрупп Cry токсинов (Crickmore et al., 2020). Эти белки формируются в виде параспоровых кристаллических включений во время стационарной фазы роста (Höfte, Whiteley, 1989; Palma et al., 2014a). Белки Cry широко известны своей токсической активностью в отношении насекомых, принадлежащих к таким отрядам, как

Перепончатокрылые, Жесткокрылые, Полужесткокрылые, Прямокрылые, а также нематод, клещей и простейших (Palma et al., 2014a; Mendoza-Almanza et al., 2020). Их токсическая активность в отношении личинок насекомых послужила предпосылкой для составления препаратов для опрыскивания против насекомых и создания трансгенных культур, которые включают Cry-белки или некоторые их активные фрагменты (Mendoza-Almanza et al., 2020). Табак был первой культурой Bth, произведенной компанией «Plant Genetic Systems» в Бельгии в 1985 г. (Fischhoff et al., 1987). С тех пор другие культуры, такие как кукуруза, хлопок, картофель, рис, баклажаны и соя, были генетически модифицированы Bth-токсинами для защиты от насекомых-вредителей (Roh et al., 2007; Mendoza-Almanza et al., 2020). Cry токсины очень специфичны для организмов-мишеней (рис. 1.2.).

Обычно они токсичны только для одного отряда насекомых, но есть исключения как в случае с Cry1Ba, который токсичен для мотыльков, мух и личинок жуков (Zhong et al., 2000). Например, Cry2Aa токсичен для двукрылых-чешуекрылых; Cry1Aa – для чешуекрылых; Cry4Aa и Cry4Ba – для двукрылых; Cry3Aa, Cry3Bb и Cry8Ea – для жесткокрылых, Cry1Ab, Cry1Ba – для жесткокрылых и полужесткокрылых (Palma et al., 2014a; Chattopadhyay, Banerjee, 2018; Mishra et al., 2022).

Рентгеновская кристаллография Cry-белков выявила три структурных домена; следовательно, их второе название 3d-Cry токсины. 3d-Cry содержат две субъединицы: 65 и 130 кДа. Субъединица 130 кДа или прототоксин неактивна, но после удаления С-концевого удлинения за счет протеолитической активности личиночных протеаз средней кишки превращается в активный токсин (Chattopadhyay, Banerjee, 2018). N-концевая область всех генов 3d-Cry кодирует N-концевой фрагмент протоксина, который состоит из 20–60 остатков в зависимости от токсина, и активного токсина, который состоит примерно из 600 аминокислотных остатков.

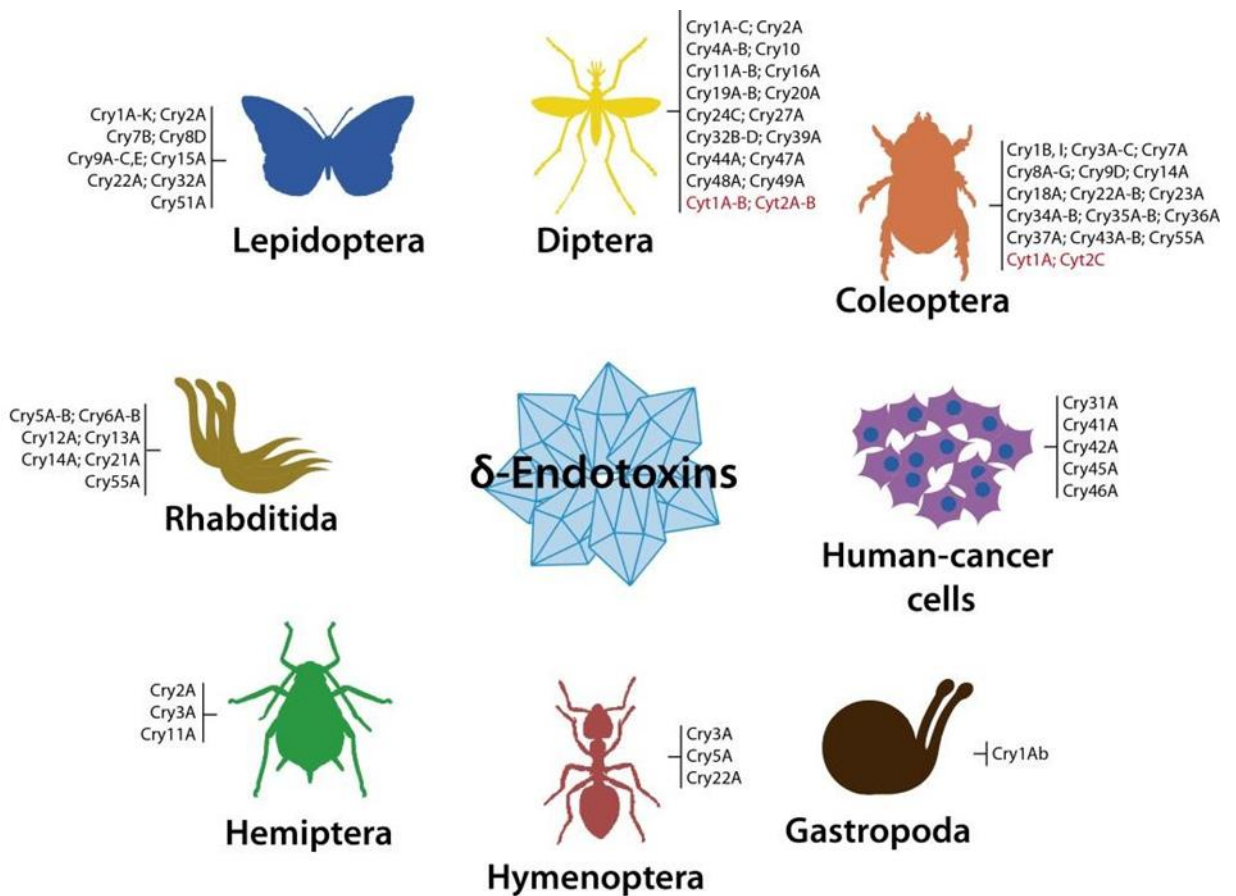


Рисунок 1.2. – спектр Bt-токсинов действующих на различные отряды насекомых и других организмов. Цитотоксины (Cyt) отмечены красным цветом. (Palma et al., 2014a).

Токсины 3d-Cry представляют собой глобулярные молекулы, содержащие три отдельных домена, соединенных одиночными связями (Pardo-Lopez et al., 2013). Домен I или перфорирующий домен, расположенный ближе к N-концу, состоит из кластера семи α -спиралей, который подвергается протеолитическому расщеплению во всех трехдоменных Cry-белках во время активации токсина, что отвечает за вставку токсина в мембрану и порообразование (Palma et al., 2014a). Домен II (центральный или средний домен) играет важную роль во взаимодействиях токсин-рецептор. Наконец, домен III (галактозосвязывающий домен), который протеолитически расщепляется в некоторых трехдоменных Cry-белках и участвует в связывании рецепторов и образовании пор (Palma et al., 2014a; Mendoza-Almanza et al., 2020). Учитывая эти характеристики, белки Cry классифицируются как порообразующие токсины (PFT, от pore-forming toxins).

Механизм действия 3d-Cry токсинов. В настоящее время в научной литературе приняты две модели механизма действия Cry-токсинов. Классический способ действия токсинов это модель последовательного связывания, и альтернативный способ действия токсинов – модель сигнального пути (Chattopadhyay, Banerjee, 2018).

Модель последовательного связывания. Олигомеризация 3d-Cry токсинов и порообразующая активность являются важными этапами этого механизма действия (Pardo-Lopez et al., 2013). При питании насекомых Cry-токсины попадая в кишечник, растворяются с образованием протоксина. Превращение протоксина в активный токсин возможно только благодаря подходящим условиям pH в кишечнике насекомых. Затем активный токсин связывается со своим специфическим рецептором, присутствующим в мембране клеток кишечника при этом происходит его олигомеризация (Pardo-Lopez et al., 2013; Chattopadhyay, Banerjee, 2018). Олигомерные структуры 3d-Cry являются промежуточным продуктом, ответственным за внедрение в мембрану, и способны взаимодействовать с липидным бислоем в отличие от мономерных структур. Связывание олигомера 3d-Cry токсина с белками рецепторов представляет собой высокоаффинное взаимодействие, которое важно для запуска конформационных изменений, необходимых для внедрения токсина в липидные рафты для образования пор, которые в конечном итоге убивают клетки средней кишки (Pardo-Lopez et al., 2013). В течение последних лет были идентифицированы различные типы рецепторов для Cry-токсинов: кадгерин подобный белок (CADR, от cadherin-like protein), рецептор аминопептидазы N (APN, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored aminopeptidase-N), щелочной фосфатазы (ALP, GPI-anchored alkaline phosphatase) и ABC транспортеры (ABCC2, ABCC3) (Gomez et al., 2007; Yudina et al., 2007; Chattopadhyay, Banerjee, 2018).

Первый этап заключается в распознавании рецепторов APN и ALP с образованием слабого связывания с Cry-токсинами, что приводит к обратимой реакции (Liu et al., 2018; Bravo et al., 2004). Второй этап заключается в формировании необратимого связывания путем узнавания 12-аминокислотного

эктодоменного участка с рецептором кадгерин подобным белком (BT-R1) (Liu et al., 2018; Gomez et al., 2007). BT-R1 является высокоспецифичным рецептором токсина Cry1Ab и был впервые идентифицирован в средней кишке гусениц табачного бражника *Manduca sexta*; также он отвечает за олигомеризацию Cry1Ab (Gomez et al., 2007; Mendoza-Almanza et al., 2020). Взаимодействие между токсином Cry1Ab и BT-R1 способствует протеолитическому расщеплению α 1-спирали домена I, что приводит к образованию препоровой олигомерной структуры, повышающей сродство между олигомером и мембранными рецепторами APN и ALP (Gomez et al., 2007). Олигомер, внедренный в клеточную мембрану, создает ионную пору, что приводит к осмотическому нарушению и последующей гибели насекомых (Pardo-Lopez et al., 2013). Домен III является ключевой структурой в стабильности токсина, он связывается с N-ацетилгалактозамином (GalNAc) в рецепторе APN (Bravo et al., 2004). APN был идентифицирован как связывающий рецептор для токсинов Cry1A у гусениц табачного бражника *M. sexta*, непарного шелкопряда *Lymantria dispar* и тутового шелкопряда *B. mori* (Bravo et al., 2004). Белки ABC помогают Cry1A токсинам связаться с рецепторами и встроить олигомеры в клеточную мембрану (Ocelotl et al., 2017-68; Mendoza-Almanza et al., 2020).

Модель сигнального пути. В соответствии с этой моделью Cry-токсины связываются с рецептором кадгерина, который активирует магний-зависимый аденилатциклазный/протеинкиназный сигнальный каскад, приводящий к гибели клеток (Mendoza-Almanza et al., 2020). Эти события запускают каскад, который приводит к образованию ионного канала на мембране, дестабилизации цитоскелета и запрограммированной гибели клеток (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Семейство Etx/Mtx2 токсинов, Mpp по новой номенклатуре. Ранее Etx/Mtx2 токсины относились к нетрехдоменным Cry-токсинам, сейчас выделены в отдельное семейство Mpp (Crickmore et al., 2020). Etx/Mtx2 токсины, такие как Cry15, Cry33, Cry60 и т. д., имеют значительную структурную гомологию и очень похожи на токсин аэролизин (Chattopadhyay, Banerjee, 2018). Структурная группа

белков Etx/Mtx2 (Mpp) принадлежит к классу β -порообразователей с головной и хвостовой областями. Головная область этих белков имеет разнообразную последовательность и структуру и, вероятно, участвует в связывании с рецептором и специфичности в отношении видов-мишеней (Moar et al., 2017). Структурно консервативная хвостовая часть, состоящая из длинных бета-цепей, участвует в олигомеризации и образовании пор (Moar et al., 2017). Механизм действия Etx/Mtx2 (Mpp) сходен с механизмом действия 3d-Cry-токсинов.

Семейство Vin (Toxin-10) токсинов, Trp по новой номенклатуре. Ранее Vin (Toxin-10) токсины относились к нетрехдоменным Cry-токсинам, сейчас выделены в отдельное семейство Trp (Crickmore et al., 2020). Большинство Vin токсинов, таких как Cry35 и Cry36, обладают высокой антагонистической активностью в отношении различных жесткокрылых насекомых (рис. 1.2.) (Palma et al., 2014a; Chattopadhyay, Banerjee, 2018) и по последним данным – к полужесткокрылым насекомым (Mishra et al., 2022). Структурная топология Trp токсинов очень похожа на топологию Etx/Mtx2, поскольку они обладают аэролизин-подобной складкой (Chattopadhyay, Banerjee, 2018). Пестицидные белки Trp, как и Mpp, имеют головную и хвостовую области, но в отличие от Mpp белков, головная область белков Trp содержит домен бета-трилистника (бета-трилистник рицинового типа), в котором расположена область связывания рецепторов (Lacomel et al., 2021). Кроме того, хвостовые области белков Trp состоят из домена Toxin-10. Домен бета-трилистника в пестицидных белках может взаимодействовать с гликопротеинами или гликолипидами, облегчая связывание с рецептором, или может функционировать на других стадиях механизма действия токсинов (Berry, Crickmore, 2017). Точную функцию домена бета-трилистника в механизме действия Trp еще предстоит определить.

Cyt токсины или Cyt бактериальные пестицидные белки. Cyt (цитотоксические) белки, кодируемые генами *cyt*, составляют другое большое семейство инсектицидных белков Bth (Palma et al., 2014a). В отличие от белков Cry, белки Cyt обладают общей цитолитической (гемолитической) активностью *in vitro* и токсичны преимущественно для насекомых отряда Двукрылые (рис. 1.2.).

Кроме того, Cyt-токсины имеют другие мишени, такие как, клетки млекопитающих и эритроциты, гороховая тля (*Acyrtosiphon pisum*) и некоторые виды широконосых долгоносиков *Diaprepes* spp. (Mendoza-Almanza et al., 2020). К настоящему времени описано три подсемейства Cyt-токсинов, все они имеют высокий уровень идентичности последовательностей: Cyt1, Cyt2, и Cyt3Aa1 (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Трехмерные структуры Cyt1Aa и Cyt2Ba показывают, что эти белки представляют собой однодоменные трехслойные α - β белки (Palma et al., 2014a). Размер Cyt-белка составляет примерно 25 – 28 кДа. Превращение неактивного протоксина Cyt1Aa (27 кДа) в активный токсин (24 кДа) достигается за счет протеолитического расщепления на N- и C-концах, что важно для прикрепления к мембране. В трехслойном α - β домене находится уникальная складка, которая позволяет слоям α -спирали отодвигаться и проталкивать β -слой в мембрану хозяина, от конформационной геометрии складки зависит связывание токсина с мембраной (Chattopadhyay, Banerjee, 2018). Общеизвестно, что петли спиралей участвуют в мембранно-клеточных взаимодействиях и межмолекулярной сборке (Mendoza-Almanza et al., 2020). Однако механизм действия Cyt-токсинов до сих пор не ясен; кроме того, неизвестно, существуют ли специфические рецепторы, через которые Cyt-токсины узнают свои клетки-мишени. Тем не менее, в настоящее время существуют две основные модели механизма действия Cyt-токсинов: один предполагает модель порообразования, тогда как другой поддерживает менее специфический механизм действия детергента (Palma et al., 2014a; Mendoza-Almanza et al., 2020).

Модель порообразования описывает непосредственное связывание Cyt-токсинов с насыщенными липидами мембран, такими как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин. После взаимодействия с липидами Cyt-токсины претерпевают конформационные изменения и собираются в открытую зонтичную структуру, что приводит к образованию пор и последующей проницаемости мембраны и гибели личинки (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Модель эффекта детергента предполагает, что Сут-токсины разрушают клетки-мишени за счет эффекта растворения их мембраны. В этой модели Сут-токсины концентрируются на поверхности клеточной мембраны и разрушают липидный бислой подобно детергенту (Mendoza-Almanza et al., 2020).

И модель порообразования, и модель эффекта детергента не исключают друг друга, поскольку считается, что в зависимости от концентрации токсина один или оба механизма могут действовать на восприимчивые клетки. Олигомеризация Сут и образование пор могли происходить при низкой концентрации Сут, тогда как детергентный эффект мог быть вызван только при высокой концентрации токсина (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Секретируемые токсины – Vip. Во время фазы вегетативного роста некоторые штаммы Bth продуцируют белки, которые секретируются в среду, они также обладают инсектицидными свойствами против ряда отрядов насекомых (Palma et al., 2014a). Секретируемые инсектицидные белки класса Vip (vegetative insecticidal protein) были обозначены как вегетативные инсектицидные белки (Palma et al., 2014a). По классификации от 1998 г. белки Vip были разделены на четыре различных семейства, а именно Vip1, Vip2, Vip3 и Vip4. Согласно обновленной классификации от 2020 г. семейство Vip2 переименовано в Vpa (от Vip proteins with ribosyltransferase active), а Vip1 и Vip4 переименованы в Vpb (от Vip proteins related to the binding component of binary toxins) (Crickmore et al., 2020).

Vip1 и Vip4 (Vpb) это бинарные токсины. Vip1 синтезируется в виде протоксина 100 кДа и после секреции созревает зрелый токсин массой 80 кДа (Mendoza-Almanza et al., 2020). Vip4 на 34% идентичен белку Vip1Aa1. Эти токсины активны против некоторых жесткокрылых вредителей и полужесткокрылых (Hemiptera), например против бахчевой тли *Aphis gossypii* (Sattar, Maiti, 2011). Механизм действия еще изучен не до конца, но известно, что Vip1 образует гептамер при связывании с рецептором на мембране (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Vip2 (Vpa) подобен по структуре и поведению токсину CdtA из *Clostridium difficile*, этот токсин проявляет активность АДФ-рибозилтрансферазы, и его основной мишенью является белок актин, следовательно, он может вызывать разрушение цитоскелета и гибель клеток при активации (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Vip3 представляет собой одноцепочечный белок, который токсичен для широкого круга чешуекрылых и других насекомых, например различных совков *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua* и *S. frugiperda*, менее восприимчивых к токсинам Cry1A (Palma et al., 2014a; Sahin et al., 2018). Vip3 это белки с молекулярной массой 88 кДа, не имеющие гомологии ни с одними другими известными инсектицидными белками (Bel et al., 2017). В отличие от Vip1 и Vip2, последовательности сигнальных пептидов в Vip3 не процессируются во время секреции и присутствуют в зрелом секретируемом пептиде, что позволяет предположить, что они играют важную роль в структуре белка и инсектицидной активности. Однако расщепление N-конца активирует протоксин; активный токсин массой 66 кДа отделяется от N-концевой части массой 22 кДа (Sahin et al., 2018). Механизм действия до сих пор не ясен, и было высказано предположение, что белки Vip3 действуют аналогично порообразующим токсинам (PFT), но их мембранные рецепторы до сих пор неизвестны. Эксперименты *in vitro* показали, что Vip3 не конкурирует за сайты связывания Cry1A ни у *M. sexta*, ни у *S. frugiperda* (Mendoza-Almanza et al., 2020).

В настоящее время известно 15 белков Vip1, 20 белков Vip2, 101 белок Vip3 и 1 белок Vip4 (Crickmore et al., 2020).

Активность бактериальных пестицидных белков против насекомых отряда Hemiptera. Vth-токсины или бактериальные пестицидные белки (БПБ) проявляют меньшую полевую эффективность против сельскохозяйственных вредителей из отряда Hemiptera, чем против вредителей из других отрядов. Факторы, ограничивающие высокую эффективность токсинов против Hemiptera, связывают с особенностями питания и строения кишечника насекомых (Mishra et al., 2022). В них включают: 1) питание соком флоэмы или ксилемы, где

обнаруживают низкую концентрацию Cry и Cyt токсинов; 2) субоптимальная среда в кишечнике полужесткокрылых для активации, процессинга и/или связывания токсинов (рН кишечника у тлей является кислым, а у чешуекрылых – щелочным; также на активность токсинов влияют количество и тип протеолитических ферментов: у тлей в кишечнике присутствуют цистеиновые протеазы, а у чешуекрылых – сериновые протеазы (трипсин и химотрипсин)); 3) особенности строения кишечника, включая наличие фильтрующей камеры и отсутствие перитрофической мембраны (Mishra et al., 2022). При этом было идентифицировано относительно небольшое количество БПБ с токсичностью против Hemiptera. Сообщается, что в общей сложности 24 БПБ, полученных из Bth, обладают активностью против Hemiptera по сравнению с 44 белками, которые эффективны против жесткокрылых (Mishra et al., 2022). Активные против Hemiptera Bth-токсины, принадлежат к разным структурным классам: Cry, Cyt, Mpp, Trp и Vip3 (Mishra et al., 2022). Например, против гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* были токсичны Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa, CytA, CytB и CytC (Porcar et al., 2009; Li et al., 2011; Loth et al., 2015). Против азиатской цитрусовой листоблошки *Diaphorina citri* проявляли токсичность Cry1Ab и Cry1Ba (Fernandez-Luna et al., 2019). Токсины Cry1Ab и Cry1Ac кроме активности по отношению к гороховой тле проявляли токсичность к бурой рисовой цикадке *Nilaparvata lugens* (Shao et al. 2018). А белки Cry2Aa и Cry3Aa были токсичны к картофельной тле *Macrosiphum euphorbiae* (Li et al., 2011). По отношению к персиковой тле *M. persicae* проявляли токсичность классический 3d-Cry токсин Cry1Cb2 и белок Cry73Ba1 (Cry32Wa1) родственный параспоринам, имеющим противораковую активность (Palma et al., 2014b; Torres-Quintero et al., 2022). По отношению к западному клопу-слепняку *Lygus hesperus* была показана активность белка Mpp51Aa2(Cry51Aa2) (Baum et al., 2012). Белок Mpp83Aa1 проявлял токсичность против зеленого овощного клопа *Nezara viridula* (Banerjee et al., 2022). А против различных цикадок токсическую активность проявляли белки из классов Mpp и Trp. Так Mpp64Ba/Mpp64Ca (Cry64Ba/Cry64Ca) проявили токсичность против цикадки белоспинной *Sogatella furcifera* и темной цикадки

Laodelphax striatellus (Liu et al., 2018). Токсин Trp78Aa1(Cry78Aa1) проявлял активность против бурой рисовой цикадки *N. lugens* и против тёмной цикадки *L. striatellus* (Wang et al., 2018; Cao et al., 2020).

Белки классов Cry и Cyt проявляют меньшую афицидную активность, чем белки классов Mpp и Trp (Mishra et al., 2022). Однако с помощью биоинженерных манипуляций можно повысить токсичность Cry и Cyt белков и такие примеры есть в литературе. Белки Cry3A, Cry4A и Cry11A были предварительно активированы трипсином, что повышало их активность против гороховой тли *A. pisum* (Porcar et al., 2009). Добавление пептида в определенных участках Cyt2Aa, связывающегося с кишечником насекомого, эффективно повышало токсичность этого гибридного белка против гороховой тли *A. pisum* (Chougule et al., 2013). Аналогичная стратегия была применена для молекулярной модификации Cry1Ab, направленной на изменение его токсичности против бурой рисовой цикадки *N. lugens* (Shao et al., 2016). Однако белки Mpp или по старой классификации члены β -порообразующей группы в семействе Etx/Mtx2 обладают достаточной активностью против полужесткокрылых вредителей для практического использования (Baum et al., 2012; Gowda et al., 2016; Liu et al., 2018; Banerjee et al., 2022).

Еще одной стратегией повышения афицидной активности Bth-токсинов является увеличение концентрации токсинов во флоэме (Palma et al., 2014b). Этого можно добиться двумя способами: разработкой генетически модифицированных культур, экспрессирующих афицидные Bth-токсины; поиском новых эндофитных штаммов *B. thuringiensis*, экспрессирующих афицидные Bth-токсины. Например, в 2008 г. успешно сконструировали трансгенное растение пшеницы, которое стабильно экспрессировало белок Cry1Ac под контролем промотора CaMV35S (промотор 35S вируса мозаики цветной капусты), что придавало устойчивость таким растениям к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* и восточной луговой совке *Mythimna separata*, вызывая значительное снижение выживаемости, развития и плодовитости у обоих видов (Yu, Wei, 2008). Более того, Баум и соавт. (2012) получили трансгенное растение хлопчатника,

экспрессирующее белок Cry51Aa2, также контролируемый промотором CaMV35S, который отрицательно влиял на выживание и развитие западного клопа-слепняка *L. hesperus* (Baum et al., 2012). Также был проведен поиск эндофитных штаммов *B. thuringiensis* и показана их афицидная активность против обыкновенной злаковой тли *S. graminum* (Веселова и др., 2019). Кроме того, встраивание белка Cry1Ia из штамма *B. thuringiensis* B-5351 в геном эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д увеличивало его афицидную активность против обыкновенной злаковой тли *S. graminum* (Maksimov et al., 2020).

Кроме того, выдвигается гипотеза о существовании гораздо большего количества Bth-токсинов активных против отряда Hemiptera, чем известно на сегодняшний день (Palma et al., 2014b; Mishra et al., 2022). В популяции штаммов *B. thuringiensis* часто обнаруживают Bth-токсины с неизвестной биологической активностью, которые составляют более 90% штаммов этой бактерии в естественных условиях, такие штаммы обычно называют неинсектицидными из-за отсутствия у них токсичности к чешуекрылым, двукрылым и жесткокрылым (Palma et al., 2014b). Однако недавно было показано, что белки Cry64Ba/Cry64Ca не проявляли токсичности в отношении чешуекрылых (кукурузного мотылька *Ostrinia furnacalis* и капустной моли *Plutella xylostella*) или жесткокрылых (жука-листоеда *Colaphellus bowringi*), но обладали самой высокой, о которой до сих пор сообщалось, токсичностью против полужесткокрылых вредителей цикадки белоспинной *Sogatella furcifera* и темной цикадки *Laodelphax striatellus* (Liu et al., 2018).

Полужесткокрылые вредители, несомненно, являются одной из наиболее серьезных угроз сельскохозяйственному производству, вызывая убытки как в результате повреждения, связанного с кормлением, так и в результате передачи патогенов растений (Mishra et al., 2022). Применение Bth-токсинов против вредителей отряда Hemiptera является очень перспективным, так как предлагает экологически чистую альтернативу использованию потенциально вредных химических инсектицидов. Возникающие трудности в применении этих токсинов против полужесткокрылых можно преодолеть с помощью биотехнологических

ПОДХОДОВ, ПОИСКА НОВЫХ ШТАММОВ И ТОКСИНОВ С НОВЫМИ АКТИВНОСТЯМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ИНСТРУМЕНТОВ БИОИНФОРМАТИКИ.

1.3 Стимулирующие рост растений бактерии и их роль в защите растений от насекомых

Результаты исследований микробиома растений показали, что растения тесно связаны с многочисленными полезными микроорганизмами (Oukala et al., 2021). Микроорганизмы, входящие в филлосферу, эндосферу и ризосферу составляют микробиом растения и привлекают огромное внимание ученых из-за их роли в жизни растений (Santoyo, 2022). Полезный микробиом или стимулирующие рост растений микроорганизмы (СРРМ) не только усиливают рост растений за счет улучшения доступности питательных веществ, но обеспечивают устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам (Santoyo, 2022). Особое место среди полезного микробиома растений занимают эндофитные микроорганизмы, к которым относятся бактерии и грибы, способные колонизировать растения и жить во внутренних частях растения, включая корень, стебель, лист, цветы и семена, не нанося при этом видимого ущерба растению-хозяину (Oukala et al., 2021; Santoyo, 2022). В настоящее время большая часть исследований эндофитных бактерий была проведена путем установления параллелизма между их действием и действием СРР бактерий (СРРБ), присутствующих в ризосфере. Однако отличия ризосферы или филлосферы от среды внутренних тканей растений (эндосферы) очевидны и создают благоприятные и более выгодные условия для эндофитов, и тем привлекают внимание ученых (Oukala et al., 2021).

Взаимодействие растений и эндофитов изучаются уже много лет, однако механизмы, используемые эндофитными бактериями для смягчения негативного воздействия различных факторов окружающей среды на растения, остаются неясными (Oukala et al., 2021). СРРБ, в том числе эндофиты, значительно

улучшают качество почвы, рост растений и сельскохозяйственную продукцию, благотворно влияют на питание растений и оказывают негативное влияние на патогенов и вредителей (Oukala et al., 2021; Ranjith et al., 2022; Khoshru et al., 2023). Бактериальные эндофиты улучшают рост сельскохозяйственных культур за счет повышения доступности питательных веществ (азот, фосфор, калий, сера, цинк и железо), обеспечения гормонами роста растений (ауксины, цитокинины, гиббериллины и др.), за счет чего косвенно обеспечивают растениям толерантность к биотическим и абиотическим стрессовым факторам (Egorshina et al., 2011; Kudoyarova et al., 2019; Miljakovic et al., 2020; Eid et al., 2021; Chaudhary et al., 2022). Способности бактериальных эндофитов защищать растения от патогенов реализуются за счет прямых механизмов, таких как высвобождение противомикробных соединений, таких как сидерофоры, антибиотики, гидролитические ферменты и другие вторичные метаболиты, и косвенных механизмов, связанных с конкуренцией с патогенами за пространство и питательные вещества и их способность модулировать защитные реакции растений (Oukala et al., 2021; Santoyo, 2022).

СРРБ, в том числе эндофиты, могут индуцировать защитные механизмы у растений против патогенов и вредителей, приводящие к укреплению клеточных стенок, синтезу фитоалексинов, различных ферментов и защитных белков (Oukala et al., 2021; Khoshru et al., 2023). Эти механизмы были названы – системная индуцированная устойчивость (СИУ) (Khoshru et al., 2023). До введения понятия СИУ способность СРРБ контролировать патогены и вредителей растений в основном объяснялась производством метаболитов с антибиотической активностью, конкуренцией за питательные вещества и железо, синтезом литических ферментов, т.е. за счет прямых механизмов (Khoshru et al., 2023). Существование СИУ опосредованной СРРБ было впервые описано в 1991 г. в работах трех независимых исследовательских групп, в которых была показана индукция устойчивости растений фасоли, инокулированных штаммом *Pseudomonas fluorescens* S97, к *P. syringae* pv. *phaseolicola*, растений гвоздики, инокулированных штаммом *P. fluorescens* WCS417, к *Fusarium oxysporum* f. sp.

dianthi, растений огурца к антракнозу, вызываемому *Colletotrichum orbiculare*, инокулированных шестью различными штаммами ризобактерий (Alstrom, 1991; Van Peer et al., 1991; Wei et al., 1991). В дальнейшем было показано, что СИУ эффективна против оомицетов, грибов, бактерий и вирусов (Pieterse et al., 2014; Oukala et al., 2021; Khoshru et al., 2023), и даже насекомых (Van Oosten et al., 2008; Pineda et al., 2010; Pangesti et al., 2013; Rashid, Chung, 2017; Lee et al., 2022). Одной из первых работ, описывающих СИУ против насекомых-вредителей, была работа Zehnder с соав. (1997), в которой показана индукция ризобактериями устойчивости растений огурца к огуречному жуку (Coleoptera: Chrysomelidae) (Zehnder et al., 1997). Работы Herman с соавт. (2008) и Valenzuela-Soto с соавт. (2010) были одни из первых, которые описывали индукцию бактериями *Bacillus* spp. устойчивости растений к вредителям из отряда Hemiptera персиковой тле *Myzus persicae* и белокрылке *Bemisia tabaci* (Herman et al., 2008; Valenzuela-Soto et al., 2010).

В настоящее время в литературе СИУ опосредованная бактериями определяется как – прайминг (Khoshru et al., 2023). Прайминг-защита — это стратегия, позволяющая увеличить и усилить защиту растений, проявить более быструю защитную реакцию при нападении вредного организма и продлить эту реакцию на весь вегетационный период и даже передать по наследству (Conrath et al., 2015).

1.3.1 Прямые механизмы защиты

Эндифиты могут использовать несколько стратегий для ослабления негативного воздействия вредителей на своего хозяина (Oukala et al., 2021). Эти действия могут быть достигнуты путем прямого ингибирования роста, развития и размножения вредителя. Прямое ингибирование вредителей в основном опосредуется различными метаболитами, включая инсектицидные белки, антибиотики, ферменты, разрушающие клеточную стенку, летучие органические

соединения (ЛОС), алкалоиды, стероиды, хинины, терпеноиды, фенолы и флавоноиды (Lee et al., 2022).

Наиболее известны пептидные токсины, которые участвуют в борьбе с насекомыми и нематодами. Действительно, наиболее коммерчески значимыми являются токсины, продуцируемые *Bacillus thuringiensis*, под общим названием Bth-токсины (Mishra et al., 2022). Насекомые-вредители, питающиеся флоэмным соком (тли, белокрылки и цикадки), показали среднюю восприимчивость к некоторым Cry-белкам с самыми низкими средними летальными концентрациями (LC 50) в диапазоне от 70 до 100 мкг/мл для Cry4Aa, 500 мкг/мл для Cry3A и Cry11Aa против гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* (Porcar et al., 2009). Белки Cry41Aa1 и Cry41Ab1 проявляли токсическую активность против персиковой тли *Myzus persica* с самой низкой средней летальной концентрацией (LC 50) 32.7 мкг/мл (Palma et al., 2014).

Также группа ЛП воздействует на мембранные структуры кишечника насекомых за счет своих поверхностно-активных свойств (Rashid et al., 2018; Denoirjean et al., 2021). Например, ЛП из *B. thuringiensis* CMB26 обладал инсектицидной активностью в отношении личинок белянки репной *Pieris rapae* (Kim et al., 2004). ЛП из *B. amyloliquefaciens* AG1 имел LC50 180 нг/см² против личинок минера *Tuta absoluta*, воздействуя на мембраны клеток средней кишки личинок (Khedher et al., 2015). ЛП сурфактин из *B. subtilis* Y9 проявлял афицидную активность против персиковой тли *M. persicae* при 20 rpm (Yang et al., 2017). Аналогично, активные липопептиды из *B. atrophaeus* L193 вызывали разрушение кутикулы обыкновенной черемуховой тли *Rhopalosiphum padi*, причем уже через 24 часа после обработки гибель насекомых достигала 60% (Rodríguez et al., 2018). Молодых имаго розовой яблоневого тли *Dysaphis plantaginea* подвергли местным обработкам тремя различными ЛП, плипастатином (семейство фенгицина), микосубтилином (семейство итурина) и сурфактином либо по отдельности, либо в виде тройной смеси в разных концентрациях от 1 до 5 г/л (Denoirjean et al., 2021). Интересно, что ЛП демонстрировали противоположные эффекты, варьирующие от отсутствия

афицидной активности для микосубтилина до гибели, вызываемой даже при низких концентрациях сурфактином (Denoirjean et al., 2021).

Фенольные смолы, такие как феназиновая группа, могут вызывать окислительный стресс в мишени, что приводит к гибели клеток, а некоторые из них могут действовать как хелаторы железа (Lee et al., 2022). Гидролитические ферменты хитиназы, протеазы и липазы могут повреждать клеточные структуры. Комбинированная активность протеаз и липаз может нарушать структуру мембран. Хитиназы могут гидролизовать полимеры клеточных стенок насекомых, оболочки яиц нематод и грибов (Singh, Arya, 2019). Кутикула насекомого состоит в основном из хитиновых нановолокон, встроенных в матрицу белков, полифенолов и воды с небольшим количеством липидов. Хитин также является обычным компонентом экзоскелетов насекомых, которые поддерживают эпидермальные кутикулы и перитрофические матрицы, выстилающие эпителий кишечника (Rodríguez et al., 2018). У штамма *B. atrophaeus* L193 было продемонстрировано синергетическое действие протеаз и хитиназ на механизм деградации кутикулы черемуховой тли, кроме того штамм продуцировал глюкозидазы и протеазы, что подтверждало инсектицидный потенциал этих ферментов (Rodríguez et al., 2018). Хитиназа *B. subtilis* РТВ185 являлась основным фактором борьбы с тлями *Aulacorthum solani* и *Aphis gossypii* (Kahia et al., 2021).

1.3.2 Косвенные механизмы защиты

Было предложено два типа индуцированной защиты, СИУ и СПУ (системно приобретенная устойчивость), в зависимости от задействованного гормона и типа возбудителя (Oukala et al., 2021). Соответственно, СИУ инициируется СРРБ или другими непатогенными микроорганизмами, тогда как СПУ индуцируется патогенами или химическими соединениями (Pieterse et al., 2014). Путь передачи сигнала СИУ регулируется путем ЖК/этилен и связан с экспрессией гена PDF1.2 (от defensin 1.2), тогда как СПУ контролируется СК-зависимым сигнальным путем и характеризуется экспрессией генов, кодирующих белки, связанные с

патогенезом (PR) (Pieterse et al., 2014; Oukala et al., 2021). Более поздние исследования показали, что СИУ, запускаемая эндофитами и другими штаммами ризобактерий, может зависеть от СК и зависеть или не зависеть от ЖК/этилен-путей (Oukala et al., 2021). ЖК, СК и этилен являются растительными гормонами, играющими центральную роль в координации защитных путей у растений. Другие фитогормоны, такие как ауксины, ЦК, АБК и ГК, также могут модулировать сигнальные пути во время взаимодействия между растениями и биотическими факторами, патогенами и насекомыми (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Pieterse et al., 2014; Rashid, Chrung, 2017). Следовательно, взаимодействия растений и микробов и растений и насекомых связаны молекулярными путями.

Индукция гормональных сигнальных путей зависит от пищевого поведения насекомых (Pineda et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017). Сигнальные пути СК, ЖК и этилена могут по-разному регулировать защитные реакции против определенных типов насекомых (Van Oosten et al., 2008). ЖК-опосредованная защита активируется против насекомых с грызущим ротовым аппаратом (Van Oosten et al., 2008; Pineda et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017). Колонизация корней растений арабидопсиса ризобактериями *P. simiae* WCS417г вызывала более высокую экспрессию ЖК/этилен-зависимой ORA59-ветви, чем ЖК-зависимой ветви MYC2, и запускала СИУ против листогрызущего насекомого капустной совки *Mamestra brassicae* (Pangesti et al., 2016). Смесь из нескольких штаммов *Bacillus pumilis* и *Bacillus amyloliquefaciens* индуцировала у растений хлопчатника повышение содержания ЖК и экспрессию ЖК-зависимых генов *AOS*, *LOX1* и *PR3*, что приводило к развитию устойчивости к гусеницам малой совки *Spodoptera exigua* (Zebelo et al., 2016).

СК-опосредованная защита активируется против насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом (Van Oosten et al., 2008; Pineda et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017). Используя различные механизмы, *B. subtilis* ВЕВ-DN индуцировал устойчивость против табачной белокрылки *Bemisia tabaci* питающейся флоэмным соком на растениях томатов, посредством повышения экспрессии как ЖК-независимых генов (включая гены фотосинтеза, гены биосинтеза

фенилпропаноидного и терпеноидного путей), так и ЖК-зависимых генов, включая гены, кодирующие протеазы и ингибиторы протеиназ (Valenzuela-Soto et al., 2010). Пинеда и др. (2012) сообщили, что корни арабидопсиса, колонизированные *P. fluorescens* WCS417r, обладали повышенной восприимчивостью к персиковой тле *M. persicae*, хотя обработанные растения демонстрировали более сильную экспрессию ЖК-зависимых генов *LOX2* и *PDF1.2* во время питания насекомых (Pineda et al., 2012). Rashid, Chrung, 2017 Фактор транскрипции WRKY22 индуцируется тлями и повышает восприимчивость растений к персиковой тле *M. persicae* по механизму, локализованному в мезофилле. Анализ секвенирования мРНК зараженных тлей нокаутных растений *wrky22* выявил активацию генов, участвующих в передаче сигналов СК и подавление генов ЖК-пути, что приводило к повышению устойчивости растений к насекомому (Kloth et al., 2016). Обработка растений бобов штаммом *B. amyloliquefaciens* FZB42 снижала размножение гороховой тли *A. pisum* и повышала содержание как СК, так и ЖК в растениях, в этом исследовании фитогормоны СК и ЖК не показали признаков отрицательного перекрестного влияния (Serteyn et al., 2020). В другом исследовании с помощью высокопроизводительного транскриптомного анализа было показано, что системная устойчивость к бурой рисовой цикадке *Nilaparvata lugens* была индуцирована *B. velezensis* YC7010 посредством запуска как СК, так и ЖК путей (Rashid et al., 2018).

Защитные ответы, индуцированные бактериальными эндофитами, включают различные стратегии защиты и используют различные механизмы, которые могут включать накопление защитных PR-белков, различных ферментов, влияние на редокс-метаболизм и генерацию АФК, а также синтез вторичных метаболитов (Oukala et al., 2021).

Влияние СРРБ на генерацию АФК и про-/антиоксидантные ферменты. СИУ, опосредованная бактериями и развивающаяся при атаке насекомыми, включает реакции гиперчувствительности, повышенную активность внеклеточных пероксидаз, отложение каллозы и накопление H_2O_2 (Conrath et al.,

2015; Valenzuela-Soto et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017; Rashid et al., 2018). Кормление насекомыми вызывает реакции окислительного стресса, которые являются важными элементами защиты растений от атакующих насекомых. Воздействие на корни *Arabidopsis* эндофитной бактерии *B. velezensis* YC7010, может индуцировать системную устойчивость к тлям из-за повышенного накопления H_2O_2 , гибели клеток и отложения каллозы в листьях (Rashid et al., 2017). Коллективные данные показывают, что накопление АФК в растениях, взаимодействующих с микробами, является ранней защитной реакцией против различных насекомых (Rashid, Chrung, 2017). Однако более высокое накопление АФК в растениях может иметь пагубные последствия. При этом необходима активация антиоксидантов. Так было показано, что пероксидазы, могут устранять вредные последствия большого количества АФК и могут вызывать защиту от бурой цикадки у устойчивых сортов риса (Du et al., 2015). Точно так же в другом исследовании обнаружили, что растения, инокулированные бактериями, проявляли повышенную активность антиоксидантных ферментов пероксидазы и супероксид дисмутазы, полифенолоксидазы и ингибиторов протеиназ, что способствовало усилению защиты растений томатов от азиатской хлопковой совки *Spodoptera litura* (Vano, Muqarab, 2017). Что подтвердилось в другом исследовании, где обработка растений томатов бактерией *Stenotrophomonas rhizophila* Т6-4 приводила к повышению активности ингибитора протеазы на 66.9%, активности пероксидазы на 53% и активности полифенолоксидазы на 80% в листьях, что повышало устойчивость растений к азиатской хлопковой совке (Ling et al., 2022). Активность пероксидазы и полифенолоксидазы была выше у растений, обработанных бактериями *B. velezensis* YC7010, чем у контрольных растений после кормления бурой цикадки (Rashid et al., 2018). Вполне возможно, что изменения в окислительно-восстановительном статусе, возникающие в результате повышенной активности антиоксидантных ферментов после всплеска АФК в растениях происходящие благодаря бактериям, могут способствовать СИУ при атаке насекомыми.

Влияние СРРБ на стимуляцию вторичного метаболизма растений. В результате тройного взаимодействия растение-бактерия-насекомое может измениться вторичный метаболизм как растения, так и микросимбионта (Oukala et al., 2021). В нескольких исследованиях сообщалось о способности бактериальных элиситоров, таких как пептиды, гликопротеины и липополисахариды, запускать защитную секрецию растительных вторичных метаболитов. Производство защитных химических соединений, таких как флавоноиды, лигнин и другие вторичные метаболиты, которые обеспечивают эффективную защиту от широкого спектра патогенов растений и насекомых-вредителей, регулируется гормональными сигнальными путями СК и ЖК/этилен (Valenzuela-Soto et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017; Rashid et al., 2018). Обработка ЛП фенгицином клубней картофеля приводила к индуцированному метаболизму фенилпропаноидного пути (Oukala et al., 2021). Кроме того, сообщалось, что элиситоры нескольких бактериальных групп, такие как N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ), стимулировали накопление фенольных соединений, а также оксипиринов и СК у разных видов растений (Oukala et al., 2021). Среди вторичных метаболитов наиболее распространенной группой защитных соединений являются фенольные соединения. Они важны в стратегии устойчивости к патогенам и насекомым (Rashid, Chrung, 2017). Так экспрессия генов фенилпропаноидного пути и генов синтеза фенольных соединений, которые действуют как антифиданты против насекомых, были улучшены бактериальной обработкой (Rashid, Chrung, 2017). Известно, что PAL (от Phenylalanine ammonia-lyase) участвует в биосинтезе лигнинов. Лигнин является важным фенольным соединением. Это сложный фенольный гетерополимер, который обеспечивает устойчивость к атакам насекомых. Повышенное содержание лигнина в клеточной стенке растений может физически ограничивать проникновение и питание насекомых за счет повышения устойчивости листьев (Rashid, Chrung, 2017). Повышенная экспрессия гена PAL, связанного с синтезом СК приводила к усилению лигнификации клеточной стенки растений, обработанных бактериями и способствовала устойчивости растений риса к бурой цикадке (Rashid et al., 2018). Известно также, что пероксидазы и

полифенолоксидазы участвуют в синтезе лигнина и других фенолов, которые способствуют формированию защитных барьеров для армированной клеточной структуры (Rashid et al., 2018). Инокуляция растений кукурузы эндофитной бактерией *B. amyloliquifaciens* приводила к значительному накоплению фенолов в растении, в частности галловой кислоты, что сильно сдерживало развитие личинок кукурузной листовой совки *Spodoptera frugiperda* (Ranjith et al., 2022).

Флавоноиды являются хорошо известными вторичными метаболитами растений, которые часто действуют как ингибиторы питания насекомых (Rashid, Chrung, 2017). Флавоноид трицин, экстрагируемый из мятлика, зараженного эндофитным грибом *Neotyphodium typhnium*, обладал инсектицидной активностью в отношении личинок комаров (Rashid, Chrung, 2017). Сообщается также, что трицин препятствует питанию бурой цикадки на растениях устойчивого сорта риса (Bing et al., 2007). Недавние исследования показали участие трицина в биосинтезе лигнина у однодольных растений (Li et al., 2016). Гены, продуцирующие флавоны с высоким содержанием С-гликозила, в сладкой кукурузе защищали початки от повреждения совкой (Nuessly et al., 2007). Колонизация корней риса *B. velezensis* YC7010 привела к усилению экспрессии генов терпенов и халконсинтазы, которые, как известно, связаны с защитой от бурой цикадки (Rashid et al., 2018).

Среди вторичных метаболитов камалексин и глюкозинолаты играют важную роль в защите растений от патогенных микробов и насекомых с различной пищевой специализацией, как листогрызущих, так и питающихся флоэмным соком (Kusnierczyk et al., 2008; Valenzuela-Soto et al., 2010; Pangesti et al., 2016; Rashid, Chrung, 2017). Биосинтез камалексина и глюкозинолатов, который запускает СИУ против листогрызущих насекомых, увеличивается при колонизации корней ризобактериями через ЖК/этилен-сигнальные пути (Pangesti et al., 2016).

Госсипол представляет собой фенольный сесквитерпеноидный альдегид, который придает устойчивость как от листогрызущих, так и питающихся флоэмным соком насекомых-вредителей (Rashid, Chrung, 2017). Обработка

растений хлопчатника *Bacillus* spp. индуцировала экспрессию ЖК-зависимых генов, которые активировали транскрипцию генов биосинтеза госсипола, включая семейство генов (+)- δ -кадиненсинтазы, чтобы уменьшить питание личинок *S. exigua* (Zebelo et al., 2016).

1.3.3 Рост-стимулирующий эффект бактерий *Bacillus* spp.

Bacillus spp. синтезируют многочисленные метаболиты, которые могут увеличить доступность питательных веществ для растений и, таким образом, напрямую способствовать росту растений и урожайности (Miljakovic et al., 2020). Азот-фиксирующие и фосфор-сольбилизирующие *Bacillus* spp. напрямую связаны с поглощением питательных веществ и последующим стимулированием роста у разных растений (Miljakovic et al., 2020). Многие виды *Bacillus* spp. могут напрямую повышать урожайность растений за счет выработки фитогормонов или регуляторов роста растений, таких как ауксины, ЦК, гиббереллины, этилен и АБК (Kudoyarova et al., 2019; Miljakovic et al., 2020).

Ауксины представляют собой группу растительных гормонов, которые стимулируют рост растений, в основном посредством регуляции клеточного деления, удлинения клеток и дифференцировки тканей. Основным встречающимся в природе ауксином является индол-3-уксусная кислота (ИУК) (Kudoyarova et al., 2019). Различные бактерии, в том числе *Bacillus* spp., обладают способностью продуцировать ИУК. Продукция ИУК широко распространена среди почвенных бактерий, и, по оценкам, около 80% ризобактерий продуцируют ИУК (Khalid et al., 2004). Сообщалось, что *B. subtilis* продуцирующие ИУК усиливали рост побегов и корней, силу проростков и площадь листьев томата (Chowdappa et al., 2013).

Гиббереллины представляют собой группу растительных гормонов, которые влияют на многие процессы развития высших растений, включая прорастание семян, удлинение стебля, цветение и плодоношение (Miljakovic et al., 2020). Так была задокументирована продукция гиббереллинов у некоторых видов бацилл *B.*

pumilus и *B. licheniformis* (Gutierrez-Manero et al., 2001). Благотворное влияние *B. methylotrophicus* на растения за счет секреции ряда гиббереллинов подтверждено повышением процента всхожести семян салата, дыни, сои и горчицы овощной (Radhakrishnan, Lee, 2016).

Цитокинины (ЦК) представляют собой группу растительных гормонов, которые играют ключевую роль в стимулировании клеточного деления или цитокинеза в корнях и побегах растений (Kudoyarova et al., 2019). Они являются важными регуляторами других физиологических процессов и процессов развития растений, таких как прорастание семян, апикальное доминирование, мобилизация питательных веществ и старение листьев (Kudoyarova et al., 2019). Установлено, что 90% фосфатрастворяющих ризобактерий обладают способностью продуцировать ЦК *in vitro* (Miljakovic et al., 2020). Архипова и др. сообщили о способности *B. subtilis* ИБ-22 продуцировать ЦК, и инокуляция растений салата этими бактериями увеличивала содержание ЦК как в побегах, так и в корнях, а также массу побегов и корней растений (Arkhipova et al., 2005).

Этилен представляет собой газообразный растительный гормон, который в основном регулирует процессы созревания и старения, а также реакцию на биотические и абиотические стрессы. Некоторые СРРБ, в том числе *Bacillus* spp., синтезируют фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АСС) дезаминазу, который модулирует уровни этилена в растениях, во избежание ингибирования роста (Belimov et al, 2009a; Kudoyarova et al., 2019). Фермент АЦК-дезаминаза расщепляет АЦК (прямой предшественник биосинтеза этилена в растениях) на аммиак и α -кетобутират. Бактерии, характеризующиеся АЦК-дезаминазной активностью, могут способствовать поддержанию роста и развития растений в стрессовых условиях (засуха, засоленность, затопление и аноксия, наличие патогенов или загрязнителей) (Gamalero, Glick, 2015).

Абсцизовая кислота (АБК) представляет собой растительный гормон, играющий важную роль во многих физиологических процессах растений, включая прорастание семян и устойчивость к стрессу (Kudoyarova et al., 2019). Было показано, что *Bacillus aryabhatai* продуцирует в культуре значительное

количество АБК, ИУК, ЦК и ГК, в то время как инокулированные растения сои имели высокий уровень фитогормонов, более длинные корни, побеги и лучшую устойчивость к тепловому, окислительному стрессу и недостатку азота в почве (Park et al., 2017). Было обнаружено, что бактериальный эндофит *B. amyloliquefaciens* продуцирует АБК и увеличивает рост растений и устойчивость к солевому стрессу (Shahzad et al., 2017).

Некоторые бактерии могут усиливать рост растений за счет биосинтеза вторичных метаболитов, летучих соединений и ферментов, а также усиливать фотосинтез растений за счет модуляции эндогенного сахара (Rashid, Chrung, 2017).

Это влияние бактерий на улучшение роста растений влияет на взаимодействие растений и насекомых. С одной стороны, улучшенный состав питательных веществ может повысить питательную ценность растений, что влияет на продуктивность насекомых на определенных трофических уровнях (Rashid, Chrung, 2017). Различные насекомые могут извлечь выгоду из большей доступности питательных веществ в растительных клетках. С другой стороны, СРРБ обеспечивают повторный рост тканей после питания насекомых благодаря повышенному поглощению питательных веществ и воды, что стимулирует толерантность растений. Это отражается на урожае в присутствии насекомых (Koch et al., 2016). Более того, более высокая эффективность фотосинтеза позволяет полезным микробам преобразовывать больше световой энергии, что позволяет генерировать СИУ против насекомых, питающихся флоэмным соком, что может компенсировать потерю энергии растениями (Valenzuela-Soto et al., 2010).

Таким образом, бактерии могут улучшать здоровье растений различными способами, включая увеличение поглощения питательных веществ и производство вторичных метаболитов, ферментов, летучих органических соединений и фитогормонов. Все это прямо или косвенно запускает СИУ у растений против насекомых (Rashid, Chrung, 2017).

1.3.4 Новые подходы для эффективного использования бактерий

Роль новых подходов в изучении эндофитных микроорганизмов. В течение последних двух десятилетий различные виды микроорганизмов, в том числе бактерии, грибы и дрожжи, были охарактеризованы и использованы в различных частях мира в качестве биологических препаратов или агентов биоконтроля (от biocontrol agents - ВСА) для контроля до- или послеуборочных потерь сельскохозяйственной продукции (Kashyap et al., 2023). Применение эндофитных микроорганизмов считается одним из наиболее безопасных подходов из-за их высокого потенциала колонизации и акклиматизации по сравнению с эпифитными микроорганизмами, присутствующими над или вне поверхности растений (Kashyap et al., 2023).

Однако успешное применение бактериальных препаратов в полевых условиях зависит от взаимодействия растений и бактерий (Miljakovic et al., 2020). Новые стратегии, такие как инженерия микробиома и селекция культур, оптимизированных для микробов, могут прямо или косвенно обнаруживать, модулировать и улучшать черты и способы повышения производительности бактериальных штаммов. Новые методы исследований взаимодействия растений и бактерий раскрывают механизмы, с помощью которых растения формируют микробиом ризосферы и эндосферы (Miljakovic et al., 2020; Kashyap et al., 2023).

Омикский подход играет важную роль в понимании взаимодействия растений и эндофитов в условиях абиотического и биотического стресса. Омика включает междисциплинарные подходы, такие как биоинформатика, транскриптомика, метаболомика, геномика, молекулярная биология, протеомика и биохимические анализы, для тщательного и подробного понимания взаимодействий растений и эндофитов, экспрессии генов, филогенетики и посттрансляционной модификации (Kaur et al., 2023). Эндофитные микробные сообщества являются источниками необходимых для промышленности ферментов, вторичных метаболитов и антистрессовых средств растения-хозяина. Таким образом, комбинация нескольких омических подходов предлагает

сопоставление таких метаболитов с их генами-продуцентами в метаболических путях в условиях стресса, что играет важную роль в улучшении качества урожая (Kaur et al., 2023).

Секвенирование следующего поколения (Next-generation sequencing - NGS) играет важную роль в управлении абиотическим и биотическим стрессом, обеспечивая высокопроизводительный и быстрый анализ геномов и транскриптомов растений (Kaur et al., 2023). В целом, NGS произвело революцию в области управления стрессом растений, предоставив мощный инструмент для анализа генома и понимания молекулярных механизмов, участвующих в реакциях растений на стресс. Применение методов секвенирования нового поколения (NGS) в сочетании с протеомикой, метагеномикой, метаболомикой и т. д. помогут уточнить растительно-микробные взаимодействия, в том числе то, как эти отношения влияют на иммунитет и рост растений (Miljakovic et al., 2020).

Бактериальные препараты. В последние годы во всем мире значительно увеличилось распространение коммерческих препаратов на основе *Bacillus*. Помимо благотворного влияния на растения эффективные штаммы *Bacillus* spp. должны быть способны сохраняться в окружающей среде и быть стабильными и жизнеспособными для длительного хранения и целевого использования в полевых условиях. Резистентность и стабильность являются одними из основных ограничений препаратов на основе *Bacillus*. Эти бактерии пригодны для коммерциализации благодаря способности продуцировать различные метаболиты, образовывать эндоспоры и быстро расти в различных средах (Miljakovic et al., 2020). Отбор подходящих штаммов *Bacillus* должен осуществляться таким образом, чтобы избежать конкуренции, особенно если препарат содержит более одного вида.

Однако при промышленном применении микроорганизмов возникает ряд проблем (Kaur et al., 2023). Процесс создания продукта на основе эндофитов включает несколько этапов, первый из которых заключается в сборе образцов и изоляции эндофитов и является самым важным шагом (Kaur et al., 2023). Второй

этап включает в себя скрининг *in vitro* и определение полезных свойств эндофитов.

Идентификация изолированных *Bacillus* spp. имеет большое значение, поскольку их полезные признаки свойственны определенным видам. Соответственно, необходимо использовать методы, позволяющие быстро и надежно тестировать большое количество *Bacillus* spp. в качестве потенциальных стимуляторов роста растений и агентов биологической борьбы. Определение морфологических, физиологических и биохимических признаков — процесс длительный и часто недостоверный. Наиболее точный метод изучения разнообразия *Bacillus* spp. является их идентификация и характеристика на молекулярном уровне. Базы данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) и RDP (Проект рибосомной базы данных) содержат 2611 отдельных последовательностей 16S рДНК, происходящих от 175 различных видов *Bacillus*, из которых только 1586 были идентифицированы на видовом уровне (Miljakovic et al., 2020).

Третий этап включает полевые испытания. На этом этапе после определения перспективных кандидатов; полевые испытания проводятся для оценки эффективности бактериальных эндофитов в реальных условиях (Kaur et al., 2023).

Четвертый этап включает разработку консорциума или продукта с одним штаммом. Создание микробных консорциумов сопряжено с рядом проблем, таких как обеспечение совместимости различных штаммов в консорциуме друг с другом и отсутствия конкуренции за ресурсы. В конечном счете, выбор между микробными продуктами с одним штаммом и консорциумом зависит от конкретных целей применения, характеристик целевого растения и условий окружающей среды (Kaur et al., 2023).

Пятый этап включает доработку продукта, токсикологический анализ и разработку прототипа. Усовершенствование продукта - процесс очистки микробных продуктов может быть сложным, поскольку часто требует оптимизации условий роста, выбора штамма и рецептуры. Токсикологический анализ является важным аспектом разработки микробных продуктов, поскольку

он гарантирует, что продукт безопасен для человека, животных и окружающей среды (Kaur et al., 2023).

Шестой этап включает разработку прототипа состава, который поддерживает стабильность и эффективность микробного продукта, что может быть сложной задачей. Состав должен обеспечивать выживание микроорганизмов во время хранения, распределения и применения, а также обеспечивать необходимыми питательными веществами для оптимального роста и активности. Седьмой и восьмой этапы включают регистрацию и одобрение регулирующими органами (Kaur et al., 2023).

Дальнейшие исследования должны найти наилучшую возможную технологию производства для каждого бактериального штамма или комбинации бактерий, принимая во внимание экономическую эффективность продуктов на основе *Bacillus*.

Устойчивость растений к патогенам и вредителям, включая злаковых тлей, является одной из важных способностей выживания растений. Во всем мире биотические стрессовые факторы считаются одной из основных причин потери урожая; поэтому перед человечеством стоит задача обеспечения устойчивой продовольственной безопасности. В качестве защитного арсенала при атаке насекомых растения используют физические барьеры (например, трихомы, шипы и выделения воска) и синтез вторичных метаболитов (летучие органические соединения, фенолы, терпены, защитные белки). Кроме этого, во время нападения насекомых растения используют сигнальные системы для активации различных индуцированных защитных механизмов, которые в основном опосредованы фитогормонами (СК, ЖК и этиленом) и АФК. Недавние достижения в молекулярной биологии и метаболомике ускорили фундаментальные исследования взаимодействия растений и насекомых. Было изучено большое количество метаболитов, ферментов и генов, участвующих в защитных реакциях растений, охарактеризованы сигнальные пути защиты растений, что улучшило

наше понимание механизмов, лежащих в основе иммунных реакций растений. Однако остается ряд нерешенных вопросов, требующих дальнейшего изучения.

В настоящее время в научной литературе иммунитет растений склонны рассматривать как целостную систему, включая действие и взаимодействие сложного холобиома, в котором растения и микроорганизмы в фитосфере могут подготовить конечный результат при столкновении с биотическим стрессом (Oukala et al., 2021). Более того, ученых привлекает внимание функция бактериальных эндофитов как индукторов СИУ по механизму прайминга. Известно, что прайминг с помощью бактерий обеспечивает исключительную защиту растений с низкими физиологическими затратами и может передаваться по наследству (Oukala et al., 2021). Кроме этого, эндофиты могут служить производителями метаболитов, которые могут помочь в методах биоконтроля или в более эффективном ведении сельского хозяйства (Oukala et al., 2021).

Хотя количество исследований по этому вопросу увеличивается, механизмы, участвующие в совместном действии растений и эндофитов против биотических стрессовых факторов, все еще продолжают изучаться. Несколько вопросов в настоящее время открыты в этой новой области исследований. Одним из них является выбор изучения действия одного эндофита или комбинации нескольких эндофитов, что приближает ученых к естественным условиям (Oukala et al., 2021). Второй вопрос, заключается в том, как сочетать стимулирование роста растений с защитными механизмами. Возможная связь между этими двумя событиями может стать предметом будущих исследований.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Бактерии. В работе использовали грамположительные аэробные эндофитные бактерии из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: три штамма *B. subtilis* 26Д (Коллекция культур полезных микроорганизмов ВНИИСХМ, №128) (Bs26Д), 11ВМ (ВНИИСХМ №519) (Bs11ВМ) и Ttl2 (выделен из листьев *Triticum timopheevii* Zhuk, Республика Башкортостан) (BsTtl2), три штамма *B. thuringiensis* В-5689, В-5351 и В-6066 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ)) (Bth В-5689, Bth В-5351, Bth В-6066) и три изолята *Bacillus* sp., выделенные из листьев пшеницы *Bacillus* sp. Tas1 и Tas8.2. (BTas8.2, BTas1) и из листьев картофеля *Bacillus* sp. Stl7 (BStl7), произрастающих на территории Республики Башкортостан (<http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc>). Также в работе была использована рекомбинантная линия бактерии *B. subtilis* 26Д*sfp* с неактивным геном *sfp*, и рекомбинантная линия *B. subtilis* 26Д*CryChS* с встроенным геном *BtcryIIa* кодирующим белок CryIIa (Maksimov et al., 2020).

Штамм *B. subtilis* 26Д является удобной моделью для изучения роли сурфактина в защите растений от фитопатогенных микроорганизмов. Фермент 4-фосфопантенил-трансфераза (*sfp*), необходим для продуцирования липопептидного антибиотика сурфактина, посттрансляционно фосфопантетенилирует сериновый остаток в доменных белках первых трех субъединиц (SrfABC) сурфактинсинтетазы (Quadri et al., 1998). В лаборатории биохимии иммунитета растений УФИЦ РАН ранее к.б.н. Благовой Д.К. была получена «дефицитная» по синтезу сурфактина линия бактерии *B. subtilis* 26Д*sfp* с неактивным геном *sfp*. Для этого был использован интеграционный вектор pDG 1662, в который были встроены фрагменты гена *sfp1* и *sfp2* по сайтам рестрикции XhoI и NdeI, соответственно. После трансформации данным вектором в *B. subtilis* 26Д происходила рекомбинация, и фрагмент вектора, ограниченный участками

гена *sfp* встраивался в геном бактерии, из-за чего этот ген инактивировался. Полученная линия обладает устойчивостью к спектиномицину. Для получения рекомбинантной линии *B. subtilis* 26DCryChS также был использован вектор pDG 1662 (Maksimov et al., 2020).

Растения. Эксперименты с растениями проводили на проростках или отделенных листьях мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) средневосприимчивого сорта Салават Юлаев (СЮ) в контролируемых лабораторных условиях (Rumyantsev et al., 2023). Семена были получены в Башкирском НИИСХ — обособленном структурном подразделении Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Условия выращивания. Растения выращивали на гидропонной культуре на 10% питательном растворе Хогланда-Арнона в ростовой камере KBW E6 (Binder GmbH, Германия) с 16-часовым фотопериодом при интенсивности освещения 146 Вт/м² ФАР (лампы Osram L 36W/77) и температуре воздуха 24/20 °С (день/ночь) (Rumyantsev et al., 2023).

Насекомые. Для экспериментов использовали популяцию обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) собранную летом 2019 г. Тлю собирали с растений пшеницы, никогда не обрабатывавшихся пестицидами, в Уфимском районе Республики Башкортостан. В лабораторных условиях тлю размножали на проростках пшеницы в изолированных сосудах с почвой, прожаренной при 180°C. Проростки выращивали в сосудах вместимостью 1 литр в ростовой камере KBW E6 (Binder GmbH, Германия) (Rumyantsev et al., 2023). Использовали средневосприимчивый сорт мягкой яровой пшеницы Салават Юлаев (СЮ).

2.2 Условия проведения экспериментов

Для изучения биохимических характеристик растений и транскрипционной активности генов растения выращивали в изолированных пластиковых сосудах объемом 1 л по 50–70 растений в 400 мл 10% раствора Хогланда–Арнона на плотках, завернутых в стерильную фильтровальную бумагу. Четырехсуточные

сеянцы заселяли тлями разных возрастов в количестве не менее 10 нимф на растение. Для предотвращения миграции тли сосуды закрывали пластиковыми изоляторами, покрытыми пористым нетканым материалом.

Бактериальная обработка. Для доказательства влияния эндофитных бактерий на защиту и параметры роста растений опытные семена пшеницы перед посевом стерилизовали в течение 1 минуты в р-ре 10% перекиси водорода, промывали дистиллированной водой, просушивали, а затем обрабатывали суспензионной культурой штаммов и изолятов или их композиций или рекомбинантными линиями полусухим способом в рост стимулирующих концентрациях, подобранных в ходе данной работы (Rumyantsev et al., 2023).

Семена контрольных растений замачивали в дистиллированной воде (в таблицах, на графиках и гистограммах обозначены как «Контроль»). Необработанные контрольные растения, зараженные тлей, в таблицах и рисунках обозначаются как «Вода». В каждом варианте для исследования брали по 5 растений заселенных и незаселенных тлей (Rumyantsev et al., 2023).

Обработка растений липопептид-богатыми фракциями (ЛБФ). В экспериментах по установлению роли липопептидов (ЛП) в индукции защитных сигнальных путей обработку растений ЛБФ проводили за 24 ч до заселения тлей путем добавления ЛБФ или их композиции в питательную среду растений так, чтобы конечная концентрация была рост стимулирующей. Эксперименты не преследовали цель определить продолжительность действия бактериальных метаболитов на иммунную систему растений. Через 24 ч среду заменяли раствором Хогланда–Арнона без ЛБФ (Rumyantsev et al., 2023).

2.3 Микробиологические методы

2.3.1 Культивирование бактериальных штаммов

Бактериальные штаммы культивировали в чашках Петри на питательном КГА (картофельно-глюкозном агаре) в термостате ES-20 (Biosan, Латвия) при 28°C в течение 3-х суток, а также на жидкой лизогенной бульонной среде (LB)

(1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта и 0.5% NaCl) при 28 °C на лабораторных шейкерах (120 об/мин) в течение 72 ч до полной споруляции.

Коллекция бактериальных штаммов *Bacillus* spp. хранится в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН.

2.3.2 Определение эндофитности бактерий в пшенице

Для исследования количества эндофитных клеток бактерий использовали стерильные растения пшеницы сорта СЮ, полученные из зрелых зародышей. Семена пшеницы промывали с использованием Tween-20, после чего ополаскивали дистиллированной водой. Затем выдерживали в течение 1 минуты в р-ре 10% перекиси водорода и вновь промывали дистиллированной водой. Семена проращивали в стерильных чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в течение 24 часов. Затем зародыши отделяли при помощи скальпеля, стерилизовали их 2 минуты в 5% перекиси водорода и помещали на среду Муросиге-Скуга, содержащую 125 мкг/мл стрептомицина и 125 ед./мл пенициллина (Sorokan et al., 2020). Через 2 дня проросшие зародыши переносили в индивидуальные пробирки на среду Муросиге-Скуга без антибиотиков и выращивали 8 дней. Затем растения инокулировали 10 мкл суспензии штаммов *Bacillus* spp. (10^8 клеток/мл) путем нанесения на среднюю часть листа, и по 5 мкл *Bacillus* spp. на 1 растение для исследования их совместного действия.

Суспензию для инокуляции растений получали путем культивирования бактерий на жидкой среде LB в течение 24 часов на шейкере OS-20 Biosan (Латвия) при комнатной температуре и при 120 об/мин. О количестве клеток судили по показаниям спектрофотометра LS 55 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer, США) при длине волны 600 нм, пересчитанных по формуле. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в тканях растений определяли через 7 дней после инокуляции растений бактериями. 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% диацид – 3 мин; дистиллированная вода. Навески растений гомогенизировали в стерильных ступках с добавлением 2 мл стерильной воды. Гомогенат разбавляли в 10 и в 100 раз. Аликвоты гомогената после разбавления (100 мкл) распределяли по поверхности агаризованной среды LB шпателем 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 (Sorokan et al., 2020). Контаминированные чашки Петри, в которых мы наблюдали колонии, отличные по морфологии от колоний исследуемого штамма, не учитывались.

Выделение высокомолекулярной бактериальной ДНК из растений проводили с помощью 1% лизирующего раствора (1% тритона X100, 1% твина-20, 1% Chelex 100). Для подтверждения идентичности полученных реинокулятов исходному штамму применяли метод RAPD–анализа, используя случайные праймеры Lmbd8 5'-GGGCGCTG-3' (Rumyantsev et al., 2023).

Для определения бактерий *B. thuringiensis* использовали селективный МҮР агар - «Желточный агар с маннитом и феноловым красным» (Химмедсервис, Россия).

2.3.3 Метод перпендикулярных штрихов

Для проверки антагонистической активности использовали метод перпендикулярных штрихов. Петлей объемом 10 мкл наносили линию бактерий на поверхность агаризованного LB. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 27°C в цифровом мини-инкубаторе Gilson (Gilson, Китай). Другой штамм для исследования антагонистических эффектов ранее помещенных бактерий добавляли перпендикулярно. Двойные культуры инкубировали 24 ч при 27°C, после чего измеряли расстояния между перпендикулярными линиями.

2.4 Изучение типов устойчивости к тлям

2.4.1 Подбор рост-стимулирующих концентраций бактерий, липопептид-ботатых фракций и их композиций

Методика определения энергии прорастания и всхожести семян, а также массы проростков предназначена для определения эффективности стимулирующих препаратов в лабораторных условиях при использовании в качестве тест-объекта высших растений. Всхожесть семян определяли согласно ГОСТ 12038-84.

Рост-стимулирующие концентрации для бактерий, липопептид-ботатых фракций (ЛБФ) и их смесей определяли по всхожести семян, а также по приросту свежей и сухой биомассы трехсуточных проростков пшеницы. В каждом варианте отбирали по 4 пробы по 100 семян. В качестве контрольной пробы использовали чистые, необработанные бактериальными штаммами или ЛБФ семена. Перед обработкой и посевом семена стерилизовали 10% раствором пероксида водорода в течение 1 минуты. Затем экспериментальные семена пшеницы перед проращиванием обрабатывали жидкой культурой бактерий полусухим способом (Алексеев и др., 2022). Для этого 0.5, 1, 2 и 3 мкл индивидуальной суспензии с титром 2×10^9 спор/мл на 1 г семян разводили 20 мкл дистиллированной воды и смачивали этим раствором семена, затем семена оставляли на несколько часов до полного высыхания. Так, концентрации бактерий составляли 1×10^6 спор/мл (0.5), 2×10^6 спор/мл (1), 4×10^6 спор/мл (2), 6×10^6 спор/мл (3). Или замачивали в растворах ЛБФ в концентрациях от 0.5 до 4.5 мкг/мл. Семена проращивали в чашках Петри на увлажнённой фильтровальной бумаге в термостате при постоянной температуре 24°C. Оценку и учет проросших семян проводили через 3 суток. Результаты представлены в виде % всхожести от контроля (Rumyantsev et al., 2023).

Для определения сырой массы растений проростки (по 10 штук в каждой пробе без семени) слегка просушивали фильтровальной бумагой и взвешивали. Для определения массы сухого вещества проростки высушивали в термостате при

температуре 80°C до постоянной массы. Результаты представлены в виде сырой и сухой массы одного проростка в мг, а также в % от контроля. В таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам (Rumyantsev et al., 2023).

2.4.2 Тест на афицидность штаммов, изолятов, рекомбинантных линий или липопептид-богатых фракций

В работе была проверена афицидность бактериальных штаммов и их ЛБФ по модифицированной для пшеницы методике (Веселова и др., 2019). Тест на афицидность бактериальных штаммов и ЛБФ проводили на отрезанных первых листьях проростков пшеницы с подсаженной на них тлей, помещенных в пробирки с 5 мл бактериальной суспензии исследуемого штамма, изолята или рекомбинантной линии в концентрации 10^7 спор/мл (контрольные пробирки содержали 5 мл стерильной воды) или с 5 мл ЛБФ в различных концентрациях от 2.5 до 200 мкг/мл, либо с 5 мл сурфактина (коммерческого) (Surfactin from *Bacillus subtilis*, $\geq 98.0\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich, США). В каждом варианте было 5 пробирок. В каждую пробирку на лист подсаживали по 10 особей тли одного возраста, пробирку закрывали ватной пробкой и помещали в условия, описанные ранее. В течение семи дней в пробирках подсчитывали количество мертвых и живых тлей. Афицидность штамма, изолята, рекомбинантной линии или ЛБФ по отношению к злаковой тле выражали в % смертности от общего числа тлей (Rumyantsev et al., 2023). Коэффициент размножения тли рассчитывали по формуле: $K = \frac{\text{средняя плодовитость самки в течение всего эксперимента}}{\text{продолжительность эксперимента в сутках}}$ (Радченко, 2008).

2.4.3 Тест на антибиоз

Для теста на антибиоз выращивали по 5 растений одного экспериментального варианта в отдельных сосудах объемом 500 мл в 100 мл 10%

-ного раствора Хогланда-Арнона на пластиковом плотике, обернутым стерильной фильтровальной бумагой, в условиях, описанных для размножения обыкновенной злаковой тли. Для каждого варианта обработки было 3 сосуда. На 3-х суточные всходы под изоляторы подсаживали личинок первого возраста из расчета 1 особь на растение. После 14 дней подсчитывали абсолютное количество живых и мертвых тлей (Веселова и др., 2019). Плодовитость и смертность тли выражали в % от их общего количества. Коэффициент размножения при прямом воздействии бактериальной суспензии рассчитывали, как описано выше.

При определении антибиоза для бактериальных штаммов и их смеси использовали рост-стимулирующие концентрации, а для ЛБФ и их смеси использовали концентрации от 1.5 до 10 мкг/мл.

2.4.4 Тест на выносливость растений

Для экспериментов по выносливости исследуемые варианты растений пшеницы выращивали индивидуально в пластиковых изолированных контейнерах объемом 500 мл в 100 мл 10%-ного раствора Хогланда-Арнона на пластиковом плотике, который был, обернут стерильной фильтровальной бумагой, в условиях, описанных для размножения обыкновенной злаковой тли. В возрасте 4-х суток у растений пшеницы исследуемых вариантов измеряли длину проростков от уровня плотика до кончика листа, а затем каждое растение заселяли 20 бескрылыми самками и изолировали. Постоянную численность тлей поддерживали путем удаления через каждые 48 ч отрождающихся личинок в течение двух недель. В конце эксперимента проводилось повторное измерение высоты первого и второго листьев растений незаселенных и заселенных тлями, результаты сравнивались с первоначальным измерением (Веселова и др., 2019). Выносливость выражали в % прироста листа от незараженного контроля.

При определении выносливости для бактериальных штаммов и их смеси использовали рост-стимулирующие концентрации, а для ЛБФ и их смеси использовали концентрации от 1.5 до 10 мкг/мл.

2.5 Биохимические методы

2.5.1 Получение белковых экстрактов

Белковые экстракты для измерения содержания перекиси водорода (H_2O_2), ферментативной активности (пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ)) и общего белка получали из гомогенизированного в жидком азоте растительного материала, зафиксированного в ходе проведения экспериментов через 6, 24, 72 часа и 6 суток после заселения растений злаковой тлей у контрольных и опытных растений (100-200 мг из 5 растений на один вариант). Гомогенат растворяли в охлажденном Na-фосфатном буфере (ФБ), pH 6.2, в концентрации 0.05 М в соотношении 1 : 5 (вес/объем) и затем инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Далее растительный материал центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g (5415K Eppendorf, США).

Чтобы определить **содержание белка** использовали модифицированный для микропланшет метод Бредфорд (Bradford, 1976). Для чего в планшетные лунки добавляли 0.095 мл 0.05 М ФБ pH 6.2, 0.005 мл супернатанта, а также 0.150 мл реактива Бредфорд. Приготовление реактива: 100 мг кумасси G-250 смешивали с 50 мл этанола (95%), добавляли 100 мл H_3PO_4 и доводили объем смеси до 1-го литра с помощью воды. Количество белка в образце должно быть равно от 0.1 до 1 мг/мл. Оптическую плотность смеси определяли с помощью спектрофотометра LS 55 Luminescence Spectrometer (PerkinElmer, США), соблюдая следующие условия: 595 нм спустя 5 мин, но не позднее 20 мин. По калибровочной кривой определяли количество белка в смеси, кривую строили с помощью раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США), раститрованного от 1 до 0.1 мг/мл.

2.5.2 Определение активности оксидоредуктаз

Активность ПО (КФ 1.11.1.7) определяли модифицированным методом с использованием 96-луночных планшет для иммуноферментного анализа (Cstar,

США) (Хайруллин и др., 2000). Супернатант в количестве 0.075 мл, разведенный в ФБ (образец: ФБ - 1:30), 0.025 мл раствора о-фенилендиамина в концентрации 0.5 мг/мл и 0.025 мл 0.016% раствора H_2O_2 добавляли в лунки. Развитие окраски прекращали добавлением 0,05 мл 4Н серной кислоты. Измерение оптической плотности осуществляли на планшетном спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (BioRad, США) при 490 нм. Для каждого варианта измерения использовали 5 аналитических повторов. Ферментативную активность выражали в единицах плотности (оптической) на 1 мг белка в минуту.

Активность КАТ (КФ 1.11.1.6) измеряли модифицированным методом с использованием 96-луночных планшет для иммуоферментного анализа (Веселова и др., 2014), основанным на способности H_2O_2 создавать с солями молибдата устойчивый окрашенный комплекс (Королук и др., 1988). В лунки планшет (Cstar, США) к 0.150 мл 0.03%-ного раствора H_2O_2 прибавляли 0.01 мл белкового экстракта, полученного в ходе эксперимента. Остановка реакции происходила путем добавления 0.075 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. У каждого образца была контрольная проба, которая содержала 0.150 мл дистиллированной воды, 0.01 мл белкового экстракта и 0.075 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Холостая проба содержала 0.150 мл 0.03%-ного раствора H_2O_2 , 0.01 мл дистиллированной воды вместо супернатанта и 0.075 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре для 96-луночных планшет Benchmark Microplate Reader (BioRad, США) при длине волны 405 нм. С помощью калибровочной кривой рассчитывали активность КАТ, которую выражали в мкМ H_2O_2 /мг белка*мин.

2.5.3 Измерение содержания перекиси водорода

Для определения содержания H_2O_2 использовали белковые экстракты. Концентрацию H_2O_2 измеряли с использованием красителя ксиленолового оранжевого в присутствии ионов железа (Bindschedler et al., 2001). Реагент

содержал 0.074% соль Мора в 5.81% растворе серной кислоты и 0.009% раствор ксиленолового оранжевого в 1.82 % растворе сорбита (в соотношении 1:100). Для определения к 250 мкл реагента добавляли 25 мкл супернатанта образца, инкубировали при комнатной температуре 45 мин, затем центрифугировали при 16000 об. /мин в течение 5 мин и измеряли оптическую плотность продуктов реакции на спектрофотометре LS 55 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer, США) при длине световой волны 560 нм. Концентрацию H_2O_2 определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

2.5.4 Получение липопептид-богатой фракции из среды культивирования бактериальных штаммов

Липопептид-богатую фракцию из жидкой культуральной среды бактерий получали методом этанольной экстракции (Waewthongrak et al., 2015; Tunsagool et al., 2019). ЛБФ получали из трехсуточной суспензимальной культуры бактерий, выращенных на LB питательной среде. После завершения культивирования бактериальную суспензию центрифугировали при $4000 \times g$ при $4^\circ C$ в течение 30 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, Bray, OK, США), супернатант подкисляли добавлением 2М раствора HCl до pH 2.0. и инкубировали в течение ночи при $4^\circ C$. Образовавшийся осадок смывали дистиллированной водой, подкисленной до pH 2.0 раствором 2М HCl, и центрифугировали при $4000 \times g$ в течение 30 мин, процедуру повторяли дважды. Полученный осадок дважды экстрагировали 80%-ным этанолом при pH 7.0. Сырой экстракт очищали на фильтре Amicon Ultracel – 3K (Merck KGaA, Германия), фракцию с молекулярной массой менее 3 кДа собирали и сушили на вакуумном концентраторе (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Германия) при $30^\circ C$. Высушенный остаток взвешивали и затем повторно растворяли в небольшом количестве 80% этанола, при этом в экспериментах использовали различные концентрации (Rumyantsev et al., 2023).

2.5.5 Определение липопептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) липопептидов, выделенных из культурального фильтрата бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ, выполняли на приборе LC20-АТ (Shimadzu, Япония), оснащенный диодно-матричным детектором, с использованием колонки Discovery C18 (25 см × 4.6 мм × 5 мкм). Хроматографирование вели в условиях термостатирования колонки (30°C), скорость потока составляла 0.8 мл/мин, детекцию осуществляли при длине волны 210 нм. При анализе содержания сурфактина элюцию проводили смесью воды и 0.1%-ной уксусной кислоты, взятых в соотношении 60:40 (элюент 1). При определении итурина элюцию вели смесью ацетонитрила с 0.1%-ной уксусной кислотой в соотношении 40:60 (элюент 2), как в работе (Cao et al., 2013). В качестве хроматографического стандарта использовали коммерческие сурфактин (Surfactin from *Bacillus subtilis*) и итурин (Iturin A from *Bacillus subtilis*) (Sigma-Aldrich, США).

Нами для разделения различных липопептидов были подобраны два элюента: элюент 1 и элюент 2. Выбор первой системы был обусловлен тем, что в условиях эксперимента препарат коммерческого сурфактина не снимался с матрицы колонки при использовании описанного в литературе элюента 2 даже при длительном элюировании (40 мин). Элюент 1 оказался наиболее эффективным для анализа сурфактинов, и, несмотря на то, что время удержания R_t составило всего около 4.5 минут, в указанных условиях удалось добиться высокого качества их разделения. Использование смеси ацетонитрила с уксусной кислотой (элюент 2) оказалось эффективным для разделения итуринов; оптимизация ее состава с использованием коммерческого препарата данного липопептида позволила определить наиболее подходящее соотношение указанных компонентов (40:60, ацетонитрил: 0.1%-ная уксусная кислота).

2.5.6 Измерение активности рибонуклеаз в культуральной жидкости бактерий

Активность РНКаз в культуральной среде бактерий определяли по методу Sokurenko et al. (2016). Реакцию проводили в кварцевых кюветах, куда вносили 1.98 мл раствора дрожжевой РНК в конечной концентрации 50 мкг/мл в 0.05 М трис-НСl буфере рН 8, затем добавляли 20 мкл супернатанта культуральной жидкости бактерий полученного путем центрифугирования при 4000×g при 4 °С в течение 30 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, США) и выдерживали 1 ч (Sorokan et al., 2020). Контролем служил раствор дрожжевой РНК, где вместо образца добавляли трис-НСl буфер. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли относительно контрольного раствора при длине волны 260 нм на спектрофотометре LLG-uniSPEC 2 (LLG, Германия). За единицу нуклеазной активности принимали количество фермента, вызывающее увеличение адсорбции на 1.0 оптическую единицу при длине волны 260 нм за 1 ч при 25°С (Pinskaya et al., 1996). РНКазную активность выражали в оптических единицах/мин·на 1 мл жидкой среды (внеклеточная РНКазная активность *Bacillus*).

2.5.7 Измерение содержания фитогормонов в культуральной жидкости бактерий

Биомассу собирали на поздней логарифмической фазе роста или в начале стационарной фазы (обычно на третий день). Культуральную жидкость центрифугировали при 5000 об/мин в течении 20 мин на центрифуге Avanti J-E (“Beckman Coulter”, США). В супернатанте анализировали содержание фитогормонов цитокининов (ЦК) абсцизовой кислоты (АБК) и индолилуксусной кислоты (ИУК).

Выделение и очистка ЦК. ЦК из 2 мл супернатанта культуральной жидкости бактерий дважды экстрагировали н-бутиловым спиртом в соотношении 2:1 (водная фаза / органическая фаза) (Yokota, Murofushi, 1980). Экстракт

упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в минимальном количестве 80% этилового спирта, наносили на силиколовую пластину для тонкослойной хроматографии (ТСХ), которую проводили в системе растворителей бутанол : аммиак : вода (6 : 1 : 2). Материал из зон выхода зеатина и его рибозида элюировали 0.1 М раствором ФБ, рН 7.4, в течение 16 ч, затем силикагель удаляли путем центрифугирования при 10000 g в течение 10 мин (5415K Eppendorf, США). В надосадочной жидкости определяли содержание зеатина и его рибозида с помощью иммуноферментного анализа с использованием специфических антител (Веселова и др., 2016).

Выделение и очистка ИУК и АБК. Гормоны из 1 мл супернатанта культуральной жидкости бактерий экстрагировали диэтиловым эфиром по модифицированной схеме (Vysotskaya et al., 2010). Супернатант подкисляли до рН 2-3 1N HCl, затем дважды экстрагировали диэтиловым эфиром в соотношении 1:5 (органическая фаза/водная фаза). Из объединенной органической фазы АБК и ИУК реэкстрагировали 1 %-ным раствором гидрокарбоната натрия (Реахим, Россия), взятым в соотношении 1:3 (водная фаза/органическая фаза). Органическую фазу отделяли и отбрасывали, а из водной (после подкисления до рН 2-3) вновь дважды извлекали гормоны диэтиловым эфиром и метилировали их диазометаном (Vysotskaya et al., 2010). В сухом остатке образцов после растворения 80% этиловым спиртом (образцы разводили после эфирной экстракции 80% этанолом и 0.1 М фосфатным буфером, рН 7.4 в соотношении объемов 1:10) определяли содержание ИУК и АБК с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием специфических антител (Vysotskaya et al., 2010, Veselov et al., 2018).

Твердофазный иммуноферментный анализ. Конъюгат фитогормона (ЦК, АБК или ИУК) с овальбумином пассивно абсорбировали на 96-луночном микропланшете в фосфатно-буферном физиологическом растворе хлорида натрия (0.9 % хлорида натрия) (рН 6.8) при 37 °С в течение 1,5 ч. Планшет трижды промывали фосфатно-буферным физиологическим раствором хлорида натрия (0.9 % хлорида натрия), содержащим 0.05 % Tween 20. Затем в каждую лунку

добавляли: 1) 100мкл стандарта гормона в разных концентрациях от 0.01 нг/лунку до 1000 нг/лунку, разведенных в 0.1 М ФБ, рН 7.4; или 2) 100 мкл образца содержащего гормон и добавляли в каждую лунку 100 мкл антисыворотки для каждого фитогормона в своих концентрациях, разведенной в физиологическом растворе хлорида натрия, содержащем 0.05% Твин 20 и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) (рН 7,2), и инкубировали 1 ч при 37°C. Несвязанную кроличью антисыворотку отмывали и 1:5000 козьего антикроличьего IgG, конъюгированного с пероксидазой, инкубировали с абсорбированным комплексом антиген-антитело в течение 1 ч при 37°C. Все лунки промывали и добавляли раствор субстрата, состоящий из о-фенилендиамина (1 г/л): 0.3 М ФБ, рН 5:3% перекиси водорода в соотношении 10 мг:20 мл:15 мкл. Субстрат разливали в лунки по 200 мкл в каждую лунку планшета. Цветная реакция развивалась в течение 15-30 мин, затем ее останавливали 4N H₂SO₄ (по 50 мкл в лунку). Оптическую плотность измеряли на приборе Benchmark Microplate Reader (BioRad, США) при длине волны 490 нм. Содержание гормонов в культуральной жидкости бактерий обсчитывали по калибровочной кривой и выражали в мкг на мл среды.

2.6 Молекулярно-биологические методы

2.6.1 Выделение ДНК из бактерий

Геномную ДНК из культуральной среды бактерий выделяли лизирующим буфером, содержащим 1% смолы Chelex 100 (Biorad, США), 1% тритона X100, 1% Tween 20, 0.005% крезолового красного (Rumyantsev et al., 2023).

2.6.2 Идентификация генов липопептид-синтаз методом ПЦР

Идентификацию генов липопептид-синтаз: сурфактин-синтазы *Srf* (EU882341), итурин-синтаз *ituA* (D21876.1) и *ituB* (KR149331), и фенгицин-синтазы *fenD* (AJ011849) у бактериальных штаммов и изолятов осуществляли с

помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными праймерами в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ДНК-Технологии, Россия). В качестве внутреннего контроля использовали праймеры к гену *Bac* (NR102783), кодирующему 16S РНК бактерий рода *Bacillus*. Последовательности праймеров для бактериальных генов представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 Нуклеотидные последовательности праймеров, бактериальных генов, кодирующих липопептид-синтазы

Ген	Номер из GenBank	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
<i>Bs_srf</i>	EU882341	F – ATGAAGATTTACGGAATTTATATG R – TTATAAAAGCTCTTCGTACGAG
<i>Bs_ituA</i>	D21876.1	F – ATGAAAATTTACGGAGTATATATG R – TTATAACAGCTCTTCATACGTT
<i>Bs_ituB</i>	KR149331	F – AAGAAGGCGTTTTTCAAGCA R – CGACATACAGTTCTCCCGGT
<i>Bs_fenD</i>	AJ011849	F – TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT R – GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC
<i>Bs_Bac</i>	NR102783	F – ACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC R – GGCGGAAACCCCTAACACT

Продукты ПЦР разделяли в 7%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием маркерной ДНК Gene Ruler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США) в электрофоретической камере Mini-Protean II Electrophoretic Ct-II (BioRad, США). Источниками питания служил прибор Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия). В качестве буферной системы использовали TAE-буфер, содержащий 40 мМ трис-ацетата (рН 7.6) и 2 мМ ЭДТА. При разделении фрагментов ДНК электрофорез проводили при напряжении 120 В течение 30 мин. Гели после окрашивания в 0.5%-ном растворе этидия бромидом фотодокументировали на системе Gel Camera System (BioRad, США).

2.6.3 Идентификация генов Cry-белков методом ПЦР

Идентификацию генов Cry-белков *BtcryIIa*, *Btcry4A* и *BtcryIAb* у бактериальных штаммов *B. thuringiensis* осуществляли с помощью ПЦР с геноспецифичными праймерами представленными в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 Нуклеотидные последовательности праймеров, бактериальных генов, кодирующих Cry-белки

Ген	Номер из GenBank	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
<i>BtcryIIa</i>	X62821.1	F – AGGTATTGGTATTGCGGGTAAAA R – TGTA AAACTTGGATGCGGATGTA
<i>Btcry4Aa</i>	AB250380.1	F – TACTTCATCCGCATCCGTTAC R – TTCAGTGCCATACCCAGTTC
<i>BtcryIAb</i>	X54939.1	F – TAGGTCAGGGCGTGTATAGAA R – CTGTCCCGTCAAGAACAGATAG

В качестве внутреннего контроля использовали праймеры к гену *Bac* (NR102783), кодирующему 16S РНК бактерий рода *Bacillus*, последовательность которых представлена в Таблице 2.1. Продукты ПЦР разделяли в 7%-ном ПААГ, окрашенным бромистым этидием, с использованием маркерной ДНК Gene Ruler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

2.6.4 Выделение и очистка РНК из растений

Для изучения экспрессии генов отбирали листья растений пшеницы каждого варианта обработки (по пять растений на биологическую повторность) через 1 и 3 суток после заселения тлей и фиксировали в жидком азоте. Тотальную РНК пшеницы экстрагировали с использованием реагента TRIzol™ (Merck KGaA,

Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкциями производителя. Trizol добавляли в соотношении 1: 10 (вес/объем) и тщательно гомогенизировали. Затем экстракт центрифугировали в течение 15 минут при 12000 об/мин при 4°C на центрифуге 5415R centrifuge (Eppendorf, Германия). Водную фазу переносили в чистую пробирку с равным объемом водонасыщенного хлороформа, вновь тщательно перемешивали и центрифугировали при тех же условиях. На заключительном этапе выделения добавляли изопропанол и оставляли при -20°C в течение 1 ч для образования осадка РНК. РНК осаждали центрифугированием перед использованием, также промывали 70%-ным этанолом и растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды. Все процедуры с РНК проводились при 4°C. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при A260/A280.

Потенциально загрязняющую ДНК расщепляли ДНКазой I (Синтол, Россия). кДНК первой цепи была синтезирована с использованием обратной транскриптазы M-MLV (Fermentas, Литва). В качестве праймера использовали Oligo(dT)15, а реагенты обратной транскрипции инкубировали при 37°C в течение 1 ч в общем объеме 25 мкл. После десятикратного разведения 2 мкл синтезированной кДНК использовали для количественной ПЦР в реальном времени .

2.6.5 Количественная ПЦР в реальном времени

Количественную ПЦР проводили с использованием набора предварительно определенных реагентов EvaGreenI (Synthol, Москва, Россия) и устройства CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). Программа количественной ПЦР была следующей: 95°C в течение 5 мин; 40 циклов при 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 20 с и 72°C в течение 30 с.

После заключительного цикла ПЦР проводили анализ кривой плавления для определения специфичности реакции (при 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 1

мин и 95°C в течение 15 с). ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров для генов представленных в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 Нуклеотидные последовательности праймеров, растительных генов

Белок/ Ген	Номер из GenBank	Нуклеотидная последовательность	Размер ампликона, п.н.	Ссылка
PR-1 / <i>TaPr1</i>	AF384143	F 5'- ataacctcggcgtcttcac- 3' R 5'- gcttattacggcattccttt- 3'	201	Chen et al., 2008
PR-2 / <i>TaD-GLU</i>	<i>DQ090946</i>	F 5'- gcgtgaaggtggtgatt- 3' R 5'- gtgcccgttacacttgat- 3'	352	Chen et al., 2008
PR-3 / <i>TaChiI</i>	AB029936.1	F 5'- acctccttggcgtcagct- 3' R 5'- tcgaccattattccctt- 3'	173	Chen et al., 2008
PR-6 / <i>TaPI</i>	EU293132.1	F 5'-ggggccctgcaagaagtactg-3' R 5'-acacgcataggcacgatgac-3'	106	Adhikari et al., 2007
PR-9 / <i>TaPrx</i>	TC 151917	F 5'-tcgacaagcagtactaccaca-3' R 5'-ccgaagtccgagaagaactg-3'	157	Максимов и др., 2013
ингибитор РНКаза / <i>TaRLI(a)</i>	Ta2776	F 5'- ttgagcaactcatggaccag- 3' R 5'- gctttccaaggcacaacaat- 3'	86	Gimenez et al., 2010

Для нормализации результатов экспрессии исследуемых генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессируемого белка, который является ингибитором рибонуклеазы пшеницы (подобным ингибитору РНКазы L от RNase L inhibitor-like) (*TaRLI*, GenBank Accession No. AY059462) (Gimenez et al., 2011) (табл.2.3).

Все праймеры были разработаны с помощью онлайн ресурса IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home>). Эффективность каждой пары праймеров определяли с использованием серии 10-кратных разведений кДНК. Все

реакции, включая нематричный контроль, проводили трижды. Пороговые значения (СТ), полученные с помощью программного инструмента системы обнаружения ПЦР в реальном времени CFX Connect (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США), использовали для количественной оценки относительной экспрессии генов с использованием метода сравнительного порога (дельта-дельта СТ) (Rumyantsev et al., 2023). Для каждого эксперимента выполняли три независимых биологических и три технических повтора.

2.7 Статистическая обработка результатов

Все эксперименты повторяли 3 раза и проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторах (общее $n = 9$), кроме тестов на выносливость растений, где эксперименты включали в себя не менее 10 биологических повторов (общее $n = 30$), тесты на эндифитность проводили в 20 биологических повторах. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в соответствии с тестом Дункана при доверительном уровне $p \leq 0.05$ с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Эндофитность бактерий, их метаболиты и составление бактериальных смесей для повышения устойчивости пшеницы к злаковой тле

3.1.1 Оценка способности некоторых перспективных бактерий *Bacillus* spp. из коллекции ИБГ УФИЦ РАН колонизировать внутренние ткани растений пшеницы (эндофитность) и синтезировать различные метаболиты

Эффективным способом повышения устойчивости зерновых культур к тлям является применение биологических препаратов на основе стимулирующих рост растений бактерий (СРРБ), особенно эндофитных – способных мутуалистически жить внутри растительных тканей и формировать длительную защиту хозяина от стрессовых факторов окружающей среды, которая известна под термином прайминг (Максимов и др., 2015; Conrath et al., 2006; Rashid, Chung, 2017; Tiwari et al., 2022; Yu et al., 2022).

В настоящее время многие исследователи полагают, что эндофиты защищают растения от стресса посредством механизмов прямого или косвенного защитного воздействия на вредные организмы за счет синтеза и секреции разнообразных метаболитов (Oukala et al., 2021, Xia et al., 2022). Непосредственное действие эндофитов осуществляется за счет биоцидной активности некоторых метаболитов (бактериоцинов, биосурфактантов, ЛП, различных ферментов и др.). Косвенное действие выражается в способности эндофитов стимулировать ростовые процессы в растениях, улучшать иммунную систему растений и выстраивать стойкую защиту хозяина от вредных организмов, известную как прайминг (Rashid, Chung, 2017; Xia et al., 2022).

Бактерии *Bacillus* spp. известны своей способностью синтезировать широкий спектр разнообразных метаболитов (Miljakovic et al., 2020). У

бактерий рода *Bacillus* метаболитами с антибиотической активностью являются в основном антимикробные пептиды (Ongena, Jacques, 2008; Miljakovic et al., 2020). Благодаря этим веществам бактерии рода *Bacillus* обладают комплексной бактерицидной, фунгицидной и инсектицидной активностью (Максимов и др., 2015; Ongena, Jacques, 2008; Miljakovic et al., 2020). Классическими метаболитами бактерий рода *Bacillus* в защите растений от насекомых вредителей являются инсектотоксичные Cry-белки (Araújo, 2015; Mishra et al., 2022). В настоящее время активно изучаются инсектицидные свойства ЛП бактерий *Bacillus* spp. и достигнуты некоторые успехи. Стали появляться работы, в которых показана инсектицидная активность ЛП против отрядов Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera (Максимов и др., 2020; Yang et al., 2017; Rodríguez et al., 2018; Maksimov et al., 2020a; Denoirjean et al., 2021). Ростстимулирующую активность бактерий обычно связывают с синтезом ими гормонов, таких как ауксины (в том числе ИУК), ЦК, АБК, СК и ЖК (Kudoyarova et al., 2019; Miljakovic et al., 2020).

В работе использовали бактерии из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: три штамма *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. subtilis* Ttl2, три штамма *B. thuringiensis* В-5689, В-5351 и В-6066 и два изолята *Bacillus* sp. выделенные из листьев пшеницы *Bacillus* sp. Tas1 и Tas8.2. и один – из листьев картофеля *Bacillus* sp. Stl7, произраставших на территории Республики Башкортостан. Всего 9 штаммов и изолятов.

В данной работе была оценена эндофитность семи бактериальных штаммов и изолятов с использованием стерильных пробирочных растений пшеницы (табл. 3.1). Бактерии *B. subtilis* 26Д обнаружены в тканях растений пшеницы в количестве 173×10^4 КОЕ/г сырой массы, среди изученных бактерий этот штамм показал самую высокую способность проникать в ткани пшеницы и размножаться там (табл. 3.1). Количество КОЕ у *B. subtilis* Ttl2 и *B. thuringiensis* В-5689 было примерно одинаковым ($50-60 \times 10^4$ КОЕ/г сырой массы) (табл. 3.1). Способность *Bacillus* sp. Stl7 колонизировать внутренние ткани растений была на порядок меньше, а у штаммов *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-5351 и *B.*

thuringiensis В-6066 – на два порядка меньше, чем у штамма *B. subtilis* 26Д (табл. 3.1).

Таблица 3.1 Титр бактерий во внутренних тканях пшеницы и активность рибонуклеаз в культуральной среде девяти штаммов и изолятов рода *Bacillus*

Штаммы и изоляты	Титр бактерий, КОЕ×10 ⁴ / г сырой массы	Активность РНКаз в КЖ, оп. ед. / мл×мин
<i>B. subtilis</i> 26Д	173 ± 23a	5.23 ± 0.25a
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	6 ± 0.5b	3.04 ± 0.55b
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	н/д*	2.45 ± 0.26b
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	н/д	2.56 ± 0.38b
<i>B. subtilis</i> Ttl2	63 ± 7c	4.25 ± 0.56ab
<i>Bacillus</i> sp. Stl7	25 ± 3d	5.87 ± 0.96a
<i>B. thuringiensis</i> В-5351	6.9 ± 1b	1.32 ± 0.08c
<i>B. thuringiensis</i> В-6066	1.5 ± 0.3e	6.02 ± 0.86a
<i>B. thuringiensis</i> В-5689	51 ± 5c	2.64 ± 0.04b

Примечание: * н/д – нет данных. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

В настоящее время к эндофитам отнесено более 200 видов бактерий из родов *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Penibacillus* и др. (Rana et al., 2020). Для рода *Bacillus* sp., свойство эндофитности можно считать доказанным (Максимов и др., 2018). Напротив, сообщений об эндофитах *B. thuringiensis* очень мало. Так, штамм *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 успешно заселял ткани хлопчатника, длительное время в них размножался и оказывал токсическое действие по отношению к гусеницам совки (*S. exigua*) (Prasa et al., 2012). Также эндофитные штаммы *B. thuringiensis* были выделены из озимой пшеницы в Китае (Tao et al., 2014).

Таким образом, результаты данной работы показали, что изученные бактериальные штаммы и изоляты способны заселять внутренние ткани растений пшеницы, но в разной степени (Веселова и др., 2022). Выдвигается предположение, что свойство эндофитности позволяет бактериям синтезировать их метаболиты внутри растительных организмов, что дает эндофитам большое преимущество перед ризосферными и филосферными микроорганизмами (Sorokan et al., 2020).

Далее в работе была изучена способность девяти штаммов и изолятов синтезировать некоторые метаболиты, которые могут влиять на контроль численности насекомых-вредителей и индуцировать защиту растений против них.

Показано, что бактерии с высокой рибонуклеазной (РНКазной) активностью могут подавлять размножение вирусных частиц в растительных тканях (Sorokan et al., 2020; Veselova et al., 2022), а, как известно насекомые являются переносчиками многих вирусных болезней растений (Garzo et al., 2020). Насекомые являются крупнейшим классом переносчиков вирусов растений. Насекомые отряда Hemiptera — это насекомые с колюще-сосущим ротовым аппаратом, которые питаются флоэмным или ксилемным соками растений через стилеты — видоизмененный ротовой аппарат, используемый для проникновения в ткани растения. Их пищевое поведение сделало представителей отряда Hemiptera наиболее эффективными переносчиками вирусов растений. Известно, что они способны переносить более 70% всех известных вирусов, передающихся насекомыми (Garzo et al., 2020). Тля (Hemiptera: Aphididae) и белокрылки (Hemiptera: Aleyrodidae) являются основными переносчиками вирусов растений, передавая более 500 видов вирусов (Garzo et al., 2020). Так, было показано, что растения гороха, инфицированные вирусом мозаики гороха (PEMV – pea enation mosaic virus), сильнее подвергались нападению гороховой листовертки *Sitona lineatus* и затем гороховая тля *Acyrtosiphon pisum* – переносчик PEMV – преимущественно

поражала растения, ранее повреждённые *S. lineatus*, тем самым увеличивалось распространение вируса (Chisholm et al., 2018).

Высокую активность РНКаз обнаружили у штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* Ttl2, *B. thuringiensis* B-6066 и изолята *Bacillus* sp. Stl7 (табл. 3.1). Штаммы *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* B-5351, *B. thuringiensis* B-5689 и изоляты *Bacillus* sp. Tas8.2, *Bacillus* sp. Tas1 обладали меньшей, по сравнению с вышеперечисленными штаммами РНКазной активностью и показали среднюю активность внеклеточных РНКаз (табл. 3.1).

Сорокань с соавторами (2020) показали, что бактериальные штаммы, сочетающие в себе высокую РНКазную активность и высокую способность колонизировать внутренние ткани растений картофеля, сильнее остальных снижали заболеваемость вирусами картофеля М, S и Y и уменьшали численность личинок и взрослых имаго колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) на растениях картофеля в полевых условиях (Sorokan et al., 2020).

Также в работе было проанализировано содержание ЦК, ИУК и АБК в культуральной среде восьми штаммов и изолятов рода *Bacillus* (все кроме *B. thuringiensis* B-5689) (табл. 3.2).

В недавних обзорах хорошо описаны механизмы стимуляции роста растений эндофитами, в том числе при биотическом стрессе, которые связывают с прямым и косвенным эффектом (Eid et al., 2021; Chaudhary et al., 2022). Прямой эффект связывают с синтезом фитогормонов бактериями и доступностью питательных элементов, а косвенный эффект связывают с синтезом антибиотических метаболитов и запуском системной устойчивости (Miljakovic et al., 2020; Eid et al., 2021; Chaudhary et al., 2022).

Среди изученных штаммов и изолятов рода *Bacillus* не обнаружены супер-продуценты ауксинов и ЦК, скорее всего, из-за того, что все штаммы и изоляты были эндофитами. Вместе с тем, все штаммы и изоляты продуцировали в той или иной степени данные гормоны (табл. 3.2).

Так, наибольшее содержание ЦК было обнаружено в культуральной среде штамма *B. subtilis* 26Д и изолята *Bacillus* sp. Tas8.2, а наибольшее содержание ИУК было обнаружено в культуральной среде штаммов *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и *B. thuringiensis* В-5351 и изолята *Bacillus* sp. Stl7 (табл. 3.2). Наименьшее количество ЦК и ИУК содержали изолят *Bacillus* sp. Tas1 и штамм *B. thuringiensis* В-6066 (табл. 3.2). АБК продуцировал только один изолят *Bacillus* sp. Stl7 (табл. 3.2).

Таблица 3.2 Содержание фитогормонов в культуральной среде восьми штаммов и изолятов рода *Bacillus*

Штаммы и изоляты	Фитогормоны, нг/мл КЖ		
	ЦК	ИУК	АБК
<i>B. subtilis</i> 26Д	150 ± 12a	110 ± 11a	0.0a
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	70 ± 6b	310 ± 24b	0.0a
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	130 ± 15a	120 ± 10a	0.0a
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	50 ± 3b	70 ± 8c	0.0a
<i>B. subtilis</i> Ttl2	80 ± 4b	350 ± 326b	0.0a
<i>Bacillus</i> sp. Stl7	60 ± 6b	470 ± 41bd	40 ± 3
<i>B. thuringiensis</i> В-5351	50 ± 3b	580 ± 50d	0.0a
<i>B. thuringiensis</i> В-6066	50 ± 5b	120 ± 13a	0.0a
Культуральная среда	0.0	0.0	0.0a

Примечание: КЖ – культуральная жидкость. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Так, было показано, что инокуляция растений цитокинин-продуцирующими бактериями приводила к увеличению содержания хлорофилла, накоплению цитокининов и увеличению массы побегов и корней, а ауксин-продуцирующие бактерии способствовали стимуляции развития корневой системы, что позволяло растениям более активно поглощать воду и

питательные вещества, и усиливало устойчивость к болезням (Kudoyarova et al., 2019).

Восемь штаммов и изолятов рода *Bacillus* (все кроме *B. thuringiensis* В-5689) были протестированы на наличие генов липопептид-синтаз (рис. 3.1).

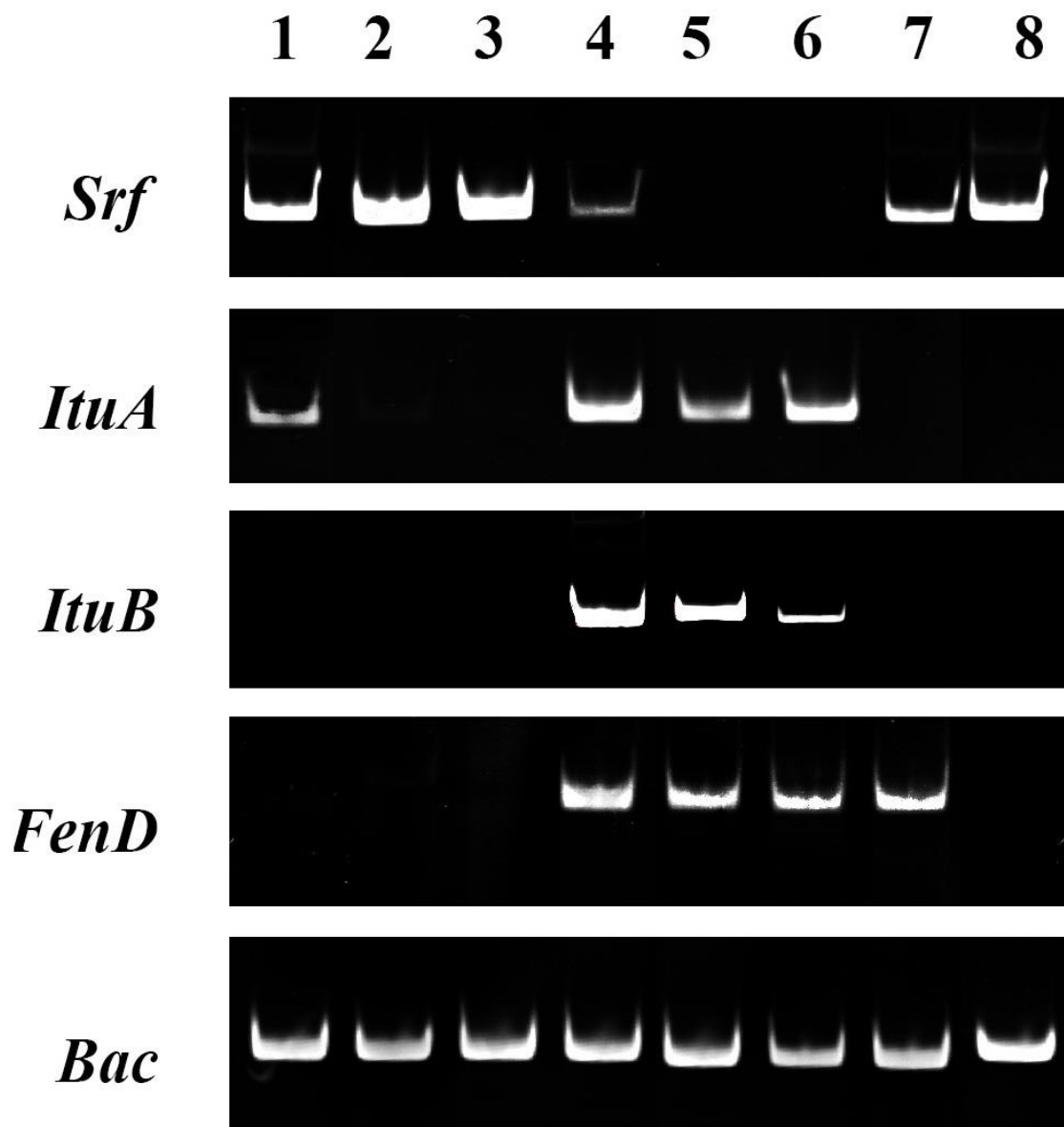


Рисунок 3.1 – ПЦР анализ бактерий рода *Bacillus* на наличие генов, кодирующих липопептид-синтазы: *Srf* – сурфактин-синтазу, *ItuA* и *ItuB* – итурин-синтазы, и *FenD* – фенгицин-синтазу, *Bac* – референсный ген. Обозначения на рисунке: 1 – *B. subtilis* 26Д; 2 – *Bacillus* sp. Tas8.2; 3 – *Bacillus* sp. Tas1; 4 – *B. subtilis* 11ВМ; 5 – *B. subtilis* Ttl2; 6 – *Bacillus* sp. Stl7; 7 – *B. thuringiensis* В-6066; 8 – *B. thuringiensis* В-5351.

У штамма *B. subtilis* 26Д и штамма *B. thuringiensis* В-5351 и изолятов *Bacillus* sp. Tas8.2 и Tas1 были обнаружены гены биосинтеза сурфактина (рис. 3.1). Дополнительно у штамма *B. subtilis* 26Д был обнаружен ген итуринсинтазы А (рис. 3.1). У штаммов *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и изолята *Bacillus* sp. Stl7 были обнаружены гены биосинтеза итурина и фенгицина (рис. 3.1). Дополнительно у штамма *B. subtilis* 11ВМ был обнаружен ген сурфактинсинтазы (рис. 3.1). У штамма *B. thuringiensis* В-6066 были обнаружены гены биосинтеза сурфактина и фенгицина (рис. 3.1).

Ранее в других исследованиях также проводился геномный анализ бактериальных штаммов на наличие генов нерибосомальных липопептидсинтаз (Rodriguez et al., 2018). Например, у бактериального штамма *B. atropaeus* L193 с помощью ПЦР обнаружили гены биосинтеза фенгицина, сурфактина, бацилломицина и итурина (Rodriguez et al., 2018). Причем геномный анализ совпал с результатами времяпролетной масс-спектрометрии, которая применялась в сочетании с ВЭЖХ (Rodriguez et al., 2018).

Широко используемым методом идентификации и определения липопептидов является ВЭЖХ на колонках с обращенно-фазовым сорбентом (Cao et al., 2012). ЛБФ из двух штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ были выделены с помощью этанольной экстракции, которая обычно применяется для выделения пептидов (Waewthongrak et al., 2014; Tunsagool et al., 2019). ЛП в этих фракциях были проверены с помощью ВЭЖХ.

ВЭЖХ-анализ фракции ЛП, выделенных из культуральной жидкости бактерий *B. subtilis* 26Д, выявил в их составе соединение со временем удержания R_t около 4.5 мин, равный по подвижности коммерческому сурфактину (рис. 3.2, Б). Таким образом, согласно данным ПЦР (рис. 3.1) и ВЭЖХ-анализа (рис. 3.2) основным ЛП, продуцируемым *B. subtilis* 26Д является сурфактин. У ЛП бактерий *B. subtilis* 11ВМ обнаружили 3 ЛП с другими характеристиками подвижности на колонке (рис. 3.2, В, Е). Культуральный фильтрат штамма *B. subtilis* 11ВМ содержал ЛП, который был

равен по подвижности коммерческому итурину, время удержания R_t составило примерно 2.5 мин (рис. 3.2, Е).

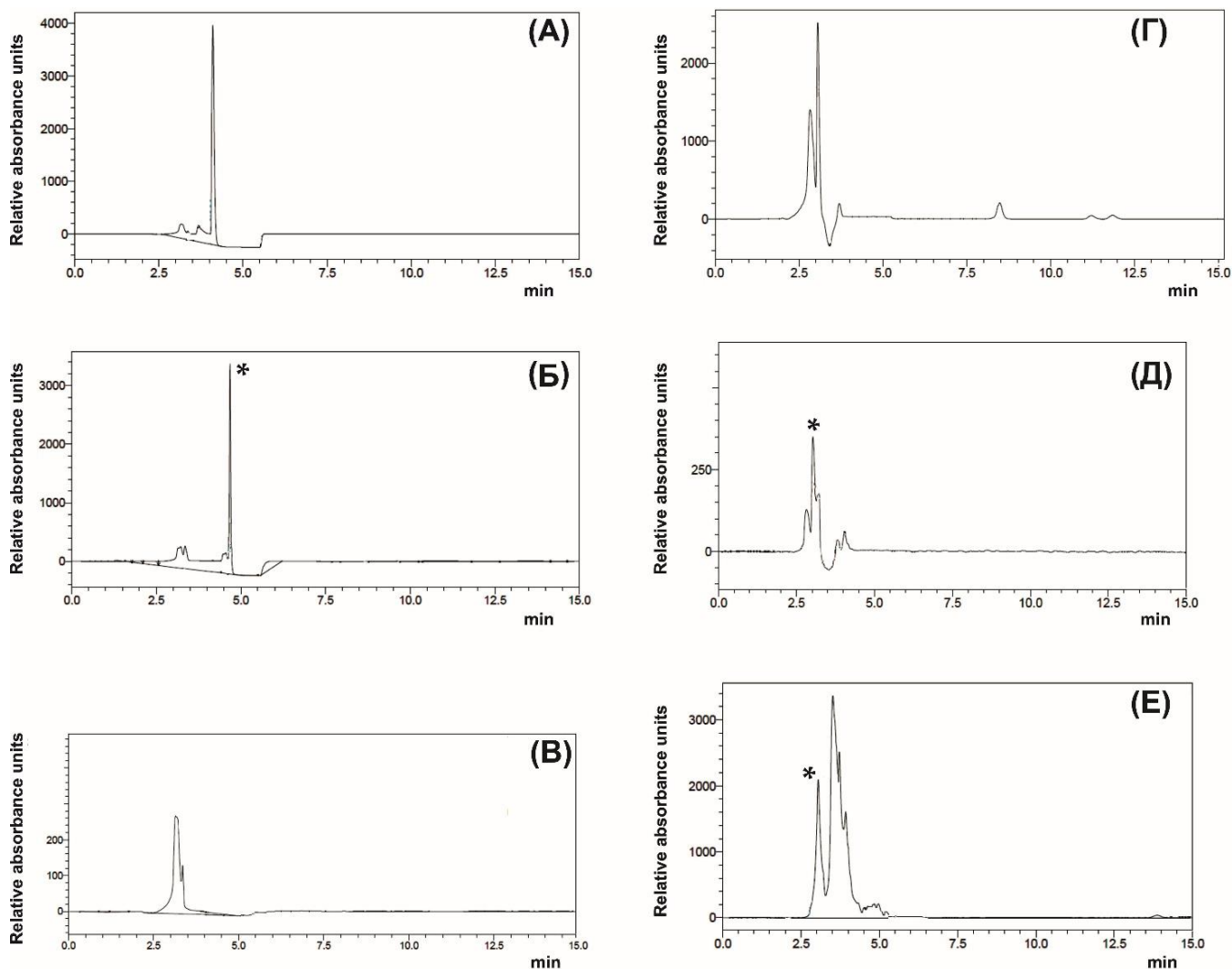


Рисунок 3.2 – Хроматографические профили ВЭЖХ-анализа препаратов бактериальных липопептидов ($\lambda=210$ нм). (А) - коммерческий сурфактин (Sigma-Aldrich, США; 0.1 мг/мл); (Б) и (Д) - липопептид-содержащая фракция культуральной жидкости *B. subtilis* 26Д; (Г) – коммерческий итурин (Sigma-Aldrich, США; 0.1 мг/мл); (В) и (Е) - липопептид-содержащая фракция *B. subtilis* 11ВМ. (А, Б и В) - элюент 1 (вода:уксусная кислота 0.1% в соотношении 60:40), (Г, Д и Е) - элюент 2 (ацетонитрил:уксусная кислота 0.1% в соотношении 40:60). Звездочкой (*) отмечены пики, соответствующие в образцах ЛБФ коммерческим сурфактину (Б) и итуруину (Д, Е).

Учитывая то, что анализ ПЦР показал наличие в геноме бактерий *B. subtilis* 11ВМ гена итурин-синтазы, можно с большой степенью вероятности предполагать, что мажорным ЛП, синтезируемым клетками этих бактерий является итурин (рис. 3.2, Е). Также в ЛБФ двух штаммов были обнаружены минорные ЛП (рис. 3.2, В, Д), что также совпадает с данными ПЦР анализа (рис. 3.1) (Alekseev et al., 2021; Romyantsev et al., 2023). Анализ-ВЭЖХ применяли и в других работах для подтверждения синтезируемых бактериями ЛП (Waewthongrak et al., 2014; Tunsagool et al., 2019).

Три штамма *B. thuringiensis* В-5689, В-5351 и В-6066 были протестированы на наличие генов Cry-белков (рис. 3.3).

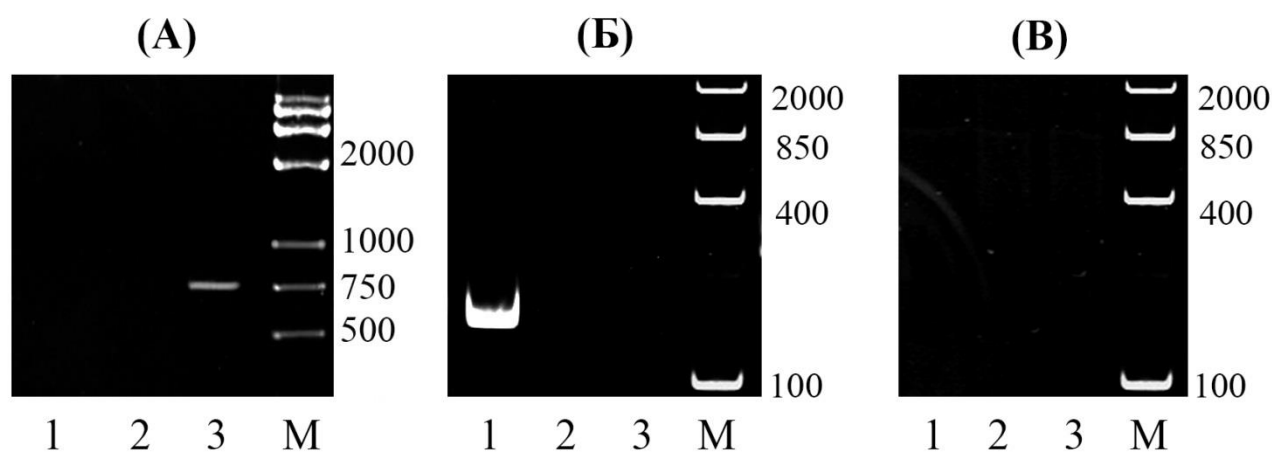


Рисунок 3.3 – ПЦР анализ трех штаммов *B. thuringiensis* на наличие генов кодирующих Cry-белки. (А) – фрагменты гена *BtcryIIa*; (Б) - фрагменты гена *BtcryIAb*; (В) - фрагменты гена *Btcry4Aa*. Обозначения на рисунке: 1 – *B. thuringiensis* В-6066; 2 – *B. thuringiensis* В-5689; 3 – *B. thuringiensis* В-5351; М – ДНК-маркеры, 100–5000 п.н.

Ранее была показана высокая токсичность CryIIa-белка по отношению к личинкам совки *Spodoptera frugiperda* и хлопкового долгоносика *Anthonomus grandis*, насекомым из отрядов чешуекрылых и жесткокрылых (Martins et al., 2008). Однако молекулярное моделирование CryIIa-белка показало, что этот белок имеет структуру, аналогичную белку Cry3A (Martins et al., 2008). Позднее Porcar с соавт. тестировали несколько Cry-токсинов на гороховой тле *A. pisum* и

показали, что все протестированные Cry δ -эндотоксины Cry3A, Cry4Aa, Cry11Aa и Cry1Ab были летальными для *A. pisum* и задерживали рост выживших насекомых (Porcar et al., 2009). Смертность колебалась от 40% (Cry1Ab) и 60% (Cry3A) до 100% (Cry4Aa и Cry11Aa) после 3–6 дней воздействия белка (Porcar et al., 2009). Однако, чтобы получить такой эффект приходилось применять очень высокие концентрации токсинов до 500 мкг/мл солюбилизированного белка, что говорило о средней токсичности этих белков по отношению к тле. Для проверки штаммов *B. thuringiensis* в данной работе были выбраны три гена, кодирующие белки Cry1Aa, Cry4Aa и Cry1Ab (рис. 3.3). Поскольку изученные в работе штаммы являются эндофитами и способны циркулировать по флоэме, большие концентрации Cry-токсинов не требуются.

У штамма *B. thuringiensis* В-5351 был обнаружен ген *Btcry11a* (рис. 3.3, А), у штамма *B. thuringiensis* В-6066 был обнаружен ген *Btcry1ab* (рис. 3.3, Б). Ген *Btcry4Aa* не был обнаружен ни у одного из трех изученных штаммов *B. thuringiensis*. У штамма *B. thuringiensis* В-5689 не было обнаружено изучаемых генов Cry-белков, кроме того, эффект этого штамма на обыкновенную злаковую тлю уже был изучен (Веселова и др., 2019), поэтому в дальнейшую работу его не взяли.

Таким образом, было выдвинуто предположение, что продукция ЛП, фитогормонов и РНКаз может играть важную роль в полезных свойствах бактериальных штаммов для разработки биопрепаратов с комплексной активностью для защиты растений от патогенов и вредителей. Все эндофитные штаммы и изоляты бактерий, изученные в данной работе, являются перспективными для создания таких биопрепаратов.

Наибольшую способность размножаться во внутренних тканях растений пшеницы показал штамм *B. subtilis* 26Д, также он обладал высокой РНКазной активностью и синтезировал сурфактин и ЦК (табл. 3.1, 3.2, рис. 3.1, 3.2). Штамм *B. subtilis* Ttl2 и изолят *Bacillus* sp. Stl7 проявили сходные свойства, показав высокую РНКазную активность, среднюю эндофитность и синтез итуринов, фенгицина и ИУК (табл. 3.1, 3.2, рис. 3.1). Штамм *B. thuringiensis* В-

5351 синтезировал сурфактин, ИУК и CryIIa-белок, но показал низкую эндофитность и РНКазную активность (табл. 3.1, 3.2, рис. 3.1, 3.3). Штамм *B. thuringiensis* В-6066 синтезировал сурфактин и фенгицин, CryIAb, обладал высокой РНКазной активностью, но показал низкую эндофитность и синтезировал гормоны в малых количествах (табл. 3.1, 3.2, рис. 3.1, 3.3). Выдвигается гипотеза, что некоторые недостатки отдельных штаммов можно исправить при составлении бактериальных смесей.

3.1.2 Подбор концентраций эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* и их липопептид-богатых фракций стимулирующих рост пшеницы

Известно, что СРРБ, в том числе эндофиты могут активно влиять на рост растений, что связано с выработкой ими фитогормонов, а также способностью опосредованно запускать в растениях каскад биохимических процессов, включая накопление эндогенных фитогормонов (Kudoyarova et al., 2019).

В связи с этим нам необходимо было определить рост-стимулирующие концентрации бактериальных штаммов. Для этого были проведены испытания по определению влияния бактериальных штаммов, изолятов и их ЛБФ на энергию прорастания и всхожесть семян, а также на прирост сырой и сухой биомассы растений пшеницы (табл. 3.3, табл. 3.4). Данная методика предназначена для определения эффективности стимулирующих препаратов в лабораторных условиях при использовании в качестве тест-объекта высших растений (Алексеев и др., 2022).

В работе были использованы семена мягкой яровой пшеницы сорта Салават Юлаев с 90% всхожестью. Обработка семян бактериальными штаммами и изолятами повышала всхожесть семян почти на 10% от уровня контроля, наибольший эффект оказал штамм *B. subtilis* 26Д, также высоко стимулировали всхожесть штаммы *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и изоляты *Bacillus* sp. Tas1и *Bacillus* sp Stl7 (табл. 3.3).

Таблица 3.3 Влияние бактериальных штаммов и изолятов рода *Bacillus* на всхожесть семян и прирост биомассы проростков пшеницы

Бактериальный штамм/ изолят	Концентрация, мкл/ г семян	Всхожесть, %	Сырая масса одного проростка, мг	Сырая масса одного проростка, % от контроля	Сухая масса одного проростка, мг	Сухая масса одного проростка, % от контроля
Контроль	-	90.0 ± 2.8a	62.5 ± 7.2a	100 ± 10a	5.4 ± 0.5a	100 ± 9a
<i>B. subtilis</i> 26Д	1	90.1 ± 2.9a	66.7 ± 1.5b	107 ± 1b	6.3 ± 0.1b	116 ± 2b
	2*	99.6 ± 2.5b	80.2 ± 3.2c	129 ± 5c	7.1 ± 0.1c	132 ± 1c
	3	92.2 ± 3.1a	71.8 ± 7.7d	115 ± 6d	7.1 ± 0.1c	131 ± 1c
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	1*	96.5 ± 2.0c	72.5 ± 1.1d	116 ± 2d	6.8 ± 0.1c	126 ± 1c
	2	94 ± 3.4ac	62.1 ± 0.5a	100 ± 1a	6.0 ± 0.2b	110 ± 3b
	3	90.6 ± 3.6a	66.5 ± 0.3b	107 ± 1b	6.2 ± 0.2b	115 ± 4b
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	1*	95.7 ± 3.8c	86.1 ± 3.1e	138 ± 5e	6.9 ± 0.2c	128 ± 4c
	2	91.0 ± 5.3a	75 ± 2.4cd	121 ± 4cd	6.2 ± 0.1b	115 ± 3b
	3	88.8 ± 1.6a	62.4 ± 1.9a	100 ± 3a	5.7 ± 0.1ab	107 ± 1ab
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	1	81.0 ± 3.3d	62.6 ± 3.4a	100 ± 5a	5.6 ± 1.6a	102 ± 9a
	2*	96.1 ± 4.5c	80.5 ± 1.6c	129 ± 3c	7.1 ± 0.1c	132 ± 1c
	3	91.4 ± 2.0a	73.6 ± 3.0d	118 ± 5d	6.6 ± 0.1bc	122 ± 2bc
<i>B. thuringiensis</i> В-6066	1	91.8 ± 1.4a	69.3 ± 0.3d	111 ± 1d	5.9 ± 0.1b	110 ± 1b
	2*	94.9 ± 5.6c	81.3 ± 3.9c	131 ± 6c	7.1 ± 0.1c	132 ± 2c
	3	92.4 ± 3.3a	61.9 ± 0.2a	100 ± 1a	5.5 ± 0.1a	103 ± 1a
<i>B. thuringiensis</i> В-5351	1	92.1 ± 3.3a	68.7 ± 2.4b	105 ± 4b	5.8 ± 0.3b	107 ± 5b
	2*	94.5 ± 5.2c	78.5 ± 2.8c	120 ± 4c	6.9 ± 0.4c	128 ± 7c
<i>B. subtilis</i> Ttl2	0.5	98 ± 5.0bc	68.3 ± 2.1d	110 ± 3d	6.4 ± 0.2b	119 ± 4b
	1*	98.8 ± 4.8b	79.5 ± 1.9c	127 ± 3c	6.9 ± 0.2c	128 ± 5c
	2	83.4 ± 3.7d	58.1 ± 3.0f	93 ± 5f	5.4 ± 0.5a	100 ± 5a

<i>Bacillus</i> sp. Stl7	0.5	87.3 ± 4.2ad	62.8 ± 1.8a	101 ± 3a	6.2 ± 0.2b	115 ± 3b
	1*	96.7 ± 3.1c	83.4 ± 1.5c	133 ± 2c	7.2 ± 0.2c	133 ± 5c
	2	82.1 ± 4.6d	52.4 ± 3.2g	84 ± 5g	5.3 ± 0.5a	98 ± 8a

Примечание: * - ростстимулирующие концентрации. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Причем влияние бактериальных штаммов на данный показатель зависело от концентрации суспензии. Более высокие концентрации даже подавляли всхожесть семян. Интересно, что штаммы *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и изоляты *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Stl7 стимулировали всхожесть при более низких концентрациях, чем остальные штаммы и изоляты (табл. 3.3).

Влияние ЛБФ из среды культивирования пяти изученных штаммов и изолятов на повышение всхожести семян было ниже, чем бактериальных суспензий – 1 – 7% от уровня контроля (табл. 3.4). Наибольший эффект оказали ЛБФ штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066, вырабатывающие сурфактин, итурин и фенгицин, соответственно. Причем метаболиты штаммов *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 работали в более низких концентрациях, чем таковые штамма *B. subtilis* 26Д (табл. 3.4). Повышение концентрации ЛБФ приводило к подавлению всхожести семян.

Суспензия клеток бактериальных штаммов и изолятов оказывала положительный эффект на прирост сырой и сухой биомассы проростков пшеницы в зависимости от используемой концентрации, которая совпадала с концентрацией стимулирующей всхожесть семян (табл. 3.3). Наибольший эффект на прирост сырой биомассы оказал изолят *Bacillus* sp. Tas8.2, что составило 38% от уровня контроля. На прирост сухой биомассы штаммы и изоляты влияли примерно одинаково, повышая этот показатель примерно на 30% от контроля (табл. 3.3).

Таблица 3.4 Влияние липопептид-богатой фракции (ЛБФ) бактериальных штаммов и изолятов рода *Bacillus* на всхожесть семян и прирост биомассы проростков пшеницы

ЛБФ бактериального штамма/ изолята	Концентрация, мкг/мл	Всхожесть, %	Сырая масса одного проростка, мг	Прирост сырой массы одного проростка, % от контроля	Сухая масса одного проростка, мг	Прирост сухой массы одного проростка, % от контроля
Контроль	-	90.5 ± 3.8a	64.3 ± 10.8a	100 ± 7a	5.8 ± 0.6a	100 ± 8a
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д	0.5	91.0 ± 0.5a	67.8 ± 3.7b	105 ± 6b	6.3 ± 0.1b	109 ± 1b
	1.5	91.5 ± 1.9a	76.6 ± 1.5c	119 ± 2c	7.0 ± 0.2c	121 ± 4c
	2.5*	96.1 ± 4.7b	87.5 ± 6.9d	136 ± 11d	7.4 ± 0.3c	127 ± 6c
	3.5	92.5 ± 1.6a	64.1 ± 2.5a	100 ± 4a	6.2 ± 0.1b	106 ± 1b
	4.5	90.7 ± 1.4a	54.9 ± 1.8e	85 ± 3e	5.7 ± 0.1a	98 ± 2a
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 11ВМ	0.5	93.5 ± 4.9c	98.2 ± 0.8f	153 ± 1f	7.7 ± 0.1c	132 ± 1c
	1.5*	95.9 ± 4.2b	102.0 ± 2.9f	159 ± 5f	8.2 ± 0.1d	142 ± 2d
	2	92.2 ± 4.9a	97.1 ± 0.8f	151 ± 1f	7.8 ± 0.1c	133 ± 1c
	2.5	91.3 ± 1.7a	81.5 ± 0.9c	127 ± 2c	7.1 ± 0.3c	122 ± 6c
	3.5	90.5 ± 1.0a	81.2 ± 1.6c	126 ± 2c	7.1 ± 0.1c	122 ± 2c
	4.5	89.9 ± 2.2a	77.2 ± 1.2c	120 ± 2c	6.3 ± 0.1b	109 ± 2b
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	0.5	90.5 ± 1.0a	75.3 ± 3.2c	117 ± 5c	6.4 ± 0.1b	111 ± 1b
	1	90.8 ± 4.2a	83.9 ± 2.6c	131 ± 4c	7.4 ± 0.1c	127 ± 3c
	1.5	91.2 ± 5.1a	84.9 ± 5.1d	132 ± 8d	7.4 ± 0.1c	127 ± 3c
	2*	93.4 ± 4.8c	98.0 ± 0.5f	152 ± 1f	7.7 ± 0.1c	132 ± 2c
	2.5	91.4 ± 3.8a	87.5 ± 6.6d	136 ± 10d	7.5 ± 0.2c	129 ± 3c
	3.5	90.2 ± 1.0a	60.8 ± 1.0a	94 ± 2a	6.0 ± 0.2a	103 ± 3a
	4.5	90.0 ± 0.5a	55.6 ± 1.3e	86 ± 2e	6.4 ± 0.1b	110 ± 1b
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas1	0.5	91.0 ± 0.9a	64.8 ± 1.8a	101 ± 3a	5.6 ± 0.1a	97 ± 1a
	1.5	91.2 ± 6.8a	69.4 ± 5.5b	108 ± 9b	6.4 ± 0.7b	110 ± 8b

ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas1	2	91.5 ± 5.0a	86.7 ± 4.3d	135 ± 7d	7.3 ± 0.4c	126 ± 7c
	2.5*	93.5 ± 4.9c	94.8 ± 6.9f	148 ± 11f	8.0 ± 0.3d	138 ± 5d
	3.5	87.0 ± 1d	81.5 ± 1.8c	127 ± 3c	6.4 ± 0.1b	110 ± 1b
	4.5	86.5 ± 0.5d	75.7 ± 1.3c	118 ± 2c	6.1 ± 0.2b	105 ± 3b
ЛБФ <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> B-6066	0.5	91.2 ± 1.8a	75.0 ± 0.1c	117 ± 1c	6.0 ± 0.1a	103 ± 1a
	1	92.0 ± 4.8a	98.0 ± 4.0f	152 ± 6f	7.8 ± 0.2c	135 ± 3c
	1.5*	94.5 ± 1.6b	102.3 ± 1.7f	159 ± 3f	8.4 ± 0.5d	144 ± 9d
	2.5	91.0 ± 1.6a	71.2 ± 0.5b	111 ± 1b	5.9 ± 0.1a	101 ± 1a
	3.5	88.5 ± 0.7d	70.4 ± 4.3b	110 ± 7b	6.0 ± 0.1a	103 ± 2a
	4.5	82.0 ± 1.8e	61.4 ± 0.9a	96 ± 1a	5.5 ± 0.1a	94 ± 1a

Примечание: * - ростстимулирующие концентрации. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Интересно, что ЛБФ изученных бактериальных штаммов и изолятов обладали более высокой способностью стимулировать накопление как сырой, так и сухой биомассы проростков по сравнению с суспензионными бактериальными культурами, также зависящей от использованной концентрации (табл. 3.4). Так прирост сырой биомассы повышался на 36 – 59 %, а сухой биомассы на 27 – 44% по сравнению с контролем (табл. 3.4).

Наибольший эффект оказали ЛБФ штаммов *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* B-6066, также высоко стимулировали прирост биомассы изоляты *Bacillus* sp. Tas1 и *Bacillus* sp. Tas8.2 (табл. 3.4). Такие результаты могут служить доказательством рост-стимулирующего эффекта выделенных ЛБФ (Alekseev et al., 2021; Алексеев и др., 2022).

3.1.3 Составление комбинаций бактерий, определение их эндофитности и рост-стимулирующих концентраций

Несмотря на то, что у одних и тех же бактерий рода *Bacillus* обнаруживают нескольких хозяйственно-полезных свойств, в защите растений

обычно используют штаммы с одной из преобладающих активностей, а для усиления полезных функций биопрепаратов их составляют из различных штаммов бактерий. Однако в мировой научной литературе практически отсутствуют сведения об эффекте комбинированного действия эндофитных штаммов бактерий на защитные системы растений против вредителей, поэтому для разработки биологических препаратов с комплексной активностью важно всесторонне изучить полезные свойства бактериальных штаммов и разработать принципы составления бактериальных смесей, чтобы в дальнейшем успешно составлять смеси и применять полученные биопрепараты в сельском хозяйстве.

При комбинации штаммов бактерий в одном препарате необходимым свойством каждого из них является отсутствие антагонизма между собой (Rumyantsev et al., 2023). Для оценки способности бактерий разных видов и штаммов одного вида сосуществовать в тканях растений без взаимного подавления размножения друг друга были изучены их антагонистические свойства по отношению друг к другу (табл. 3.5).

Таблица 3.5 Антагонистическая активность штаммов и изолятов рода *Bacillus*

Штамм	Расстояние от колонии антагониста, мм					
	Антагонист					
	Bs26Д	Bs11BM	BsTtl2	BStl7	Bth B-5351	Bth B-6066
Bs26Д	0	3.5 ± 3.6	1.0 ± 0.01	0.25 ± 0.1	0	3.5 ± 0.5
Bs11BM	3.5 ± 0.1	0	2.0 ± 0.3	3.8 ± 0.2	0	4.5 ± 1.0
BsTtl2	2.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0	3.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	3.5 ± 1.5
BStl7	0	0	2.5 ± 0.9	0	1.0 ± 0.1	6.0 ± 2.1
Bth B-5351	0	1.0 ± 0.1	0	0.1 ± 0.01	0	5.5 ± 1.8
Bth B-6066	0	2.5 ± 0.4	1.0 ± 0.04	0.3 ± 0.02	1.0 ± 0.06	0

Примечание: Bs26Д – *B. subtilis* 26Д; Bs11BM – *B. subtilis* 11BM; BsTtl2 – *B. subtilis* Ttl2; BStl7 – *Bacillus* sp. Stl7; Bth B-5351 – *B. thuringiensis* B-5351; Bth B-6066 – *B. thuringiensis* B-6066.

Методом перпендикулярных штрихов было выявлено, что большинство штаммов *B. subtilis* существенно подавляют рост колоний штамма *B. thuringiensis* В-6066, однако не подавляют рост *B. thuringiensis* В-5351 (табл. 3.5), который, таким образом, может быть использован в качестве инсектицидного компонента при создании биопрепарата с комплексной активностью. Штаммы *B. subtilis* 11ВМ и *B. subtilis* Ttl2 проявляли умеренную антагонистическую активность против большинства исследованных штаммов. Штамм *B. subtilis* 26Д не подавлял рост *B. subtilis* Ttl2 и *Bacillus* sp. Stl7, и средне подавлял рост штамма *B. subtilis* 11ВМ (табл. 3.5).

Одним из важных свойств для разработки препаратов с комплексной активностью является способность бактерий проникать внутрь растений и мутуалистически сосуществовать с макроорганизмом, т.е. эндофитность. Все изученные штаммы и изоляты являются эндофитами, так как выделены из внутренних тканей растений. Однако в других растениях не хозяевах эндофитность этих штаммов может оказаться более низкой, поэтому была проверена эндофитность штаммов при заселении тканей пшеницы (табл. 3.1). Установлено, что самую высокую способность проникать в побеги пшеницы показал штамм *B. subtilis* 26Д, а у штаммов *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-5351 способность колонизировать внутренние ткани побегов пшеницы была на два порядка меньше (табл. 3.1). Однако способность колонизировать корни пшеницы проявлялась у этих штаммов несколько иначе (табл. 3.6). Лучше всего корни колонизировал штамм *B. subtilis* 11ВМ, в меньшей степени – штамм *B. subtilis* 26Д и хуже всех заселял корни штамм *B. thuringiensis* В-5351 (табл. 3.6).

В работе также проверили эндофитность бактерий при совместном заселении тканей пшеницы. Было составлено две смеси из штаммов, которые не подавляли друг друга при совместном росте (*B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351) или подавление роста было небольшим (*B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ) (табл. 3.5). Причем один штамм обладал высокой эндофитностью (*B. subtilis* 26Д), а другой штамм в смеси показал низкую способность колонизации

внутренних тканей растений (*B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-5351) (табл. 3.6).

Таблица 3.6 Титр бактерий во внутренних тканях проростков пшеницы

Штамм/композиция	Титр бактерий, КОЕ×10 ⁴ / г сырой массы	
	побег	корень
<i>B. subtilis</i> 26Д	173 ± 23а	30 ± 8а
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	6 ± 0.5b	43 ± 9b
<i>B. thuringiensis</i> В-5351	6.9 ± 1b	5 ± 2с
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	327 ± 32с	24 ± 6а
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. thuringiensis</i> В-5351	162 ± 18а	28 ± 6а

Примечание: Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Было выявлено, что при совместной обработке растений пшеницы бактериальной смесью штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В5351 концентрация клеток в тканях ($108/18 \times 10^4$ КОЕ) (побег/корень) у *B. subtilis* 26Д несколько снижалась, а КОЕ штамма *B. thuringiensis* В5351 ($54/10 \times 10^4$ КОЕ) (побег/корень) увеличивалось относительно их количества при индивидуальной обработке растений, как в побегах, так и в корнях (табл. 3.6), что было определено с помощью посева бактерий на селективные среды. Однако общее количество бактериальных клеток ($168/28 \times 10^4$ КОЕ) было примерно таким же, как при колонизации только штаммом *B. subtilis* 26Д (табл. 3.6).

В случае обработки растений пшеницы композицией *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ концентрация клеток в корнях несколько уменьшалась, а вот в побегах увеличивалась относительно их количества при индивидуальной обработке растений до 327×10^4 КОЕ/г сырой массы (табл. 3.6), причем в основном за счет штамма *B. subtilis* 11ВМ (рис. 3.4).

С помощью RAPD анализа было определено соотношение штаммов в растении *B. subtilis* 26Д:*B. subtilis* 11ВМ – 57%:43% и в пересчете на КОЕ 187 и 141×10^4 КОЕ/г сырой массы, соответственно (рис. 3.4). Таким образом, при совместной обработке за счет штамма *B. subtilis* 26Д штамм *B. thuringiensis* В5351 увеличил свою эндофитность на один порядок, а штамм *B. subtilis* 11ВМ увеличил свою эндофитность на 2 порядка.

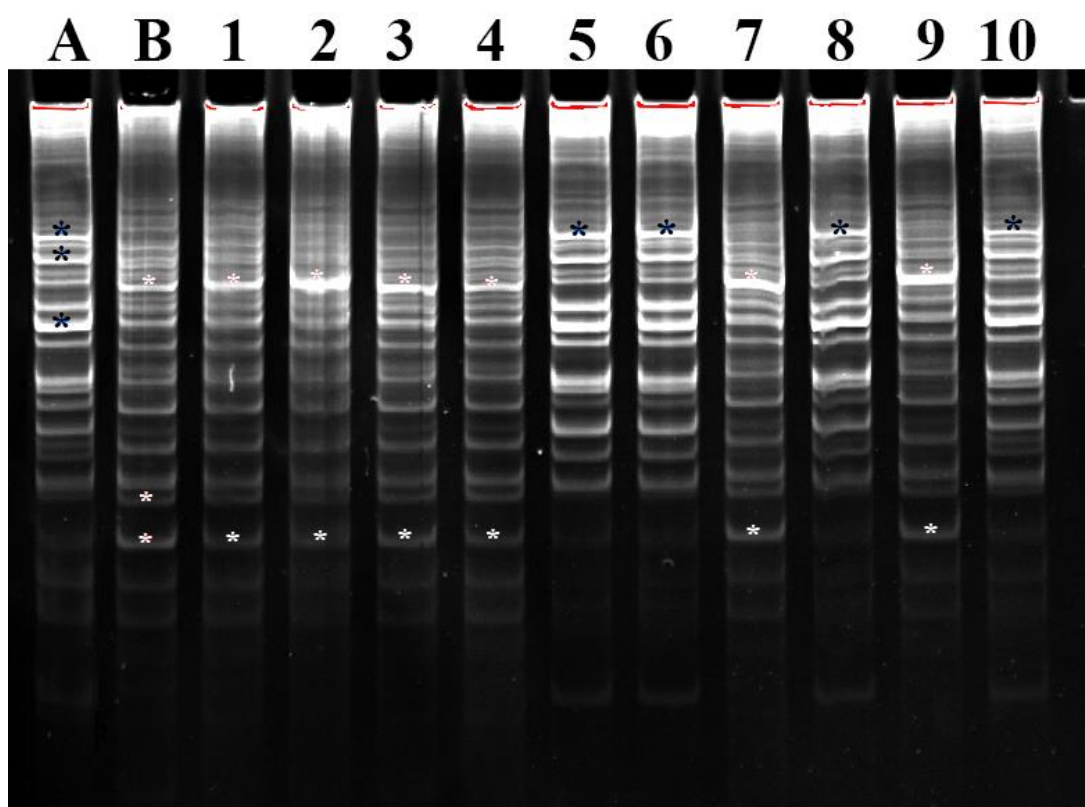


Рисунок 3.4 – RAPD-анализ ДНК бактериальных колоний из растений, обработанных смесью *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ. Обозначения: А – ДНК исходного бактериального штамма *B. subtilis* 11ВМ; В – ДНК исходного бактериального штамма *B. subtilis* 26Д; 1-10 – ДНК бактериальных штаммов, выделенных из десяти колоний, которые выросли в чашке Петри в третьем разведении, из аликвоты гомогената стерильных растений (1 -4, 7, 9 - *B. subtilis* 26Д – на рисунке показано белыми маленькими звездочками; 5, 6, 8, 10 - *B. subtilis* 11ВМ – на рисунке показано большими черными звездочками).

Механизмы проникновения эндофитов в ткани хозяина до конца не раскрыты, но было предположено, что увеличению проникновения бактериальных клеток обоих штаммов во внутренние ткани растений мог способствовать сурфактин, вырабатываемый штаммом *B. subtilis* 26Д. Так ранее было показано, что сурфактин может помогать проникать бактериальным клеткам во внутренние ткани растений картофеля (Сорокань и др., 2019). Однако не исключаются и другие механизмы этого явления. Так в недавних обзорах были описаны метаболиты, такие как экзополисахариды, гидролитические ферменты и другие, имеющие большое значение для уровня эндофитности штамма (Oukala et al., 2021, Zhaogao et al., 2022).

Таким образом, на примере двух бактериальных композиций было показано, что можно улучшить свойство эндофитности одного штамма за счет другого. При этом ожидается улучшение и других свойств штаммов. Штамм *B. subtilis* 26Д обладает высокой эндофитностью, но не синтезирует большое количество ИУК и совсем не синтезирует Сгу-белки, в отличие от штаммов *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В5351, соответственно (табл. 3.2, рис. 3.3). Поэтому при применении композиций может появиться аддитивный эффект.

Еще одним важным показателем при составлении бактериальных смесей является подбор рост-стимулирующих концентраций. Как видно из результатов подбора рост-стимулирующих концентраций индивидуальных штаммов (табл. 3.3), высокие концентрации могут подавить рост и развитие растений, что крайне нежелательно для сельскохозяйственных культур (Rumyantsev et al., 2023).

Для составления и исследования смесей были взяты штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и изолят *Bacillus sp.* Stl7 первый из которых продуцировал ЛП сурфактин и ЦК, а остальные – ЛП итурин и ауксины (табл 3.2, рис. 3.1). Кроме того, изолят *Bacillus sp.* Stl7 показал самую высокую РНКазную активность (табл. 3.1). Пятым штаммом для исследования был взят *B. thuringiensis* В-5351, продуцирующий инсектотоксичный белок Cry1Ia. При составлении смесей также учитывалась способность проникать во

внутренние ткани растений и отсутствие антагонизма между бактериями (табл. 3.1, табл. 3.5). Были составлены смеси: *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351, *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351, *Bacillus sp.* St17 + *B. subtilis* Ttl2, *B. subtilis* 26Д + *Bacillus sp.* St17, *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* Ttl2 (табл. 3.7).

Таблица 3.7 Влияние бактериальных композиций штаммов и изолятов *Bacillus spp.* на всхожесть семян растений пшеницы

Композиции бактериальных штаммов и изолятов	Концентрация, мкл суспензии / г семян	Всхожесть, %
Вода		90.0 ± 2.8a
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.0 + 1.0	91.0 ± 1.6a
	1.5 + 1.0	95.2 ± 3.2b
	1.5 + 0.5*	98.5 ± 5.4c
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 26Д	2.0 + 2.0	90.2 ± 1.2a
	1.0 + 1.0*	95.0 ± 3.7b
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.0 + 1.0	88.3 ± 0.9a
	1.0 + 1.0*	94.8 ± 2.4b
<i>Bacillus sp.</i> St17 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0 + 1.0*	96.7 ± 4.3b
	0.5 + 0.5	90.0 ± 1.7a
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Bacillus sp.</i> St17	2.0 + 1.0	88.5 ± 1.5a
	1.0 + 1.0*	92.3 ± 2.9a
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	2.0 + 1.0	91.3 ± 3.3a
	1.0 + 1.0*	95.5 ± 5.1b

Примечание: *Рост-стимулирующие концентрации. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Для бактериальных смесей были подобраны рост-стимулирующие концентрации (табл. 3.7). Для этого было проверено влияние бактериальных композиций на всхожесть семян растений пшеницы. Результаты данной работы

показали, что влияние бактериальных штаммов на данный показатель зависело от концентрации суспензии (табл. 3.3).

Основываясь на результатах подбора рост-стимулирующих концентраций для индивидуальных штаммов, для бактериальных композиций в одном случае взяли за основу рост-стимулирующую концентрацию для каждого бактериального штамма или изолята, а в другом случае уменьшили эти концентрации в 1.5 - 2 раза (табл. 3.7).

В большинстве композиций простое сложение рост-стимулирующих концентраций не приводило к увеличению энергии прорастания семян, а уменьшение рост-стимулирующей концентрации в 1.5 или 2 раза одного или обоих штаммов приводило к стимуляции прорастания при совместной обработке (табл. 3.7). В дальнейшей работе были использованы подобранные концентрации бактериальных композиций, стимулировавшие прорастание семян, в таблице они отмечены звездочкой (*) (табл. 3.7).

3.2 Прямой афицидный эффект бактерий *Bacillus* spp., липопептид-богатых фракций и их композиций против обыкновенной злаковой тли *S. graminum*

3.2.1 Оценка афицидной активности эндофитных штаммов, изолятов *Bacillus* spp. и их липопептид-богатых фракций

Известно, что бактерии рода *Bacillus* проявляют антифунгальную, противовирусную и инсектицидную активность благодаря своим метаболитам, липопептидам, Сгу-белкам и др. (Максимов и др., 2020; Lee et al., 2022; Mishra et al., 2022). Проверка афицидной активности восьми штаммов и изолятов рода *Bacillus* показала, что все бактерии обладали высокой инсектицидной активностью по отношению к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* (от 66.7 до 78.5% смертности) (табл. 3.8).

Самой высокой афицидной активностью обладали штаммы *B. thuringiensis* В-6066 и В-5153 (табл. 3.8), как показали результаты наряду с синтезом Сгу-белков, эти штаммы синтезировали ЛП (рис. 3.1, рис. 3.3). Однако

такую же высокую афицидность показали и некоторые штаммы и изоляты не синтезирующие Cry-белки, но синтезирующие ЛП (*B. subtilis* 11BM, *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Tas1) (табл. 3.8). В настоящее время хорошо доказано, что не только бактерии *B. thuringiensis*, но и бактерии *B. subtilis* и другие виды бактерий рода *Bacillus* обладают афицидной активностью (Yang et al., 2017; Rodríguez et al., 2018; Lee et al., 2022). Штамм *B. amyloliquefaciens* AG1 обладал инсектицидной активностью против личинок минера *Tuta absoluta*, штамм *B. subtilis* Y9 проявлял афицидную активность против персиковой тли *M. persicae*, а штамм *B. atropaeus* L193 вызывал разрушение кутикулы обыкновенной черемуховой тли *Rhopalosiphum padi* (Khedher et al., 2015; Yang et al., 2017; Rodríguez et al., 2018; Lee et al., 2022).

Таблица 3.8 Афицидность штаммов и изолятов рода *Bacillus* по отношению к злаковой тле *S. graminum*

Штаммы и изоляты	Афицидность штамма/изолята, % смертности тли
Вода	6.9±1.7a
<i>B. subtilis</i> 26Д	66.7 ± 6.9b
<i>B. subtilis</i> 11BM	72.3 ± 8.1c
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	76.7 ± 9.3d
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	73.3 ± 8.8c
<i>B. subtilis</i> Ttl2	69.5 ± 6.1b
<i>Bacillus</i> sp. Stl7	68.2 ± 5.8b
<i>B. thuringiensis</i> B-5351	78.5 ± 7.6d
<i>B. thuringiensis</i> B-6066	76.8 ± 8.7d

Примечание: Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Чтобы подтвердить гипотезу о роли ЛП в афицидности штаммов и изолятов *Bacillus spp.* были выделены липопептид-богатые фракции (ЛБФ) у пяти из них и изучены их свойства (Alekseev et al., 2021; Веселова и др., 2022). В первую очередь была проверена их афицидная активность (рис. 3.5, рис. 3.6).

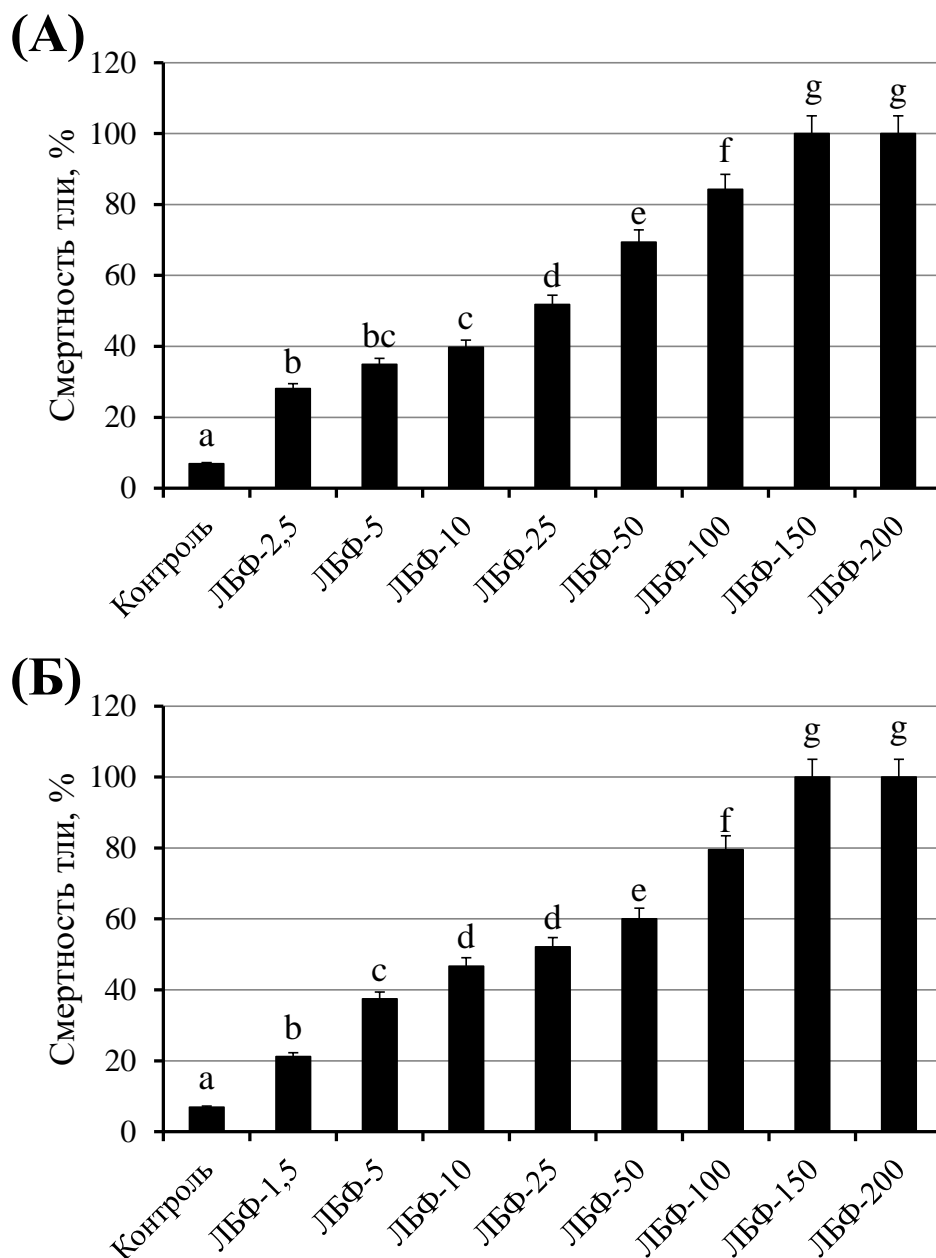


Рисунок 3.5 – Афицидная активность ЛБФ высушенного экстракта из штаммов *B. subtilis* 26Д (а) и *B. subtilis* 11ВМ (б) по отношению к злаковой тле *S. graminum*. Использованные концентрации ЛБФ 1.5, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 150 и 200 мкг/мл. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

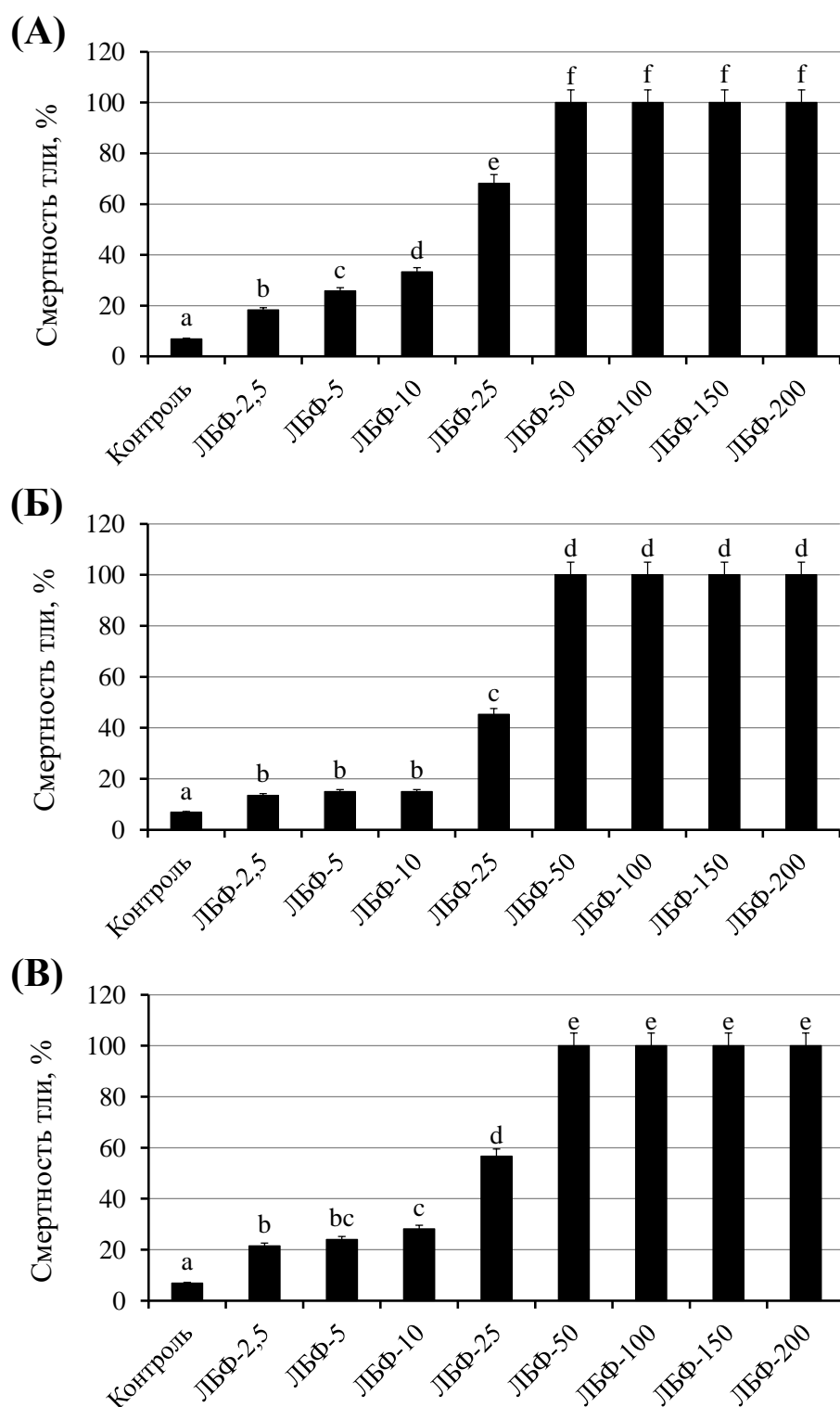


Рисунок 3.6 – Афицидная активность ЛБФ высушенного экстракта из изолятов *Bacillus* sp. Tas8.2 (а), *Bacillus* sp. Tas1 (б) и штамма *B. thuringiensis* B-6066 (в) по отношению к злаковой тле *S. graminum*. Использованные концентрации ЛБФ 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 150 и 200 мкг/мл. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

ЛБФ пяти штаммов и изолятов (*B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-6066, *Bacillus* sp. Tas1 и Tas8.2) также как и сами штаммы оказывали негативный эффект на жизнеспособность *S. graminum* при прямом воздействии (рис. 3.5, рис. 3.6). В ходе работы была обнаружена концентрационная зависимость афицидного эффекта ЛБФ из среды культивирования бактериальных штаммов и изолятов (рис. 3.5, рис. 3.6). У штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ эту зависимость наблюдали в пределах концентраций от 2.5 (1.5) до 150 мкг/мл (рис. 3.5), у изолятов *Bacillus* sp. Tas8.2, *Bacillus* sp. Tas1 и штамма *B. thuringiensis* В-6066 – в пределах более низких концентраций от 2.5 до 50 мкг/мл (рис. 3.6).

Однако у всех штаммов и изолятов за исключением изолята *Bacillus* sp. Tas1 концентрация ЛБФ 25 мкг/мл вызывала смертность более 50% тлей уже на 5-е сутки кормления (рис. 3.5, рис. 3.6). Более низкие концентрации ЛБФ у разных штаммов и изолятов вызывали смертность от 10 до 45% тлей (рис. 3.5, рис. 3.6). У штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ 100% смертность тли вызывала концентрация ЛБФ 150 мкг/мл (рис. 3.5), а у изолятов *Bacillus* sp. Tas8.2, *Bacillus* sp. Tas1 и штамма *B. thuringiensis* В-6066 100% смертность тли вызывала концентрация ЛБФ 50 мкг/мл (рис. 3.6).

Как показали результаты, инсектицидность бактериальных штаммов по отношению к злаковой тле проявлялась благодаря синтезу ими ЛП (Алексеев и др., 2021; Rummyantsev et al., 2023). ЛП сурфактин, итурин и фенгицин, выделенные из эндофитных бактерий показали примерно одинаковую афицидную активность против *S. graminum* (рис. 3.5, рис. 3.6).

В последнее время ЛП *Bacillus* spp. рассматривают в качестве альтернативы химическим инсектицидам (Guo et al., 2015, Yang et al., 2017, Rodríguez et al., 2018). Первая работа по инсектицидным свойствам сурфактина была опубликована в 2015 г., где была показана инсектицидная активность сурфактина в отношении нескольких видов тлей (Hemiptera) (Guo et al., 2015). Позднее была показана афицидная активность сурфактина в отношении персиковой тли *Muzus persicae* (Yang et al., 2017) и розовой яблоневого тли

Dysaphis plantaginea (Denoirjean et al., 2021). В двух недавних работах была показана инсектицидная активность других ЛП, таких как бациллопептин и пилипастатин (семейство фенгицинов) (Rashid et al., 2018, Denoirjean et al., 2021). В работе Rodriguez с соавторами показана афицидная активность смеси ЛП, выделенной из штамма *B. atropaeus* L193 и содержащей сурфактина, бацилломицины (семейство итуринов), фенгицин, итурин, в отношении обыкновенной черемуховой тли *Rhopalosiphum padi* (Rodriguez et al., 2018).

Таким образом, результаты показали, что ЛП вносят большой вклад в обеспечение высокой афицидной активности бактериальных штаммов и изолятов рода *Bacillus*, изученных в данной работе.

3.2.2 Оценка афицидной активности рекомбинантных линий *B. subtilis* 26Дsfp⁻, *B. subtilis* 26ДCryChS и их липопептид-богатых фракций против *S. graminum*

В дальнейшей работе с использованием рекомбинантной линии дефицитной по синтезу сурфактина *B. subtilis* 26Дsfp⁻ и рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS со встроенным Cry-белком была показана афицидная активность сурфактина и Cry1Aa белка.

Штамм *B. subtilis* 26Д известен в качестве основы коммерческого препарата Фитоспорин-М, широко применяемого в России против различных патогенов сельскохозяйственных культур. Мы определили, что данный штамм является эндофитным и хорошо колонизирует ткани пшеницы и картофеля (Rumyantsev et al., 2023; Sorokan et al., 2020), синтезирует сурфактин, фитогормоны (Rumyantsev et al., 2023) и обладает достаточно высокой РНКазной и противовирусной активностью (Sorokan et al., 2020; Veselova et al., 2022). Однако инсектицидная активность штамма *B. subtilis* 26Д еще плохо изучена и доказана, но уже показана активность против обыкновенной злаковой тли *S. graminum* и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Maksimov et al., 2020b; Sorokan et al., 2020). Чтобы доказать роль сурфактина в афицидной

активности штамма *B. subtilis* 26Д в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН была получена рекомбинантная линия дефицитная по синтезу сурфактина *B. subtilis* 26Дsfp⁻. Так как мажорным ЛП штамма *B. subtilis* 26Д является сурфактин, пара из штамма и рекомбинантной линии является хорошей моделью для изучения функций сурфактина.

Для выявления афицидного эффекта сурфактина были проведены эксперименты по прямому влиянию бактериальной суспензии на обыкновенную злаковую тлю *S. graminum* с отрезками листьев пшеницы (табл.3.6). Результаты показали, что рекомбинантная линия *B. subtilis* 26Дsfp⁻ в отличие от штамма *B. subtilis* 26Д не имела афицидного эффекта и не увеличивала смертность тли по сравнению с контрольным питанием (вода) (табл. 3.6). Кроме того, штамм *B. subtilis* 26Д снижал плодовитость тлей, уменьшая коэффициент их размножения в 3.4 раза по сравнению с контролем (вода) (табл.3.9). Напротив, рекомбинантная линия *B. subtilis* 26Дsfp⁻ не снижала плодовитость тлей, а коэффициент размножения даже несколько увеличивался (табл.3.9).

Таблица 3.9 Показатели размножения злаковой тли *S. graminum* под влиянием бактерий *Bacillus* spp. и афицидная активность штаммов и рекомбинантных линий

Штаммы и линии	Афицидность штамма/линии, % смертности тли	Коэффициент размножения
Вода	6.9±1.7a	2.45 ± 0.4a
<i>B. subtilis</i> 26Д	66.7 ± 6.9b	0.73 ± 0.1b
<i>B. thuringiensis</i> B-5351	78.5 ± 7.6c	0.08 ± 0.002c
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻	9.1 ± 2.4a	2.81 ± 0.7a
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	82.6 ± 7.2c	0 ± 0c

Примечание: Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Такие результаты говорят о том, что ограничение синтеза сурфактина в рекомбинантной линии имело большое значение для афицидности штамма. В литературе встречаются работы с рекомбинантными бактериальными линиями, у которых была искусственно отключена способность синтезировать ЛП. К сожалению, в этих работах изучались фунгицидные свойства ЛП, а не инсектицидные, но было показано, что такие линии теряли антигрибковую активность штаммов по отношению к грибам *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* и *Fusarium culmorum* (Yi et al., 2016; Afsharmanesh et al., 2018; Yaseen et al., 2018).

Для повышения афицидной активности штамма *B. subtilis* 26Д и проверки афицидного действия CryIIa белка в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН была получена и депонирована рекомбинантная линия *B. subtilis* 26ДCryChS (ВНИИСХМ №RCAM04928) на основе эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д и гена, кодирующего инсектицидный белок CryIIa, из штамма *B. thuringiensis* В-5351 (идентификационный номер в GenBank X62821.1) (Maksimov et al., 2020b).

Штамм *B. thuringiensis* В-5351 проявил афицидность почти на 12% выше, чем штамм *B. subtilis* 26Д (табл. 3.9), однако обладал гораздо меньшей эндофитностью, чем штамм *B. subtilis* 26Д (табл. 3.1). Афицидность рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS была почти на 16% эффективнее, чем афицидность штамма *B. subtilis* 26Д (табл. 3.9). Коэффициент размножения тли снижался в 3.4 раза на листьях, помещенных в суспензию клеток штамма *B. subtilis* 26Д (табл. 3.9). Однако размножение тли прекращалось на изолированных листьях, которые погружали в суспензию клеток рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS или штамма *B. thuringiensis* В-5351 (табл. 3.9). Эти результаты говорят о том, что инсектицидный белок CryIIa обладает сильным афицидным эффектом и именно он усиливает афицидность штамма *B. subtilis* 26Д.

Также на афицидность были проверены ЛБФ обеих рекомбинантных линий (рис. 3.7, рис. 3.8).

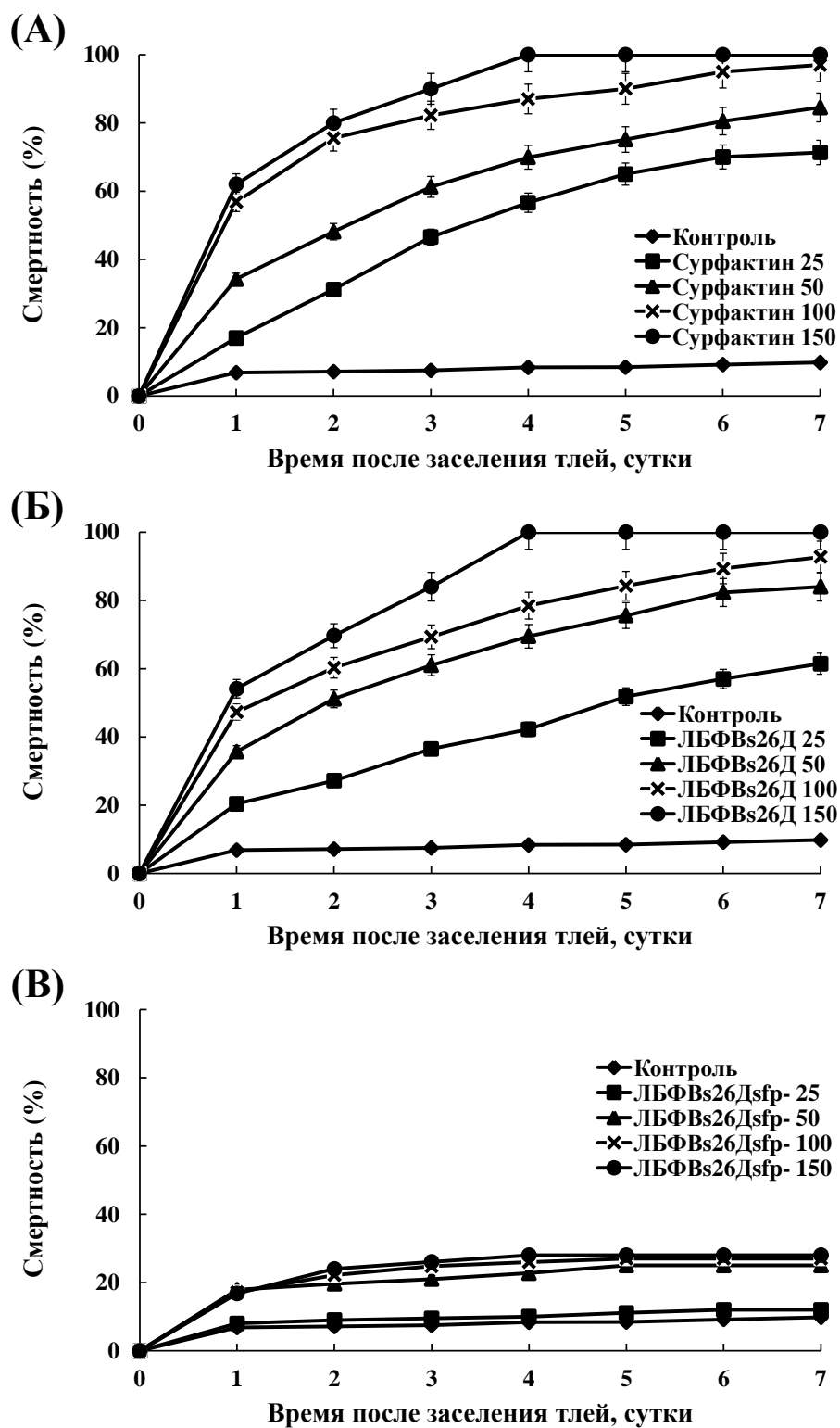


Рисунок 3.7 – Афицидная активность коммерческого сурфактина (А) и ЛБФ из штамма *B. subtilis* 26Д (ЛБФVs26Д) (Б) и ЛБФ из рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Дsfp⁻ (ЛБФVs26Дsfp⁻) (В) по отношению к злаковой тле *S. graminum*. Использованные концентрации 25, 50, 100 и 150 мкг/мл.

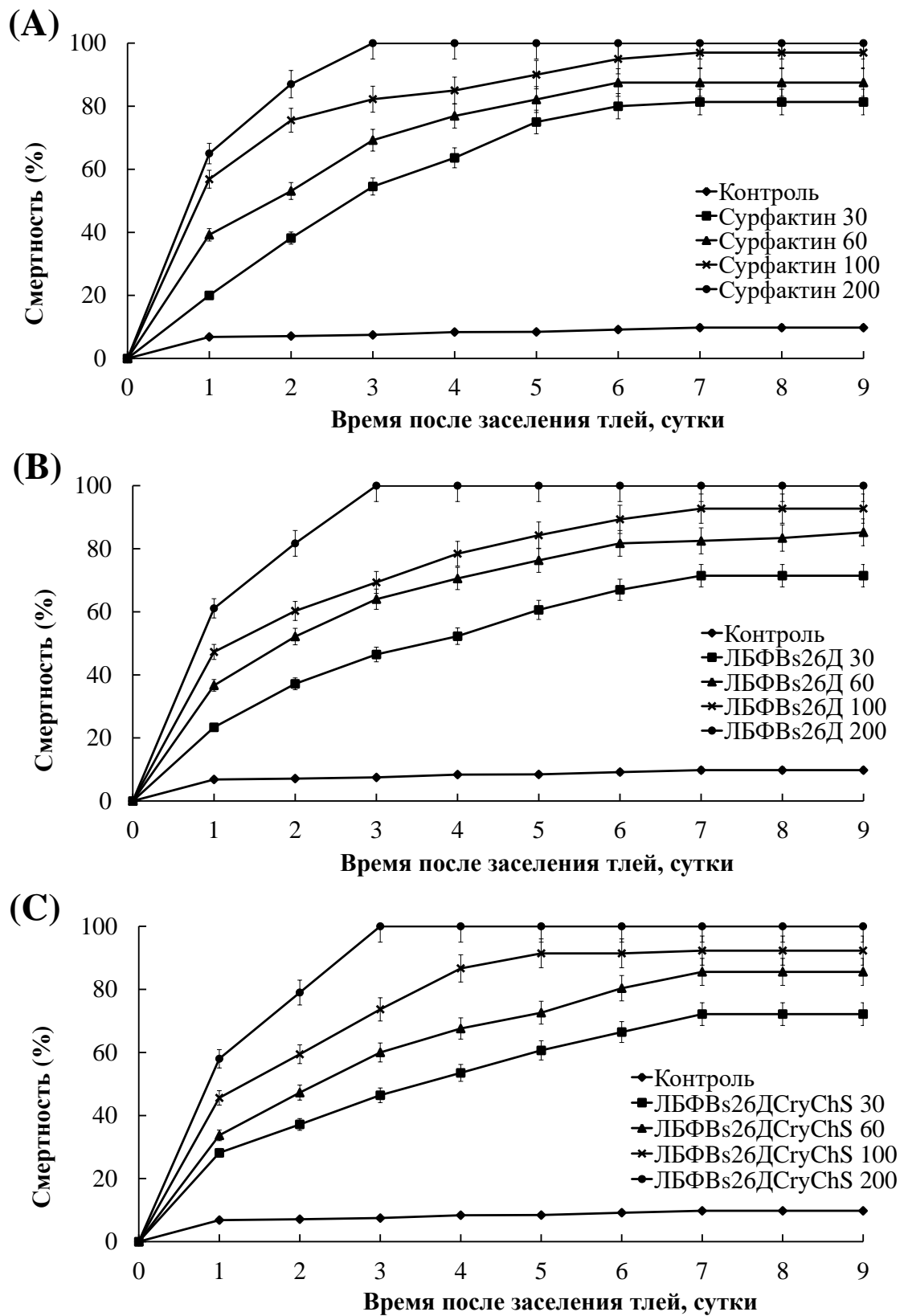


Рисунок 3.8 – Афицидная активность коммерческого сурфактина (А) и ЛБФ из штамма *B. subtilis* 26Д (ЛБФVs26Д) (Б) и ЛБФ из рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS (ЛБФVs26ДCryChS) (В) по отношению к злаковой тле *S. graminum*. Использованные концентрации 30, 60, 100 и 200 мкг/мл.

Афицидное действие ЛБФ проверяли в течение 7 сут на отделенных листьях пшеницы, помещенных в растворы ЛБФ штамма *B. subtilis* 26Д или рекомбинантной линии, или коммерческого сурфактина различной концентрации от 25 мкг/мл до 200 мкг/мл (рис. 3.7, рис. 3.8).

При изучении ЛБФ рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Дsfp⁻ использовали концентрации 25, 50, 100 и 150 мкг/мл (рис. 3.7). Растворы коммерческого сурфактина разных концентраций (25, 50, 100, 150 мкг/мл) вызывали смертность от 17 до 62% тлей уже через 1 сутки кормления (рис. 3.7, А). Так концентрация 25 мкг/мл вызывала гибель более 50% тлей уже на 4-е сутки, концентрация 50 мкг/мл – на 3-и сутки, а концентрация 100 мкг/мл – на 1-е сутки кормления (рис. 3.7, А).

Концентрация 150 мкг/мл коммерческого сурфактина вызывала 100% гибель тлей на 4-е сутки кормления (рис. 3.7, А). ЛБФ, выделенная из штамма *B. subtilis* 26Д оказывала негативный эффект на жизнеспособность *S. graminum* при прямом воздействии сходный с эффектом коммерческого сурфактина (рис. 3.7, Б). Кормление тлей на отрезках листьев пшеницы погруженных в растворы ЛБФ *B. subtilis* 26Д разной концентрации, показало, что наименьшая концентрация раствора ЛБФ 25 мкг/мл вызывала смертность более 50% тлей уже на 5-е сутки кормления и более 60% тлей на 7-е сутки (Рис. 3.7, Б).

Концентрация ЛБФ 50 мкг/мл вызывала смертность более 50% тлей уже на 2-е сутки и 90% тлей на 7-е сутки (Рис. 3.7, Б). Концентрация ЛБФ 150 мкг/мл вызывала 100% смертность тли через 4 сут кормления (Рис. 3.7, Б). Напротив, фракция, выделенная из рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Дsfp⁻ не оказывала значительного афицидного эффекта по отношению к *S. graminum* (Рис. 3.7, В). Различные концентрации данной фракции (25, 50, 100, 150 мкг/мл) не вызывали гибель особей тлей более 28% в течение всего эксперимента (Рис. 3.7, В), что может говорить об отсутствии сурфактина в данной фракции.

При изучении ЛБФ рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS использовали концентрации 30, 60, 100 и 200 мкг/мл (рис. 3.8). Растворы коммерческого сурфактина разных концентраций вызывали смертность от 20

до 65% тли *S. graminum* уже через 1 сутки после начала кормления (рис. 3.8, А). Концентрация сурфактина 200 мкг/мл вызывала 100% гибель тлей на 3-и сутки кормления (рис. 3.8, А). ЛБФ из штамма *B. subtilis* 26Д и рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS оказывали негативный эффект на жизнеспособность злаковой тли *S. graminum* сходный с эффектом коммерческого сурфактина (рис. 3.8, Б, В). Концентрация 30 мкг/мл коммерческого сурфактина или ЛБФ из бактерий вызывала гибель 60-70% особей тли на 5-е сутки кормления (рис. 3.8). Концентрация 100 мкг/мл коммерческого сурфактина или ЛБФ из бактерий вызывала гибель около 90% тли на 5-е сутки кормления (рис. 3.8). Вставка гена, кодирующего Cry1Ia белок в геном штамма *B. subtilis* 26Д не повлияла на синтез сурфактина этим штаммом.

Таким образом, эти результаты еще раз подтверждают афицидную активность сурфактина из штамма *B. subtilis* 26Д. Схожие результаты были получены в других работах, где сурфактин показал афицидную активность против персиковой тли *M. persicae* и яблоневого тли *Dysaphis plantaginea* (Yang et al., 2017; Denoirjean et al., 2021).

3.2.3 Оценка афицидной активности композиций эндофитных штаммов, изолятов *Bacillus spp.* и их липопептид-богатых фракций

Все подобранные композиции бактериальных штаммов и изолятов проявили высокую афицидную активность (71.4 - 83%) (табл. 3.10). Наибольшую активность показали смеси *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ (77%), *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* 26Д (83%) и *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* 11ВМ (80.4%). Кроме того эти композиции проявили аддитивный афицидный эффект (в смеси афицидность была больше, чем при индивидуальной обработке) (табл. 3.10). Бактерии в композиции *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ продуцировали два разных ЛП сурфактин и итурин (рис. 3.2).

В дальнейшей работе была изучена композиция ЛБФ этих двух штаммов (Алексеев и др., 2021; Romyantsev et al., 2023).

Таблица 3.10 Афицидность композиций бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp.

Композиции бактериальных штаммов и изолятов	Афицидность бактериальных композиций, % смертности тли
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	77.0 ± 9.4а
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 26Д	82.9 ± 9.1b
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	80.4 ± 6.4b
<i>Bacillus</i> sp. St17 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	72.5 ± 7.3c
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Bacillus</i> sp. St17	68.0 ± 4.9c
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	71.4 ± 5.3c

Примечание: Значения в столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Были проведены испытания по определению влияния смеси ЛБФ из среды культивирования штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ (далее ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ) на энергию прорастания и всхожесть семян, а также на прирост сырой и сухой биомассы и осуществлен подбор рост-стимулирующей концентрации данной композиции. В предыдущих опытах было показано, что ЛБФ штамма *B. subtilis* 11ВМ (ЛБФVs11ВМ) работала в более низких концентрациях, чем ЛБФ штамма *B. subtilis* 26Д (ЛБФVs26Д) (табл. 3.4). Повышение концентрации метаболитов приводило к подавлению всхожести семян (табл. 3.4). Для ЛБФVs26Д и ЛБФVs11ВМ были подобраны рост-стимулирующие концентрации - 2.5 мкг/мл и 1.5 мкг/мл, соответственно (табл. 3.4). Влияние композиции ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ на ростовые характеристики растений пшеницы было исследовано в трех различных сочетаниях и концентрациях (табл. 3.11). В первом сочетании (2.0 + 1.5) мкг/мл была уменьшена концентрация ЛБФVs26Д, и сочетание ЛП в смеси составило 57:43% (табл. 3.11).

Таблица 3.11 Влияние композиции ЛБФ из среды культивирования штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ на всхожесть семян и прирост биомассы проростков пшеницы

Параметр	Вариант обработки		
	Вода	Концентрация ЛБФ, мкг/мл	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ
Всхожесть, %	90.0 ± 2.8a	2.0 + 1.5*	96.5 ± 2.1b
		2.5 + 1.5	93.7 ± 3.4c
		2.5 + 3.5	90.6 ± 3.6a
Сырая масса одного проростка, мг	62.5 ± 7.2a	2.0 + 1.5*	72.5 ± 1.1b
		2.5 + 1.5	68.5 ± 0.3c
		2.5 + 3.5	62.1 ± 0.5a
Прирост сырой массы одного проростка, % от контроля	100 ± 7a	2.0 + 1.5*	116.0 ± 2.1b
		2.5 + 1.5	109.6 ± 1.1c
		2.5 + 3.5	99.4 ± 1.4a
Сухая масса одного проростка, мг	5.4 ± 0.5a	2.0 + 1.5*	6.8 ± 0.1b
		2.5 + 1.5	6.2 ± 0.2c
		2.5 + 3.5	6.0 ± 0.2c
Прирост сухой массы одного проростка, % от контроля	100 ± 8a	2.0 + 1.5*	126.0 ± 1.4b
		2.5 + 1.5	114.8 ± 4.2c
		2.5 + 3.5	111.0 ± 3.1c

Примечание: *Рост-стимулирующие концентрации. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Второе сочетание (2.5 + 1.5) мкг/мл образовали простым сложением рост-стимулирующих концентраций, подобранных для индивидуальных ЛБФ, соотношение в смеси несколько изменилось и составило 63:37% (табл. 3.11). В

третьем сочетании (2.5 + 3.5) мкг/мл была увеличена концентрация ЛБФ11ВМ, и соотношение ЛП стало 42:58% (табл. 3.11). Все три сочетания концентраций влияли положительно на всхожесть семян и накопление биомассы пшеницы, однако первое сочетание с наиболее низкими концентрациями ЛБФ из обоих штаммов (2.0 + 1.5) мкг/мл показало наилучший результат (табл. 3.11). Это сочетание концентраций метаболитов в смеси мы обозначили как рост-стимулирующее. В дальнейшем была проверена афицидная активность смеси ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ (рис. 3.9). Нами уже было установлено, что бактериальные штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и их смесь обладали довольно высокой афицидной активностью (табл. 3.8), которая проявлялась благодаря выработке этими штаммами ЛП. Также нами была показана афицидная активность ЛБФ из среды культивирования штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ (рис. 3.5). Кормление тлей на отрезках листьев пшеницы погруженных в растворы ЛБФVs26Д и ЛБФVs11ВМ (прямое воздействие) низких концентраций 2.5 и 1.5 мкг/мл, соответственно, вызывало смертность 28.4 и 21.6% вредителя, соответственно (рис. 3.5). Более высокие концентрации растворов ЛБФ 25 мкг/мл вызывали смертность более 50% тлей (51.8 и 52.2%, соответственно), а 100% смертность тлей вызывала концентрация 150 мкг/мл уже на 5-е сутки кормления (рис. 3.5).

Композиция ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ проявила аддитивный афицидный эффект против *S. graminum*, особенно при низких концентрациях (рис. 3.9).

Так рост-стимулирующая концентрация смеси ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ (2.0 + 1.5) мкг/мл вызывала смертность 32.5% тлей, а концентрация 14 мкг/мл (8 + 6) вызывала смертность почти 50% вредителя (рис. 3.9). Концентрация смеси ЛБФ 28 мкг/мл (16 + 12) вызывала смертность более 60% тлей, а 100% смертность тли вызывала концентрация 102 мкг/мл (64 + 48) уже на 5-е сутки кормления (рис. 3.9).

Таким образом, при кормлении тлей композицией ЛБФ из двух бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ (ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ) эффект достигался с помощью более низких концентраций, чем

при применении индивидуальных ЛБФ (Алексеев и др., 2021; Rummyantsev et al., 2023).

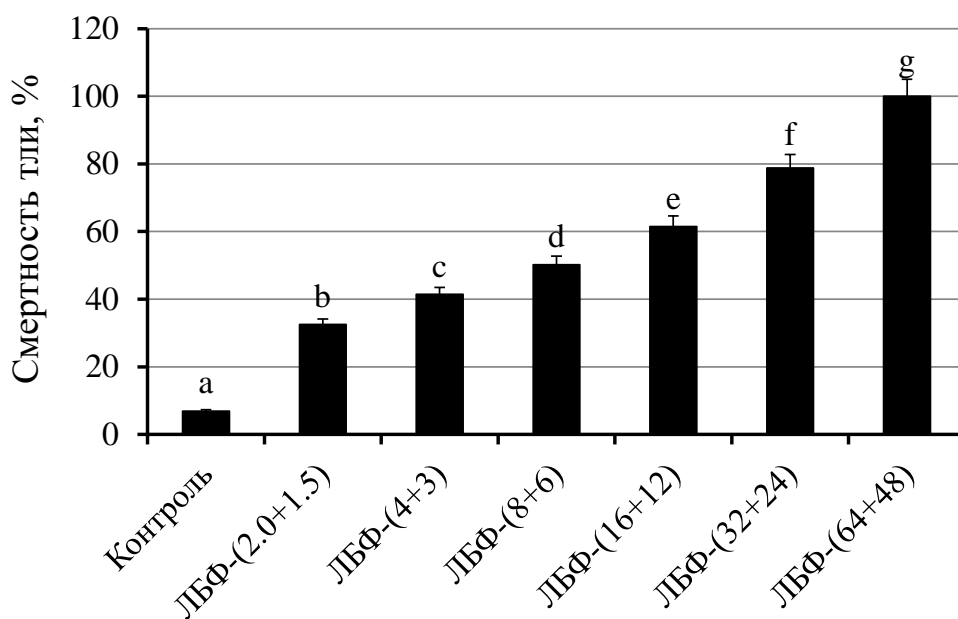


Рисунок 3.9 – Афицидная активность композиции липопептид-богатых фракций из штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ (ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ) по отношению к злаковой тле *S. graminum* в различных концентрациях. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Существует всего две работы по изучению биоцидной активности смесей ЛП, одна из которых посвящена изучению фунгицидной активности смесей фенгицина + сурфактина и микосубтилина + сурфактина против возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis* (Leconte et al., 2022), а вторая работа сфокусирована на афицидной активности тройной смеси пипастатина + микосубтилина + сурфактина (PMS) против розовой яблонево́й тли *D. plantaginea* (Denoirjean et al., 2021).

Так при изучении фунгицидной активности смесей ЛП были рассмотрены различные соотношения ЛП в смеси, смесь микосубтилин + сурфактин (80:20) проявила синергичный эффект и хорошую воспроизводимость результатов в

полевых экспериментах против парши яблони (Leconte et al., 2022). В другой работе наибольшую смертность яблоневой тли вызывал сурфактин, влияя на пищевое поведение насекомого, а микосубтиллин и смесь PMS в соотношении ЛП 33:33:33% вызывали наименьшую смертность, однако больше всего влияли на двигательную активность тлей (Denoirjean et al., 2021). Таким образом, выбор концентраций и соотношений между бактериальными эндофитами в смесях является очень важным этапом при подборе будущих биоинсектицидов.

3.3 Роль эндофитных бактерий *Bacillus* spp., ЛБФ и их смесей на два типа устойчивости растений к *S. graminum* – антибиоз и выносливость

3.3.1 Влияние бактерий *Bacillus* spp., липопептид-богатых фракций и их смесей на выносливость растений пшеницы к *S. graminum*

Выносливость растений по отношению к насекомым или особый тип устойчивости к вредителям – толерантность – это способность растений восстанавливаться после травм, нанесенных насекомыми или выдерживать вредителей без заметного воздействия на их жизнеспособность (Koch et al., 2016; Luo et al., 2022). Механизмы толерантности до конца не изучены, но известно, что толерантные растения показывают повышенную фотосинтетическую активность, которая приводит к усиленному росту (Luo et al., 2022). С помощью СРРБ в том числе эндофитов можно повысить толерантность растений к насекомым, так как известно, что бактерии могут усиливать рост растений и влиять на фотосинтез (Miljakovic et al., 2020). Это влияние бактерий на улучшение роста растений влияет на взаимодействие растений и насекомых. С одной стороны, улучшенный рост повышает питательную ценность растений, что влияет на продуктивность насекомых. С другой стороны, СРРБ обеспечивают повторный рост тканей растений после питания насекомых, увеличивают эффективность фотосинтеза, тем самым компенсируют потерю растениями энергии, все это стимулирует толерантность растений (Rashid, Chrung, 2017). При подборе бактериальных штаммов в

качестве будущих биоинсектицидов важно сочетание двух свойств – стимуляция роста растений и индукция защитных механизмов. Однако механизмы обеспечивающие проявление этих свойств бактерий в одном штамме еще плохо изучены.

В работе было изучено влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. и их ЛБФ на выносливость растений пшеницы к злаковой тле, которое может выражаться в рост-стимулирующем эффекте данных бактерий и их метаболитов (Алексеев и др., 2021; Rumyantsev et al., 2023). В ходе работы была установлена низкая выносливость растений пшеницы сорта СЮ по отношению к *S. graminum*, которая проявлялась в торможении роста 1-ого и 2-ого листьев на 20 и 30%, соответственно, по сравнению с необработанным и незаселенным насекомыми контролем (табл. 3.12). Предпосевная обработка семян пшеницы бактериальными штаммами и изолятами или их композициями в рост-стимулирующих концентрациях ускоряла рост 1-ого и 2-ого листьев пшеницы при питании тли на этих растениях в основном на 10-15% по сравнению с контролем и на 30-45% по сравнению с растениями, заселенными тлей (табл. 3.12). Однако было несколько штаммов, которые повышали рост листьев более чем на 20% по сравнению с контрольными растениями – это *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-6066 и *B. subtilis* Ttl2 (табл. 3.12). И были бактерии, которые обладали меньшей рост-стимулирующей активностью, чем другие бактериальные штаммы и изоляты – это *B. thuringiensis* В-5351 и *Bacillus* sp. Stl7 (табл. 3.12). У одной композиции был обнаружен аддитивный рост-стимулирующий эффект, это *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 (табл. 3.12). Штамм *B. thuringiensis* В-5351 стимулировал рост листьев при питании тли на растениях гораздо слабее, чем штамм *B. subtilis* 26Д (табл. 3.12). Скорее всего, это было связано с низкой эндофитностью штамма *B. thuringiensis* В-5351 (табл. 3.6). Смесь штаммов *B. thuringiensis* В-5351+ *B. subtilis* 26Д повышала рост листьев при кормлении тли лучше, чем отдельный штамм *B. thuringiensis* В-5351, при этом его способность проникать в ткани растений пшеницы в смеси увеличивалась (табл. 3.6). (Румянцев и др., 2022)

Таблица 3.12 Влияние штаммов и изолятов *Bacillus* spp. и бактериальных композиций на рост листьев пшеницы, заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*

Вариант обработки	Концентрация, мкл суспензии/г семян	Выносливость растений	
		Прирост 1-ого листа, в %*	Прирост 2-ого листа, в %
Вода	-	81.8 ± 6.2a	70.2 ± 5.1a
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.0	114.7 ± 7.3b	142 ± 12.9b
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.0	103.2 ± 5.6c	115.2 ± 9.2c
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	1.0	113.2 ± 8.1b	116.1 ± 5.8c
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.0	110.1 ± 6.6b	111.5 ± 4.7c
<i>B. thuringiensis</i> В-6066	2.0	103.6 ± 2.5c	121.3 ± 7.1d
<i>B. thuringiensis</i> В-5351	2.0	102.7 ± 4.8c	106.4 ± 5.7e
<i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0	107.8 ± 5.8c	122.5 ± 12.3d
<i>Bacillus</i> sp. Stl7	1.0	97.8 ± 4.6c	101.6 ± 9.5e
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻	2.0	82.9 ± 5.5a	78.8 ± 4.9
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	2.0	110.1 ± 4.6b	134.5 ± 14b
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.5 + 0.5	120.5 ± 6.8d	116.4 ± 8.7c
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 26Д	1.0 + 1.0	118.4 ± 6.4d	129.1 ± 7.4f
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.0 + 1.0	113.3 ± 6.2b	119.9 ± 8.1d
<i>Bacillus</i> sp. Stl7 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0 + 1.0	107.0 ± 7.9c	115.3 ± 9.8c
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Bacillus</i> sp. Stl7	1.0 + 1.0	102.6 ± 5.9c	104.2 ± 10.1e
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0 + 1.0	117.5 ± 8.1d	112.8 ± 6.9c

Примечание: *Прирост 1-ого и 2-ого листьев, не обработанных бактериальными штаммами и не заселенных тлей растений принят за 100%. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Слабая стимуляция роста листьев штаммом *B. thuringiensis* В-5351 не была связана с синтезом CryIIa белка, так как рекомбинантная линия *B. subtilis* 26ДCryChS влияла на рост листьев примерно также как штамм *B. subtilis* 26Д (табл. 3.12). Таким образом, CryIIa белок не влиял на рост-стимулирующие свойства штаммов.

Однако ЛП сурфактин влиял на рост-стимулирующие свойства штамма *B. subtilis* 26Д (табл. 3.12). Обработка растений суспензией рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Дsfpr⁻ не влияла на рост 1-ого и 2-ого листа при заселении растений злаковой тлей, скорость роста листьев снижалась также как в необработанных бактериями растениях (табл. 3.12). Так как рекомбинантная линия *B. subtilis* 26Дsfpr⁻ дефицитная по синтезу сурфактина теряла способность к стимуляции роста, было выдвинуто предположение о влиянии сурфактина на рост-стимулирующие свойства бактериальных штаммов.

Чтобы проверить это предположение, было изучено влияние ЛБФ рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Дsfpr⁻ в разных концентрациях на выносливость растений пшеницы (табл. 3.13). Было показано, что ЛБФ *B. subtilis* 26Дsfpr⁻ не стимулировала рост листьев растений заселенных тлей независимо от концентрации ЛБФ (табл.3.13), что подтверждает утверждение о влиянии сурфактина на стимуляцию роста растений. Для проверки влияния на рост растений других ЛП – фенгицина и итурина – у пяти штаммов и изолятов *Bacillus* spp. было изучено влияние рост-стимулирующих концентраций ЛБФ на выносливость растений пшеницы к злаковой тле (табл. 3.13). Дополнительно у штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и их смеси было изучено влияние более высоких концентраций ЛБФ до 10 мкг/мл (табл. 3.13). Рост-стимулирующие концентрации ЛБФVs26Д, ЛБФVs11ВМ, их смесь ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ, а также ЛБФ штамма *B. thuringiensis* В-6066 (ЛБФVt В-6066) и ЛБФ изолятов *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Tas1 увеличивали рост 1-ого и 2-ого листьев пшеницы при кормлении тли на 2-7% по сравнению с контрольными растениями и на 16-32% по сравнению с растениями, заселенными тлей (табл. 3.13).

Таблица 3.13 Влияние ЛБФ из среды культивирования различных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. и смеси ЛБФ штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на рост листьев пшеницы заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*

ЛБФ бактериальных штаммов и их смесь	Концентрация ЛБФ, мкг/мл	Выносливость растений	
		Прирост 1-ого листа, в %**	Прирост 2-ого листа, в %
Вода	-	81.8±6.2a	70.2 ± 5.1a
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	2.0	99.5 ± 3.6b	93.6 ± 5.4b
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.5	113.0 ± 4.0c	100.0 ± 2.8c
ЛБФ <i>B. thuringiensis</i> В-6066	1.5	113.1 ± 8.2c	95.3 ± 3.1b
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д	2.5*	106.7 ± 6c	102.0 ± 4.8c
	5	87.6 ± 5.8d	100.0 ± 4.1c
	10	86.5 ± 6.1d	94.7 ± 3.2b
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻	2.5*	80.4 ± 4.5a	84.0 ± 5.1d
	5	75.4 ± 4.2e	79.5 ± 5.7d
	10	81.0 ± 5.1a	87.1 ± 6.2d
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	2.5*	104.3 ± 4.8b	101.0 ± 3. 2c
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.5*	98.1 ± 6.2b	102.3 ± 7.6c
	2.5	96.9 ± 6.3b	101.8 ± 4.5c
	3.5	91.2 ± 6.0d	90.8 ± 4.6b
	5	75.0 ± 4.4e	72.3 ± 3.3a
	10	73.4 ± 4.2e	71.5 ± 4.1a
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.0 + 1.5*	110.2 ± 5.1c	100.3 ± 3.8c
	2.5 + 1.5	95.0 ± 5.8b	103.9 ± 4.8c
	2.5 + 2.5	90.8 ± 5.6d	93.8 ± 4.2b
	2.5 + 3.5	94.1 ± 6.1bd	94.8 ± 4.5b

Примечание: *Рост-стимулирующие концентрации. **Прирост 1-ого и 2-ого листьев, не обработанных бактериальными штаммами и не заселенных тлей растений принят за 100%. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Таким образом, ЛБФ бактерий повышали выносливость растений к вредителю, но в меньшей степени, чем сами бактериальные штаммы и изоляты (Алексеев и др., 2021; Rummyantsev et al., 2023). А итурин и фенгицин, также как сурфактин, могли участвовать в рост-стимулирующих процессах (Alekseev et al., 2021; Алексеев и др.. 2022).

Более высокие концентрации ЛБФ 5 и 10 мкг/мл практически не стимулировали рост листьев (табл. 3.13). Такие растения росли медленнее, чем контрольные растения, но все же быстрее, чем растения необработанные бактериями и также подвергнутые нападению тли (табл. 3.13). В дополнение ЛБФVs11ВМ отличалась тем, что обработанные этой ЛБФ в концентрациях 5 и 10 мкг/мл и заселенные тлей растения пшеницы росли также или даже медленнее, чем растения необработанные и заселенные тлей (табл. 3.13). Таким образом, результаты данной работы показали, что ЛБФ изученных штаммов и изолятов теряли рост-стимулирующие свойства по мере повышения их концентрации, воздействующей на растение (Rummyantsev et al., 2023).

При изучении влияния композиции ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ было выбрано четыре различных сочетания концентраций метаболитов, три сочетания уже были использованы при подборе рост-стимулирующих концентраций (табл. 3.11) и четвертое сочетание (2.5 + 2.5) мкг/мл, где содержание ЛБФ находилось в равном соотношении (1 : 1) (табл. 3.13). Не рост-стимулирующие концентрации метаболитов в смеси (не отмечены * в таблице) в меньшей степени, чем рост-стимулирующее сочетание концентраций (2.0 + 1.5) мкг/мл, влияли на рост листьев, а сочетание (2.5 + 2.5) мкг/мл оказывало наименьший эффект среди всех четырех сочетаний (табл. 3.13). Таким образом, кроме самой концентрации метаболита на рост-стимулирующие свойства влияло процентное соотношение метаболитов в смеси (Rummyantsev et al., 2023).

Встраивание гена, кодирующего Cry1Aa белок, в геном штамма *B. subtilis* 26Д не влияло на свойства ЛБФ этого штамма, ЛБФ рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS стимулировала рост листьев пшеницы заселенных тлей также как ЛБФ Vs26Д (табл. 3.13).

В настоящее время механизмы стимуляции роста растений эндофитами связывают с прямым и косвенным эффектом (Eid et al., 2021; Chaudhary et al., 2022). Прямой эффект связывают с синтезом фитогормонов бактериями, а косвенный эффект связывают с синтезом метаболитов и запуском системной устойчивости (Miljakovic et al., 2020; Eid et al., 2021; Chaudhary et al., 2022). Бактериальные штаммы и изоляты *Bacillus* spp. изученные в данной работе все синтезировали ЦК и ауксины (табл. 3.1) и все оказывали прямое воздействие на стимуляцию роста листьев (табл. 3.12). Однако также изученные штаммы и изоляты *Bacillus* spp. синтезировали ЛП (рис. 3.1), которые опосредованно влияли на рост-стимулирующую способность бактерий (табл. 3.13). Опосредованное действие ЛП на рост могло быть связано с несколькими функциями этих метаболитов, таких как образование биопленок и влияние на подвижность бактерий при заселении растений (Raaijmakers et al., 2010), увеличение способности проникновения бактериальных клеток во внутренние ткани растений (Сорокань и др., 2019), а также могли влиять прямой физицидный эффект ЛП, который обеспечивал уменьшение нагрузки на растение, элиситорная роль ЛП и способность запускать защитные механизмы в растениях, связанные с изменением редокс-статуса растений и гормональными сигнальными путями (Miljakovic et al., 2020; Jiang et al., 2021).

3.3.2 Опосредованное растениями пшеницы влияние бактерий *Bacillus* spp., липопептид-богатых фракций и их смесей на показатели жизнеспособности обыкновенной злаковой тли *S. graminum*

Антибиоз – это тип устойчивости растений к насекомым, который отрицательно влияет на физиологические показатели жизнеспособности вредителя, включая размеры и массу тела, периоды развития и/или плодовитость и смертность насекомых (Luo et al., 2022). Для реализации механизма антибиоза в растениях изменяется как первичный, так и вторичный метаболизм и синтезируются различные химические вещества (Radchenko et al.,

2022; Luo et al., 2022). СРРБ могут влиять на метаболизм растений (Oukala et al., 2021), а, следовательно, могут влиять на механизмы антибиоза.

Результаты данной работы показали, что бактериальные штаммы и их композиции опосредованно влияли на жизненные показатели злаковой тли, кормившейся на обработанных растениях пшеницы (табл. 3.14). Обработка растений индивидуальными бактериальными штаммами и изолятами увеличивала смертность тлей с 6.9 до 38.3% (табл. 3.14). Наибольший эффект (смертность тли более 30%) оказали штаммы *B. thuringiensis* В-5351, *B. thuringiensis* В-6066, *B. subtilis* 26Д и изолят *Bacillus* sp. Stl7 (табл. 3.14). Плодовитость тли кормившейся на растениях обработанных этими бактериями была самая низкая (табл. 3.14). Обработка штаммом *B. subtilis* Ttl2 не приводила к очень большому повышению смертности, которая составила 22.4%, однако при этом плодовитость тлей сильно уменьшалась, и падал коэффициент размножения (табл. 3.14). Также на коэффициент размножения сильно влияли штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-5351 и изоляты *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Tas1, которые уменьшали его почти в 2 раза (табл. 3.14).

Несмотря на то, что штамм *B. thuringiensis* В-5351 показал небольшую эндофитность в отличие от штамма *B. subtilis* 26Д (табл. 3.1), он сильнее, чем *B. subtilis* 26Д влиял на смертность тли (табл. 3.14) (Румянцев и др., 2022). Рекомбинантная линия *B. subtilis* 26ДCryChS усилила свое влияние на смертность и плодовитость тли по сравнению со штаммом *B. subtilis* 26Д и очень сильно снизила коэффициент размножения тли до 0.7, уменьшив его в 3.5 раза по сравнению с контролем и в 1.9 раз по сравнению со штаммом *B. subtilis* 26Д, что предполагает роль CryIIa белка в опосредованном влиянии на показатели жизнеспособности тли (табл. 3.14).

Также и сурфактин опосредованно влиял на показатели жизнеспособности тли, так как обработка растений рекомбинантной линией дефицитной по синтезу сурфактина *B. subtilis* 26Дsfp⁻ не уменьшала смертность злаковой тли кормившейся на таких растениях, а коэффициент размножения и плодовитость даже несколько увеличивались (табл. 3.14).

Таблица 3.14 Опосредованное растениями влияние штаммов и изолятов *Bacillus* spp. и бактериальных композиций на показатели жизнеспособности обыкновенной злаковой тли *S. graminum*

Вариант обработки	Концентрация, мкл суспензии/г семян	Характеристики антибиоза		
		Плодовитость, шт/растение	Смертность тли, %	Коэффициент размножения тли
Вода	-	36.8 ± 3.9a	6.90 ± 0.8a	2.45 ± 0.4a
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.0	19.8 ± 2.2b	31.5 ± 2.2b	1.32 ± 0.2b
<i>B. subtilis</i> 11BM	1.0	22.7 ± 2.8b	24.3 ± 3.4c	2.1 ± 0.13d
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	1.0	24.5 ± 2.1b	28.7 ± 1.4b	1.25 ± 0.09b
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.0	20.2 ± 2.2b	22.6 ± 1.1c	1.54 ± 0.12c
<i>B. thuringiensis</i> B-6066	2.0	21.2 ± 1.8b	36.3 ± 3.5d	2.08 ± 0.15d
<i>B. thuringiensis</i> B-5351	2.0	16.3 ± 1.7c	38.3 ± 4.0d	1.5 ± 0.14c
<i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0	18.3 ± 2bc	22.4 ± 2.5c	1.6 ± 0.11c
<i>Bacillus</i> sp. Stl7	1.0	19.4 ± 1.5b	35.5 ± 3.8d	1.95 ± 0.12d
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻	2.0	45.3 ± 3.5d	1.83 ± 0.2e	3.20 ± 0.6e
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	2.0	15.5 ± 1.5c	39.1 ± 3.7d	0.71 ± 0.04f
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11BM	1.5 + 0.5	14.7 ± 1.9c	39.2 ± 2.6d	1.18 ± 0.1b
<i>B. thuringiensis</i> B-5351 + <i>B. subtilis</i> 26Д	1.0 + 1.0	10 ± 1.1e	49.5 ± 3.5f	0.8 ± 0.05f
<i>B. thuringiensis</i> B-5351 + <i>B. subtilis</i> 11BM	1.0 + 1.0	20.1 ± 2.0b	39.3 ± 2.9d	1.4 ± 0.15c
<i>Bacillus</i> sp. Stl7 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0 + 1.0	15.0 ± 1.6c	50.1 ± 3.1f	1.25 ± 0.08b
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Bacillus</i> sp. Stl7	1.0 + 1.0	9.1 ± 1.0e	57.2 ± 5.2g	0.75 ± 0.05f
<i>B. thuringiensis</i> B-5351 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0 + 1.0	20 ± 3.1b	28.6 ± 3.2b	1.9 ± 0.2d

Примечание: Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Пять из шести бактериальных композиций усилили влияние на показатели жизнеспособности тли по сравнению с индивидуальной обработкой, кроме смеси *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* Ttl2 (табл. 3.14). Самое большое влияние на смертность тли оказали композиции *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* 26Д (49.5%), *Bacillus* sp. Stl7 + *B. subtilis* Ttl2 (50%) и *B. subtilis* 26Д + *Bacillus* sp. Stl7 (57%) (табл. 3.14).

Самая низкая плодовитость 9-10 нимф на растение и самый низкий коэффициент размножения 0.8 был у тлей, кормившихся на растениях обработанных композициями *B. thuringiensis* В-5351 + *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 26Д + *Bacillus* sp. Stl7 (табл. 3.14). Также на плодовитость и размножение тли сильно повлияли еще две композиции *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ и *Bacillus* sp. Stl7 + *B. subtilis* Ttl2 (табл. 3.14). Таким образом, данные результаты подтвердили гипотезу об аддитивном эффекте смесей и улучшении свойств одного штамма другим.

В дальнейшей работе у пяти штаммов и изолятов *Bacillus* spp. было изучено опосредованное влияние рост-стимулирующих концентраций ЛБФ на показатели жизнеспособности злаковой тли (Alekseev et al., 2021; Алексеев и др., 2022). Также у штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и их смеси было изучено влияние более высоких концентраций ЛБФ до 10 мкг/мл (табл. 3.15).

Обработка растений ЛБФ в рост-стимулирующих концентрациях увеличивала смертность тлей с 6.9 до 25% и уменьшала коэффициент размножения злаковой тли примерно в 2 раза (табл. 3.15). Наибольшее влияние на смертность оказала ЛБФ из среды культивирования штамма *B. subtilis* 26Д (табл. 3.15). Плодовитость и коэффициент размножения снижались сильнее всего при обработке растений ЛБФs11ВМ (табл. 3.15). Слабее всего на показатели жизнеспособности тли влияли ЛБФ из среды культивирования изолятов *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Tas1 (табл. 3.15).

Исследование опосредованного влияния более высоких концентраций ЛБФ на показатели жизнеспособности злаковой тли показало, что они также как и при прямом воздействии сильнее подавляли размножение тли (табл. 3.15).

Таблица 3.15 Опосредованное растениями влияние ЛБФ из среды культивирования пяти штаммов и изолятов *Bacillus* spp. и смеси ЛБФ штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на показатели жизнеспособности обыкновенной злаковой тли *S. graminum*

Вариант обработки	Концентрация ЛБФ, мкг/мл	Характеристики антибиоза		
		Плодовитость, шт/растение	Смертность тли, %	Коэффициент размножения тли
Вода	-	36.8 ± 3.9a	6.90 ± 0.8a	2.45 ± 0.4a
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	2.0	27.2 ± 3.5b	18.6 ± 4.9b	2.2 ± 0.3b
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.5	26.1 ± 3.2b	14.1 ± 5.1b	1.5 ± 0.2c
ЛБФ <i>B. thuringiensis</i> В-6066	1.5	21.6 ± 2.8c	21.5 ± 3.9c	1.35 ± 0.2cd
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д	2.5*	20.0 ± 3.1c	24.9 ± 2.3c	1.3 ± 0.1d
	5	19.4 ± 2.9c	33.7 ± 4.3d	1.26 ± 0.1d
	10	15.6 ± 2.7d	37.3 ± 4.8d	1.26 ± 0.2d
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Дsfp-	2.5*	43 ± 4.1e	6.90 ± 0.9a	2.63 ± 0.5e
	5	45 ± 5.0e	9.11 ± 1.3a	2.21 ± 0.4b
	10	30.8 ± 3.9b	8.98 ± 1.1a	2.76 ± 0.6e
ЛРФ <i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	2.5	18.9 ± 2.1c	28.1 ± 2.7cd	1.3 ± 0.1d
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.5*	17.3 ± 3.3c	20.9 ± 2.6c	1.2 ± 0.2d
	2.5	16.3 ± 4.1cd	29.3 ± 2.7	1.3 ± 0.2d
	3.5	16.8 ± 1.8cd	30.5 ± 4.1d	1.06 ± 0.1
	5	14.1 ± 3.3d	34.9 ± 3.9d	1.09 ± 0.1f
	10	10.6 ± 3.2d	39.7 ± 5.1e	1.07 ± 0.1f
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.0 + 1.5*	16.3 ± 1.2cd	26.3 ± 3.1c	1.06 ± 0.1f
	2.5 + 1.5	16.5 ± 2.8cd	34.6 ± 3.5d	1.07 ± 0.1f
	2.5 + 2.5	20.6 ± 3.5c	34.2 ± 3.7d	1.6 ± 0.3c
	2.5 + 3.5	16.4 ± 1.9cd	31.5 ± 4.1d	1.06 ± 0.1f

Примечание: *Рост-стимулирующие концентрации. Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Так смертность тли увеличивалась с 24.9% до 38.3% при обработке растений ЛБФVs26Д в концентрациях от 2.5 до 10 мкг/мл, соответственно (табл.3.15). При обработке растений ЛБФVs11ВМ в концентрациях от 1.5 до 10 мкг/мл плодовитость тли уменьшалась с 17.3 до 10.6 нимф на растение, а смертность увеличивалась до 39.7% (табл. 3.15). Однако коэффициент размножения уже сильно снижался при воздействии низких концентраций ЛБФ обоих штаммов (табл. 3.15). Однако увеличение концентраций ЛБФ при обработках растений приводило к потере рост-стимулирующего эффекта (табл. 3.13) (Алексеев и др., 2021; Rummyantsev et al., 2023).

Три различных сочетания концентраций метаболитов в композиции ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ влияли на показатели жизнеспособности тли сходным образом (табл. 3.15). Вариант (2.5 + 2.5) мкг/мл, где содержание ЛБФ находилось в равном соотношении (1 : 1) в меньшей степени влиял на плодовитость и коэффициент размножения тли, чем другие сочетания ЛБФ (табл. 3.15), что еще раз подтверждает вывод о важности не только концентраций, но и соотношений метаболитов в смеси. Для дальнейших исследований опосредованного влияния смеси ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ на формирование устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum* было выбрано сочетание с рост-стимулирующими концентрациями ЛБФ (2.0 + 1.5) мкг/мл (Алексеев и др., 2021; Rummyantsev et al., 2023).

Выявлено, что ЛБФ рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Дsfp- не влияла на смертность и плодовитость злаковой тли, а коэффициент размножения не уменьшался независимо от концентрации ЛБФ (табл. 3.15). Отсутствие влияния ЛБФ *B. subtilis* 26Дsfp- на показатели жизнеспособности тли может говорить о роли сурфактина в развитии опосредованных защитных реакций против тли.

ЛБФ рекомбинантной линии *B. subtilis* 26ДCryChS в рост-стимулирующей концентрации влияла на показатели жизнеспособности тли также как и ЛБФVs26Д (табл. 3.15). Вставка гена, кодирующего Cry1Aa белок в геном штамма *B. subtilis* 26Д не повлияла на синтез сурфактина этим штаммом и его функции.

Таким образом, подводя итог исследованиям влияния бактериальных эндофитов и их метаболитов на два типа устойчивости – выносливость и антибиоз – можно сделать вывод, что все изученные штаммы и изоляты *Bacillus* spp. оказывали влияние на рост растений заселенных тлей и опосредованно влияли на показатели жизнеспособности злаковой тли. Косвенное влияние бактерий на защитные механизмы растений связывают с индукцией системной устойчивости и элиситорной ролью бактериальных метаболитов (Oukala et al., 2021; Santoyo, 2022). Результаты данной работы показали, что ЛП сурфактин, итурин и фенгицин и Cry1Ia белок обладали элиситорной активностью и опосредованно участвовали в развитии защитных реакций растений пшеницы против обыкновенной злаковой тли *S. graminum*. Рост-стимулирующие концентрации, как самих бактерий, так и их метаболитов влияли на антибиоз, а значит, могли модулировать защитные реакции растений и, скорее всего, являются также иммуностимулирующими концентрациями. В дальнейшей работе исследовано влияние рост-стимулирующих концентраций бактерий и их метаболитов на индукцию защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*.

3.4 Индукция защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* бактериями *Bacillus* spp. их композициями и липопептид-богатыми фракциями

3.4.1 Опосредованное влияние бактерий *Bacillus* spp., липопептид-богатых фракций и их смесей на окислительно-восстановительный статус растений пшеницы заселенных *S. graminum*

Опосредованный через растение механизм, способствующий формированию устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле, может быть связан с индукцией бактериальными эндофитами СИУ (системной индуцированной устойчивостью) против вредителя (Rashid, Chrung, 2017; Oukala et al., 2021). Защитные ответы, индуцированные бактериальными

эндофитами, используют различные стратегии защиты и используют различные механизмы, которые могут включать накопление защитных PR-белков, различных ферментов, влияние на редокс-метаболизм и генерацию активных форм кислорода (АФК), а также синтез вторичных метаболитов (Oukala et al., 2021).

СИУ, опосредованная бактериями и развивающаяся при атаке насекомыми, включает реакции связанные с накоплением АФК, в том числе H_2O_2 , и изменением активности ферментов про-/антиоксидантной системы (Conrath et al., 2015; Valenzuela-Soto et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017; Rashid et al., 2018). Накопление АФК в растениях, взаимодействующих с микробами, является ранней защитной реакцией против различных насекомых (Rashid, Chrung, 2017). Однако более высокое накопление АФК в растениях может иметь пагубные последствия. При этом необходима активация антиоксидантов (Rashid, Chrung, 2017).

Результаты данной работы показали, что заселение контрольных растений пшеницы тлями приводило к уменьшению содержания H_2O_2 (рис. 3.10), отсутствию повышения активности пероксидазы (рис. 3.11) и повышению активности каталазы по сравнению с контролем через 24 и 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3.12) и сопровождалось низкой выносливостью растений и низкой смертностью тлей (табл. 3.12, табл. 3.14).

Предпосевная обработка семян пшеницы штаммами и изолятами *Bacillus* spp. приводила к резкому накоплению H_2O_2 , (рис. 3.10), повышению активности пероксидазы (рис. 3.11) и отсутствию повышения активности каталазы по сравнению с контролем в листьях пшеницы (рис. 3.12), заселенных *S. graminum*, что, возможно, обуславливало устойчивость таких растений к вредителю. Во всех вариантах обработки наблюдали положительную корреляцию смертности злаковой тли с изменением содержания H_2O_2 (табл. 3.14, рис. 3.10) (Alekseev et al., 2021).

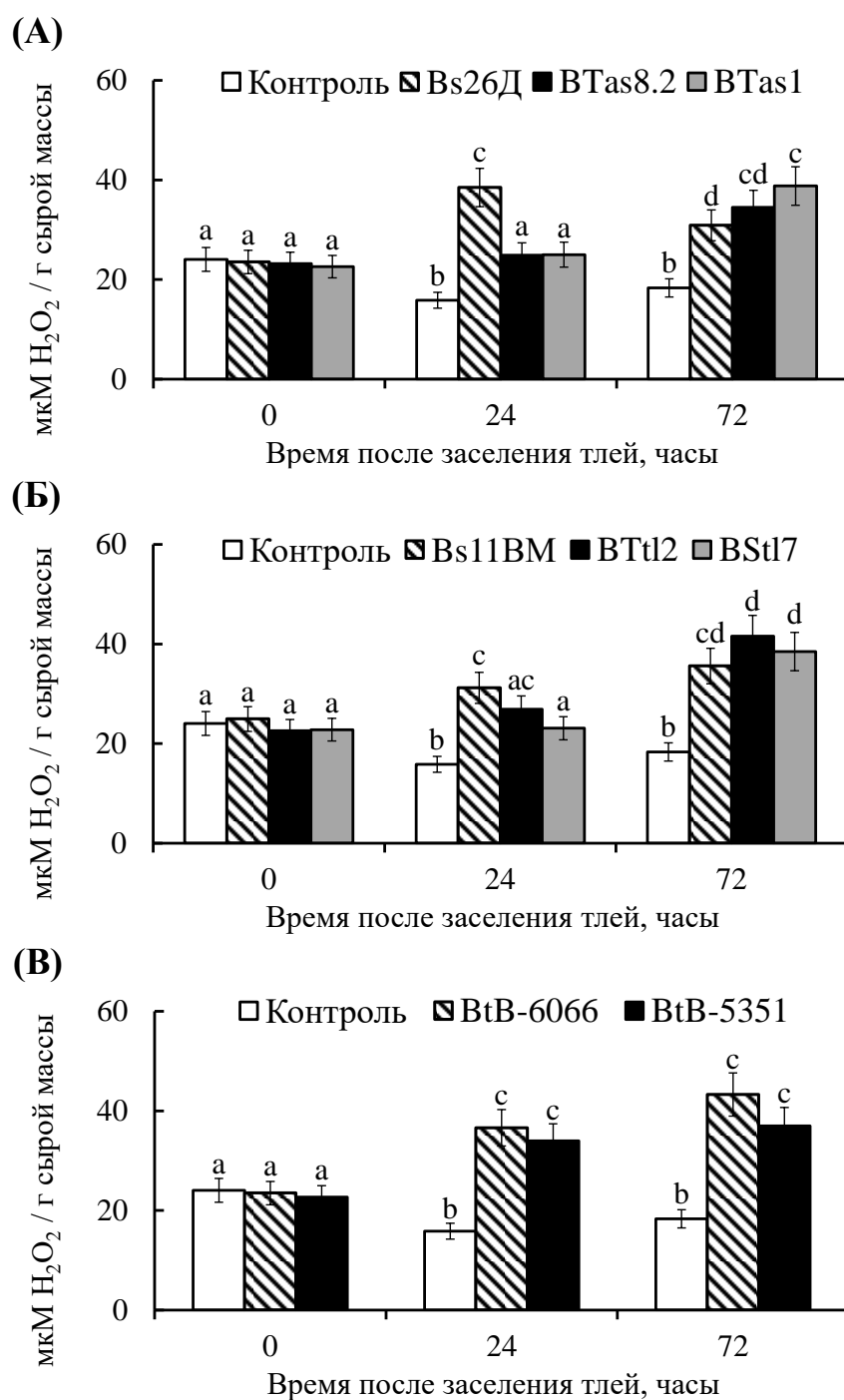


Рисунок 3.10 – Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. на содержание H_2O_2 в заселенных *S. graminum* растениях пшеницы. Обозначения на рисунке: 0 — растения, незаселенные тлей; Контроль — растения не обработанные бактериями; Bs26Д, BTas8.2, BTas1, Bs11BM, BsTtl2, BStl7, BtB-6066 и BtB-5351 — растения, обработанные соответствующим штаммом или изолятом. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

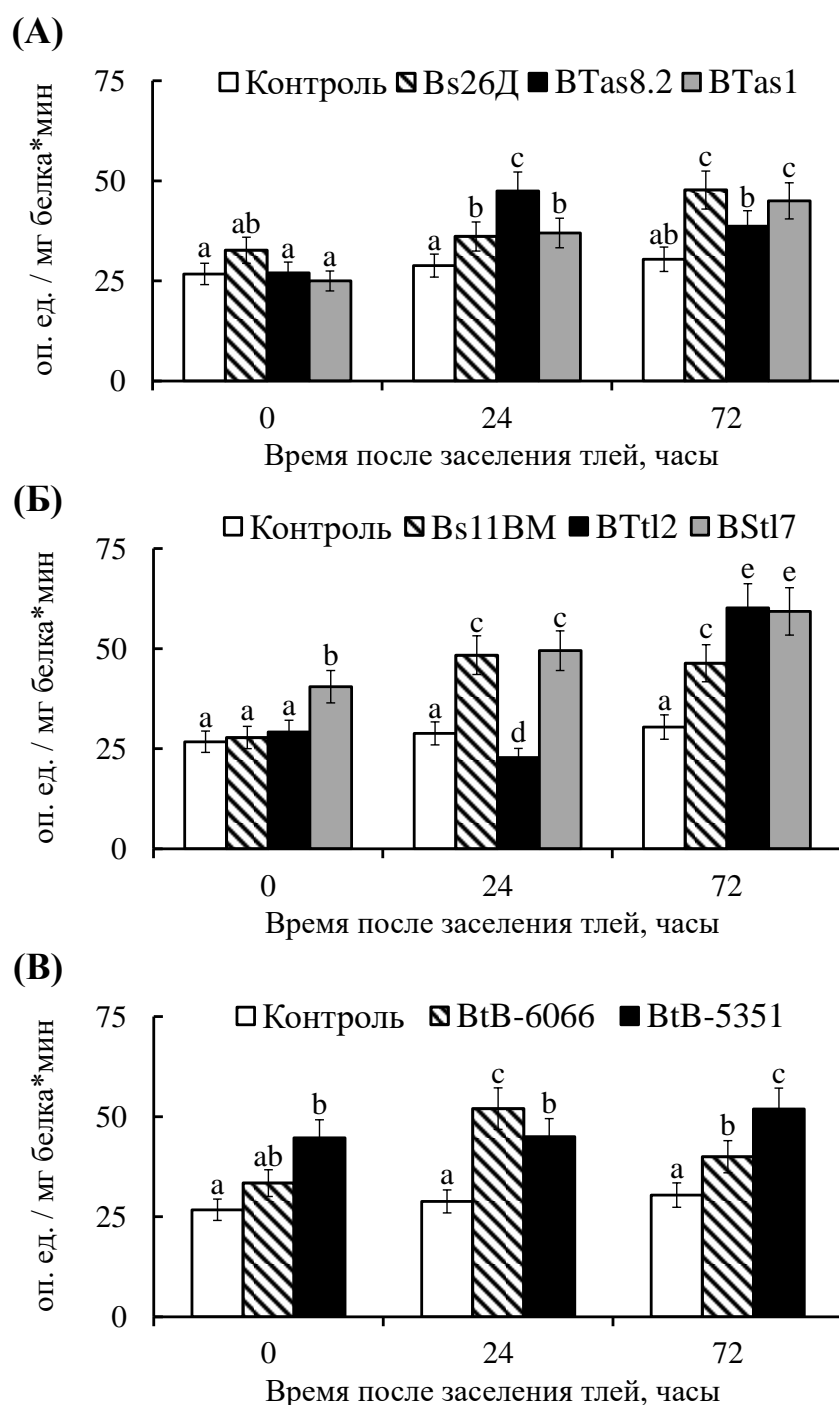


Рисунок 3.11 – Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Vacillus* spp. на активность пероксидазы в заселенных *S. graminum* растениях пшеницы. Обозначения на рисунке: 0 — растения, незаселенные тлей; Контроль — растения не обработанные бактериями; Bs26Д, BTas8.2, BTas1, Bs11BM, BsTtl2, BStl7, VtB-6066 и VtB-5351 — растения, обработанные соответствующим штаммом или изолятом. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

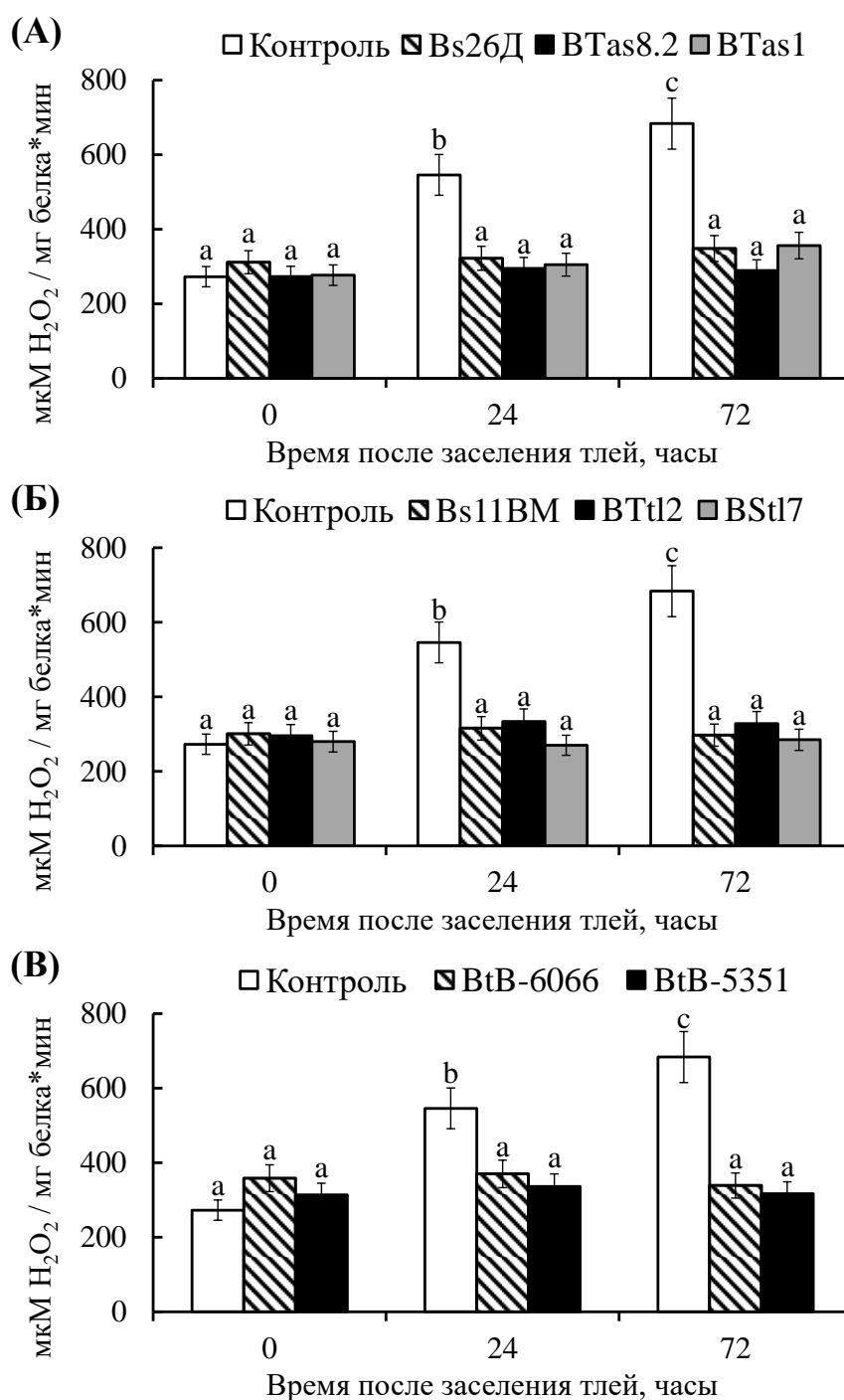


Рисунок 3.12 – Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Vacillus* spp. на активность каталазы в заселенных *S. graminum* растениях пшеницы. Обозначения на рисунке: 0 — растения, незаселенные тлей; Контроль — растения не обработанные бактериями; Bs26Д, BTas8.2, BTas1, Bs11BM, BsTtl2, BStl7, BtB-6066 и BtB-5351 — растения, обработанные соответствующим штаммом или изолятом. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Наибольший эффект на накопление H_2O_2 через 24 часа после заселения растений тлей оказала обработка штаммами *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-5351 и *B. thuringiensis* В-6066 (рис. 3.10). Все штаммы и изоляты существенно увеличивали содержание H_2O_2 через 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3.10).

Обработка штаммами *B. thuringiensis* В-6066 и *B. subtilis* 11ВМ и изолятом *Bacillus* sp. Tas8.2 повышала активность пероксидазы в большей степени через 24 часа после заселения растений тлей (рис. 3.11). Тогда как обработка штаммами *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* Ttl2 и изолятом *Bacillus* sp. Tas1 повышала активность пероксидазы в большей степени через 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3.11). Штамм *B. thuringiensis* В-5351 и изолят *Bacillus* sp. Stl7 сильнее остальных бактерий влияли на активность данного фермента и повышали активность пероксидаз через 24 и 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3.11).

На активность каталаз все штаммы и изоляты *Bacillus* spp. действовали примерно одинаково (рис. 3.12). В растениях обработанных бактериями и заселенных тлей активность каталаз не повышалась и оставалась на уровне контрольных растений (рис. 3.12), что могло иметь значение для поддержания высоких уровней АФК на начальных этапах заселения растений тлей для запуска защитных реакций.

Для изучения влияния бактериальных композиций на индукцию иммунных реакций в растениях против тли были выбраны три смеси: *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351. Во-первых, эти три смеси проявили наибольшую афицидную активность среди всех композиций и показали аддитивный эффект (табл. 3.10). Во-вторых, бактериальные штаммы первой композиции *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ синтезировали ЛП сурфактин + итурин и гормоны ЦК + ауксины; бактериальные штаммы второй композиции *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 синтезировали сурфактин и инсектотоксичный белок CryIIa, а также ЦК + ауксины; бактериальные

штаммы третьей композиции синтезировали итурин + Cry1Ia и ауксины (табл. 3.2, рис. 3.1, рис. 3.3).

В третьих, композиция *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 показала аддитивный эффект при влиянии на выносливость растений пшеницы к тле (табл. 3.12), а композиции *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ и *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 проявили аддитивный эффект при влиянии на показатели жизнеспособности тли – плодовитость, смертность и коэффициент размножения (табл. 3.14).

Все три бактериальные смеси примерно одинаково влияли на компоненты про-/антиоксидантной системы растений заселенных вредителем (рис. 3.13). Предпосевная обработка семян бактериальными композициями приводила к резкому накоплению H_2O_2 , повышению активности пероксидазы и отсутствию повышения активности каталазы по сравнению с контролем в листьях пшеницы, заселенных *S. graminum* (рис. 3.13). Причем смеси влияли на накопление H_2O_2 и активность пероксидаз сильнее, чем индивидуальные штаммы через 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3.13).

Так, например, штамм *B. subtilis* 26Д повышал содержание H_2O_2 через 72 часа кормления тли на 55%, *B. subtilis* 11ВМ – на 79%, *B. thuringiensis* В-5351 – на 86% относительно необработанных бактериями и заселенных вредителем растений, где содержание H_2O_2 принято в расчетах за 100%. При этом композиция *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ повышала содержание H_2O_2 через 72 часа кормления тли на 145%, а композиция *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 – на 161% относительно необработанных бактериями и заселенных вредителем растений. Таким образом, бактериальные композиции проявляли аддитивный эффект при влиянии на генерацию H_2O_2 у растений пшеницы заселенных тлей (Алексеев и др., 2021; Румянцев и др., 2022; Romyantsev et al., 2023). Такой же аддитивный эффект бактериальные композиции проявляли при влиянии на активность пероксидазы (рис. 3.13).

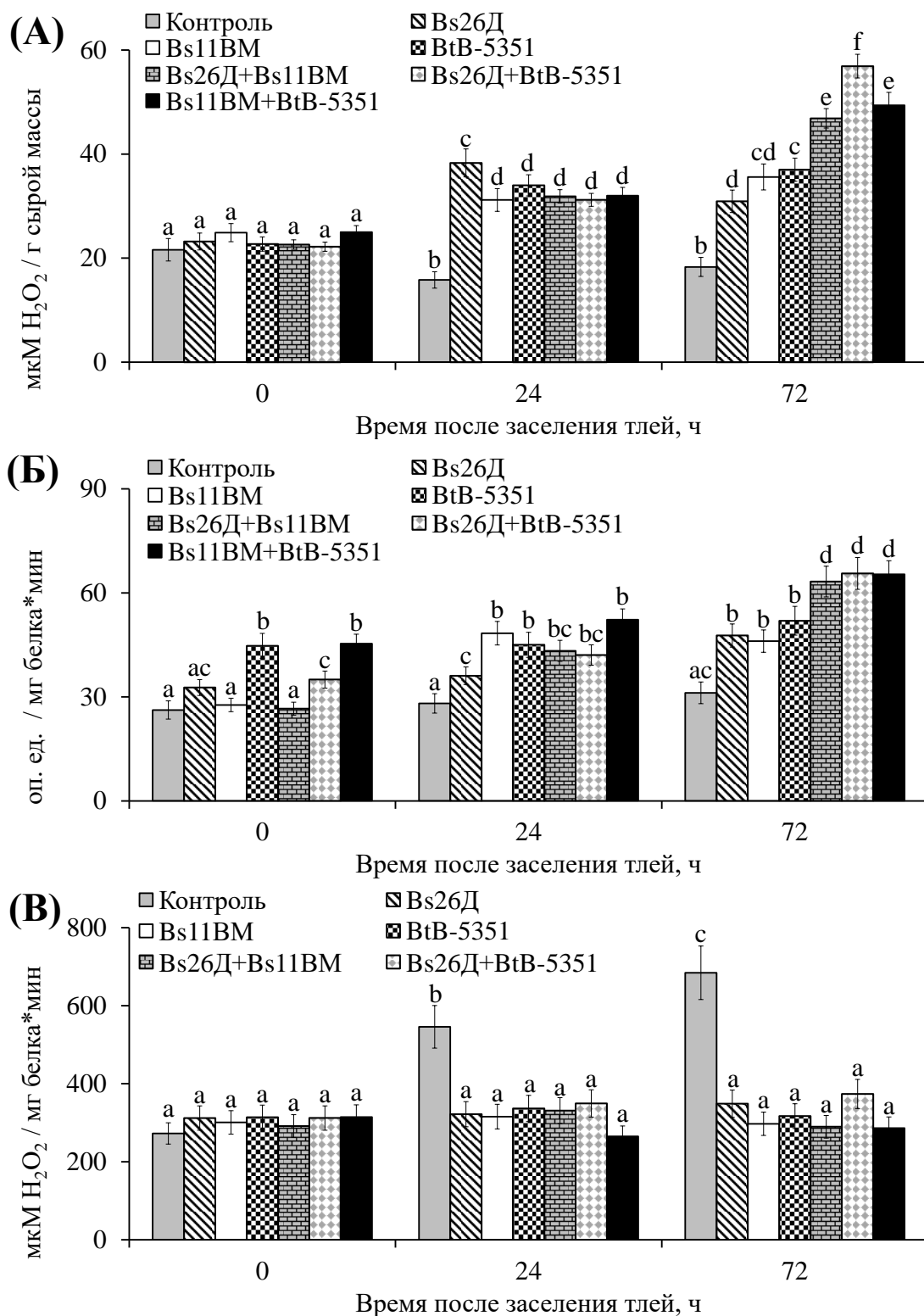


Рисунок 3.13 – Влияние бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д, 11ВМ и *B. thuringiensis* В-5351 и их композиций на содержание Н₂О₂ (А), активность пероксидазы (Б) и каталазы (В) в растениях пшеницы заселенных *S. graminum*. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Анализ опосредованного влияния рекомбинантных линий *B. subtilis* 26Дsfp⁻ дефицитной по синтезу сурфактина и *B. subtilis* 26ДCryChS синтезирующий CryIIa белок на показатели жизнеспособности тли показал возможность наличия элиситорного эффекта у сурфактина и CryIIa белка (табл. 3.14). Для проверки этого утверждения было изучено влияние этих рекомбинантных линий на редокс-статус растений пшеницы заселенных тлей (табл. 3.16).

Анализ состояния про-/антиоксидантной системы показал, что предпосевная обработка семян пшеницы рекомбинантной линией *B. subtilis* 26Дsfp⁻ не влияла на генерацию H₂O₂ и активность пероксидазы и каталазы у растений пшеницы заселенных тлей, эти показатели имели такие же значения как у растений не обработанных бактерией и заселенных тлей (табл. 3.16).

Предпосевная обработка семян пшеницы рекомбинантной линией *B. subtilis* 26ДCryChS приводила к накоплению H₂O₂, повышению активности пероксидазы и отсутствию повышения активности каталазы по сравнению с контролем, в листьях пшеницы, заселенных *S. graminum* так же как обработка штаммом *B. subtilis* 26Д (табл. 3.16). Данные результаты показывают, что сурфактин обладал элиситорной активностью и влиял на состояние про-/антиоксидантной системы растений, а CryIIa белок не увеличивал влияние штамма *B. subtilis* 26Д на генерацию H₂O₂ и активность пероксидаз.

Для изучения влияния трех ЛП – сурфактина, итурина и фенгицина и смеси сурфактин + итурин на редокс-статус растений заселенных тлей были изучены ЛБФ из трех штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-6066 и смесь ЛБФ двух штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ (рис. 3.14). Влияние ЛБФ на компоненты про-/антиоксидантной системы растений пшеницы заселенных злаковой тлей было сходным с влиянием самих штаммов на эти процессы (рис. 3.14). Однако ЛБФs26Д, ЛБФtВ-6066 и ЛБФs11ВМ значительно индуцировали накопление H₂O₂ только через 72 часа после заселения растений вредителем (рис. 3.14, А), в отличие от бактериальных штаммов, из которых были выделены эти ЛБФ, индуцировавших накопление

H₂O₂ через 24 часа питания вредителя (рис. 3.10) (Алексеев и др., 2021; Румянцев и др., 2022; Romyantsev et al., 2023).

Таблица 3.16 Влияние рекомбинантных линий *B. subtilis* 26Дsfp⁻ и *B. subtilis* 26ДCryChS на редокс-статус растений пшеницы заселенных *S. graminum*

Вариант обработки	Время после заселения тлей, часы	
	0	72
	Содержание H ₂ O ₂ , мкМ H ₂ O ₂ / г сырой массы	
<i>S. graminum</i>	24.1 ± 1.1a	18.3 ± 0.87b
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>S. graminum</i>	23.5 ± 0.35a	30.9 ± 3.1c
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻ + <i>S. graminum</i>	24.2 ± 1.3a	19.5 ± 1.0b
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS + <i>S. graminum</i>	22.5 ± 0.9a	31.2 ± 2.7c
	Активность пероксидазы, оп. ед. / мг белка * мин	
<i>S. graminum</i>	26.7 ± 2.1a	30.4 ± 2.3ab
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>S. graminum</i>	32.7 ± 2.3b	47.7 ± 3.5c
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻ + <i>S. graminum</i>	28.4 ± 2.5ab	29.1 ± 2.6ab
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS + <i>S. graminum</i>	31.5 ± 3.5b	50.3 ± 4.2c
	Активность каталазы, мкМ H ₂ O ₂ / мг белка * мин	
<i>S. graminum</i>	273 ± 20a	684 ± 45b
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>S. graminum</i>	312 ± 23a	349 ± 19a
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻ + <i>S. graminum</i>	265 ± 21a	712 ± 54b
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS + <i>S. graminum</i>	254 ± 18a	310 ± 25a

Примечание: Значения при измерении одного показателя, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

ЛБФVs11ВМ и ЛБФVs26Д повышали активность пероксидаз у растений, заселенных тлей, также как бактериальные штаммы *B. subtilis* 11ВМ и *B. subtilis* 26Д через 24 часа после начала кормления (рис. 3.14, Б, рис. 3.11). ЛБФVtВ-6066 увеличивала активность пероксидаз позже, чем обработка бактериальным штаммом *B. thuringiensis* В-6066, через 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3.14, Б). Обработка растений пшеницы ЛБФ не привела к увеличению активности каталаз при питании тли (рис. 3.14, В), также как и обработка бактериальными штаммами (рис. 3.12). Такие результаты могут указывать на возможную роль ЛП в индукции системной устойчивости пшеницы к обыкновенной злаковой тле.

Бактериальная композиция *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ проявила аддитивный эффект при влиянии на повышение содержания H_2O_2 и активности пероксидаз у растений заселенных тлей (рис. 3.13). Аддитивный эффект также был обнаружен при влиянии композиции ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ на содержание H_2O_2 и активность пероксидаз у растений пшеницы заселенных злаковой тлей (рис. 3.14). Эти результаты предполагают аддитивный эффект двух ЛП сурфактина и итурина (Алексеев и др., 2021; Rumyantsev et al., 2023).

Анализ состояния про-/антиоксидантной системы показал, что обработка растений бактериальными штаммами, ЛБФ и их композициями вызывала окислительный взрыв в растениях пшеницы заселенных тлей. Результаты данной работы предполагают, что ЛП сурфактин, итурин и фенгицин влияли на редокс-статус растений, изменяя активности ферментов и содержание АФК. Типичной реакцией формирования устойчивости к насекомым, питающимся флоэмным соком, считают окислительный взрыв (Koch et al., 2016; Rashid, Chung, 2017). Защитная роль повышенной генерации H_2O_2 в ответ на питание тли может заключаться как в прямом повреждающем вредителя действию высокого содержания H_2O_2 , так и в косвенном влиянии H_2O_2 посредством регуляции индукции СИУ (Rashid, Chung, 2017; Rashid et al., 2018). Сообщалось, что воздействие эндофитной бактерии *B. velezensis* YC7010 на корни арабидопсиса может вызывать системную устойчивость к тле за счет

повышенного накопления H_2O_2 , гибели клеток и отложения каллозы в листьях (Rashid et al., 2017).

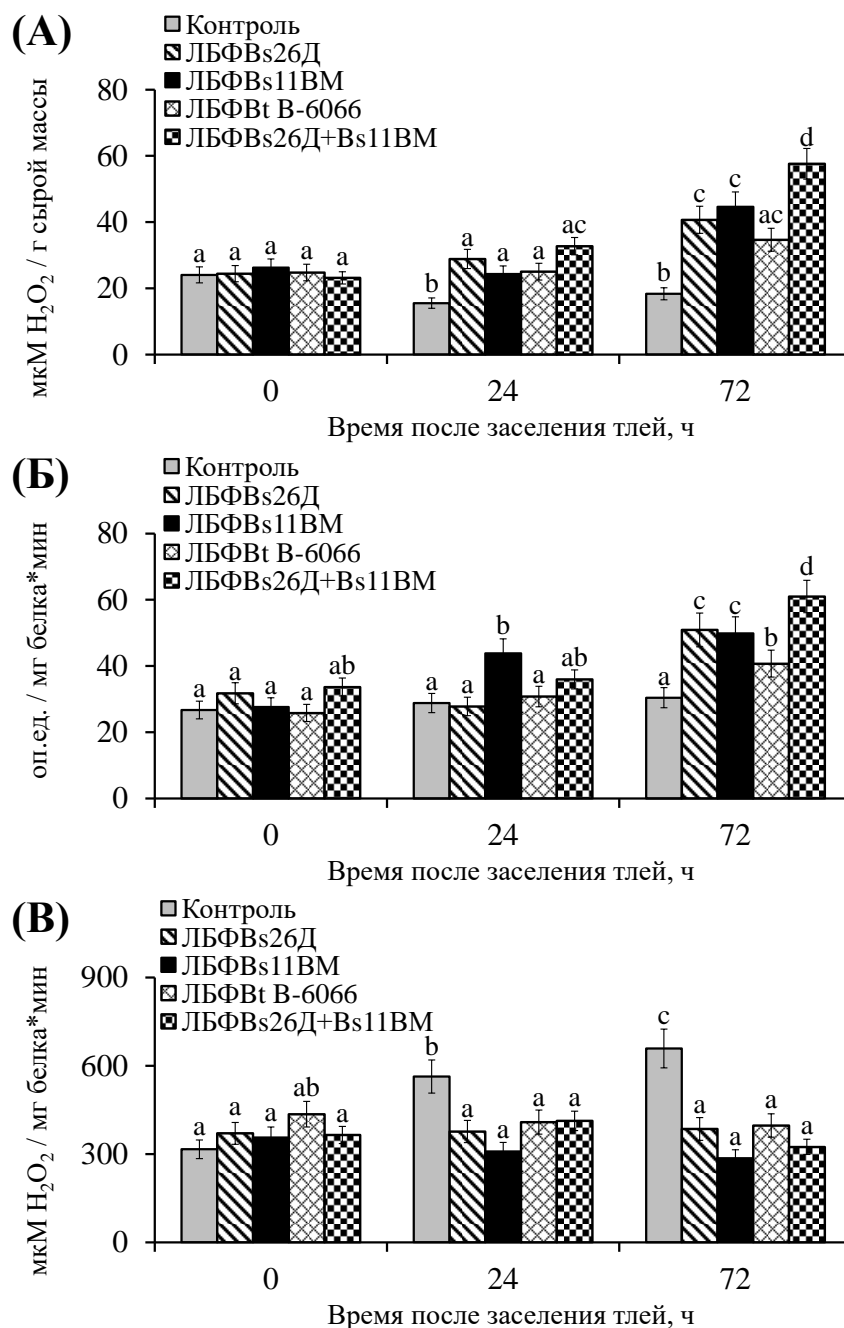


Рисунок 3.14 – Влияние ЛБФ из среды культивирования бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 и смеси ЛБФ двух штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ на содержание H_2O_2 (А), активность пероксидазы (Б) и каталазы (В) в растениях пшеницы, заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Также обработка растений бактериальными штаммами, ЛБФ и их композициями влияла на активность пероксидаз и каталаз в растениях заселенных тлей. Так показано, что активация апопластных пероксидаз совместно с высоким уровнем H_2O_2 приводила к реорганизации и укреплению клеточных стенок за счет лигнификации и синтеза фенолов (Koch et al., 2016). Низкая активность каталазы в фенотипах толерантных культур, зараженных тлей (Zhu-Salzman et al., 2004), а также снижение транскрипционной активности гена каталазы в устойчивом генотипе *Arabidopsis*, зараженном персиковой тлей *M. persicae* (Lei, Zhu-Salzman, 2015), способствовали развитию окислительного взрыва и толерантности.

К сожалению, работ, описывающих влияние бактерий, особенно бактериальных эндофитов, на активность пероксидаз и других окислительно-восстановительных ферментов у растений, зараженных насекомыми, очень мало (Веселова и др., 2019; Vano et al., 2017; Rashid et al., 2018; Ling et al., 2022). Представленные работы доказывают, что обработанные бактериями растения, заселенные насекомыми, проявляют повышенную активность пероксидаз, демонстрируя улучшение стратегии защиты растений от насекомых, индуцированной бактериями (Веселова и др., 2019; Vano et al., 2017; Rashid et al., 2018; Ling et al., 2022). Влияние ЛП на генерацию АФК и активность редокс-ферментов изучалось только при грибном патогенезе (Waewthongrak et al., 2014, Farzand et al., 2019). В этих работах показано, что сурфактин, итурин и фенгицин повышали активность пероксидаз при инфицировании растений различными грибными патогенами (Waewthongrak et al., 2014, Farzand et al., 2019). Также было показано, что смесь сурфактин + итурин, полученная из *Bacillus subtilis* ABS-S14, повышала экспрессию пероксидазы в плодах *Citrus sinensis*, инокулированных *Penicillium digitatum*, гораздо сильнее, чем сурфактин и итурин в отдельности, что приводило к устойчивости растений к заболеванию (Waewthongrak et al., 2014).

Результаты данной работы показывают, что изученные бактериальные штаммы и изоляты *Bacillus* spp. способны влиять на редокс-статус и накопление

АФК у растений пшеницы заселенных злаковой тлей благодаря выработке различных метаболитов, в том числе ЛП. Аддитивный эффект при влиянии на редокс-статус растений, который показали бактериальные смеси, достигался как за счет синтеза различных ЛП (смесь *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ), так и за счет других метаболитов (смеси *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351), таких как гормоны или ферменты или за счет улучшения эндофитности отдельных штаммов внутри смеси, но не выработки Cry1Ia белка штаммом *B. thuringiensis* В-5351.

3.4.2 Опосредованное влияние бактерий *Bacillus* spp., липопептид-богатых фракций и их смесей на гормональные сигнальные пути растений пшеницы, заселенных *S. graminum*

В последнее время стали появляться работы, свидетельствующие о развитии защитных реакций в растениях под влиянием эндофитных бактерий при атаке насекомыми (Rashid, Chung, 2017; Serateyn et al., 2020). Однако большинство исследовательских работ и обзоров посвящено изучению влияния бактерий на развитие СИУ в растениях против насекомых с грызущим ротовым аппаратом (Rashid, Chung, 2017). Гораздо меньше работ о влиянии эндофитных бактерий на иммунные реакции растений против насекомых, питающихся флоэмным соком (Rashid et al., 2018; Serateyn et al., 2020; Rummyantsev et al., 2023). Индукция гормональных сигнальных путей зависит от пищевого поведения насекомых (Pineda et al., 2010; Rashid, Chung, 2017). Сигнальные пути СК, ЖК и этилена могут по-разному регулировать защитные реакции против определенных типов насекомых (Van Oosten et al., 2008). ЖК-опосредованная защита активируется в основном против насекомых с грызущим ротовым аппаратом (Van Oosten et al., 2008; Pineda et al., 2010; Rashid, Chung, 2017). СК-опосредованная защита активируется в основном против насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом (Van Oosten et al., 2008; Pineda et al., 2010; Rashid, Chung, 2017). При этом показано, что бактерии

запускают СИУ в растениях против насекомых, питающихся флоэмным соком по ЖК/этилен- и СК-защитным путям (Argandona et al., 2001; Rashid et al., 2018; Romyantsev et al., 2023). Важную роль в индукции системной индуцированной устойчивости опосредованной эндофитными бактериями могут играть бактериальные метаболиты, такие как ЛП и Сгу-белки (Palma et al., 2014a; Rashid et al., 2018; Tunsagool et al., 2019; Romyantsev et al., 2023), однако этот вопрос еще изучен недостаточно.

Одним из показателей формирования системной устойчивости в растениях считается экспрессия генов, кодирующих PR-белки, регулируемая промежуточными продуктами сигнальных систем клеток (например, H_2O_2) и фитогормонами (Van Loon et al., 2006). Для определения способности бактерий *Bacillus* spp. регулировать СИУ в растениях пшеницы против обыкновенной злаковой тли *S. graminum* была изучена экспрессия генов, кодирующих PR-белки, маркеры и регуляторы СК- и ЖК/этилен -сигнальных путей. Белки PR1, PR-2 (глюканазы) - маркеры СК-сигнального пути. Белки PR3 (хитиназы) считаются маркерами этиленового сигнального пути, а PR6 (ингибиторы протеиназ) - маркеры ЖК-сигнального пути. Белки PR9 (пероксидазы) индуцируются как СК, так и ЖК (Van Loon et al., 2006).

PR1 белки – маркеры СК-сигнального пути – представляют собой первое открытое семейство PR-белков (Van Loon et al., 2006). PR1 белки в большом количестве синтезируются в растениях при атаке патогенами, вирусами, насекомыми-вредителями (Van Loon et al., 2006; Luo et al., 2020; Rubil et al., 2022). Установлено, что при атаке тлей PR1 белок участвует в регуляции отложения каллозы, которая играет важную роль в защитных реакциях растений на заселение тлей (Silva-Sanzana et al., 2020; Rubil et al., 2022). Активация гена *PR1* была локализована в пространстве и времени с отложением каллозы вокруг мест питания капустной тли *Brevicoryne brassicae* в листьях *Arabidopsis thaliana* (Rubil et al., 2022). Экспрессия генов растительных ферментов β -1.3-глюканаз, объединенных в семейство патоген-индуцируемых

белков PR2, также регулируется СК, а ген *PR2* считают маркерным геном СК-сигнального пути (Van Loon et al., 2006).

PR3 белки (хитиназы) широко распространены в природе, их выделяют из грибов, растений, животных, бактерий, вирусов и насекомых (Van Loon et al., 2006). Хитиназы обладают существенным ингибирующим эффектом в отношении широкого спектра патогенов, их механизм действия заключается в разрушении хитина, одного из основных структурных компонентов клеточной стенки грибов и панциря насекомых (Van Loon et al., 2006). Хитиназа из различных штаммов *Bacillus* spp. вызывала повышенную смертность бахчевой и картофельной тли, гусениц табачной совки, блокируя активность большинства кишечных ферментов, необходимых для питания насекомых (Chandrasekaran et al., 2014; Kahia et al., 2021).

PR6 белки (ингибиторы протеиназ) нарушают функцию пищеварительной системы насекомых (Boter et al., 2004; Яруллина и др., 2016). Ингибиторы сериновых протеаз гороха проявляли афицидную активность, а рост популяции и плодовитость гороховой, хлопково-бахчевой тли, картофельной тли и персиковой тли были ниже при кормлении рационом, содержащим цистеиновые ингибиторы протеаз (Nalam et al., 2019).

PR9 белки – пероксидазы, ферменты про-/антиоксидантной системы, образующие в растениях мультигенное семейство ферментов класса III (Минибаева, Гордон, 2003; Almagro et al., 2009). Пероксидазы являются важным компонентом непосредственной реакции растений на атаку насекомых. При питании насекомых пероксидазы, полифенолоксидазы, аскорбатпероксидазы и другие пероксидазы, окисляющие моно- или дигидроксифенолы до хинонов нарушают усвоение питательных веществ насекомыми, так как хиноны связываются с белками листьев и препятствуют их перевариванию в кишечнике насекомых (Gulsen et al., 2010). Также пероксидазы в присутствии высоких концентраций H_2O_2 участвуют в образовании лигнина или суберина (Минибаева, Гордон, 2003; Almagro et al., 2009). Участие H_2O_2 и пероксидаз в стимуляции реорганизации клеточной стенки было показано у ячменя после

заражения тлями *S. graminum* и *R. padi* (Argandona et al., 2001). Кормление *S. graminum* на растениях пшеницы индуцировало экспрессию многих генов, кодирующих ферментативные или неферментативные белки, связанные с динамикой клеточной стенки растений (Zhang et al., 2019).

В данной работе у средневосприимчивого сорта СЮ отмечено незначительное по сравнению с контролем повышение уровня транскриптов генов *PR3*, также увеличение содержания мРНК гена *PR6* в 2.7 раза, маркеров этиленового- и ЖК-сигнальных путей, соответственно, а также повышение уровня экспрессии гена *PR9* в 2 раза по сравнению с контролем через 72 часа после заселения растений тлей (табл. 3.17). Влияние бактериальной обработки на экспрессию *PR*-генов имело иную картину (табл. 3.17). Все восемь бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. повышали содержание мРНК гена *PR9* по сравнению с контролем у растений, заселенных тлей, причем пять из них в гораздо большей степени, чем индуцировала тля *S. graminum* (табл. 3.17). Это были штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. subtilis* Ttl2 и два изолята *Bacillus* sp. Tas8.2 и Stl7 (табл. 3.17).

Семь штаммов и изолятов, за исключением изолята *Bacillus* sp. Tas1 повышали уровень экспрессии гена *PR3*, через 72 часа после заселения растений тлей (табл. 3.17). Только два штамма *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ и два изолята *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Tas1 достоверно повышали уровень экспрессии генов *PR1* и *PR2*, регулируемых СК, через 72 часа после заселения растений тлей (табл. 3.17). Только два штамма *B. thuringiensis* В-6066 и *B. thuringiensis* В-5351 индуцировали высокий уровень экспрессии гена *PR6* по сравнению с контролем и необработанными заселенными тлей растениями через 72 часа после начала кормления (табл. 3.17). Обработка растений остальными шестью штаммами и изолятами снижала экспрессию этого гена по сравнению с необработанными заселенными тлей растениями (табл. 3.17).

Таким образом, предпосевная обработка бактериальными штаммами *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ и изолятами *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Tas1 приводила к индукции СК- и этиленового-сигнальных путей у растений

заселенных злаковой тлей. Предпосевная обработка бактериальным штаммом *B. subtilis* Ttl2 и изолятом *Bacillus* sp. Stl7 индуцировала в растениях заселенных тлей этиленовый сигнальный путь. А предпосевная обработка бактериальными штаммами *B. thuringiensis* B-6066 и *B. thuringiensis* B-5351 индуцировала ЖК/этилен-сигнальные пути у растений заселенных тлей.

Таблица 3.17 Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. на транскрипционную активность генов, кодирующих PR-белки пшеницы через 72 часа после заселения растений *S. graminum*

Вариант обработки	Гены, содержание мРНК, % от контроля				
	<i>TaPR1</i>	<i>TaPR2</i>	<i>TaPR3</i>	<i>TaPR6</i>	<i>TaPR9</i>
Контроль	100 ± 5a	100 ± 4a	100 ± 62a	100 ± 3a	100 ± 7a
<i>S. graminum</i>	66 ± 3b	126 ± 5a	143 ± 5ac	270 ± 18b	200 ± 16b
Bs 26Д + <i>S. graminum</i>	382 ± 23c	223 ± 15b	240 ± 12b	180 ± 6c	375 ± 22c
B Tas 1 + <i>S. graminum</i>	80 ± 4a	200 ± 18b	130 ± 4ac	140 ± 4d	180 ± 15b
B Tas 8.2 + <i>S. graminum</i>	250 ± 17d	300 ± 24c	160 ± 13c	123 ± 5a	260 ± 6d
Bs 11BM + <i>S. graminum</i>	170 ± 15e	120 ± 5a	200 ± 18b	70 ± 10e	405 ± 29e
Bs Ttl2 + <i>S. graminum</i>	80 ± 2a	85 ± 4a	300 ± 19d	83 ± 3a	402 ± 32e
B Stl7 + <i>S. graminum</i>	110 ± 3a	100 ± 6a	250 ± 17b	90 ± 4a	452 ± 37e
Bt B-6066+ <i>S. graminum</i>	70 ± 3ab	140 ± 5d	350 ± 19d	380 ± 9f	180 ± 17b
Bt B-5351+ <i>S. graminum</i>	120 ± 7a	128 ± 9a	180 ± 16cb	430 ± 21f	190 ± 19b
Bs 26Дsfp + <i>S. graminum</i>	87 ± 6a	111 ± 5a	103 ± 8a	92 ± 7a	111 ± 6a
Bs 26ДCryChS + <i>S. graminum</i>	310 ± 25d	120 ± 12a	600 ± 56e	520 ± 48f	220 ± 18b

Примечание: Значения в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Обработка семян пшеницы рекомбинантной линией *B. subtilis* 26Дsfp- не приводила к накоплению мРНК изученных генов (табл. 3.17). Эти результаты говорят об элиситорной роли сурфактина и его влиянии на иммунную систему растений.

Обработка семян пшеницы рекомбинантной линией *B. subtilis* 26DCryChS приводила к повышению содержания мРНК всех исследуемых генов, кроме *PR2* у растений, заселенных тлей (табл. 3.17). Причем уровень транскриптов гена *PR1* линия *B. subtilis* 26DCryChS увеличивала примерно также как штамм *B. subtilis* 26Д (табл. 3.17). А содержание мРНК генов *PR3* и *PR6* линия *B. subtilis* 26DCryChS повышала гораздо сильнее, чем штамм *B. thuringiensis* В-5351 (табл. 3.17). Данные результаты показывают, что рекомбинантная линия *B. subtilis* 26DCryChS способна индуцировать как ЖК/этилен-, так и СК-сигнальные пути. Другими словами штамм *B. subtilis* 26Д после встраивания в геном *CryIIa* гена приобрел способность индуцировать ЖК-сигнальный путь связанный с активацией ингибиторов протеиназ и усилил свое влияние на хитиназы.

Далее в работе было исследовано влияние трех бактериальных композиций *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 на индукцию экспрессии *PR*-генов. Предпосевная обработка бактериальными штаммами и их композициями индуцировала экспрессию всех изученных генов *PR1*, *PR3*, *PR6* и *PR9*, но у каждого штамма и смеси характер индукции был различный (рис. 3.15, рис. 3.16).

Как показали результаты штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ значительно индуцировали экспрессию маркерного гена СК-сигнального пути *PR1* через 24 и 72 часа после заселения растений тлей, содержание мРНК гена *PR1* повышалось в 3-4 раза по сравнению с контрольными растениями (рис. 3.15, А) (Rumyantsev et al., 2023). Штамм *B. thuringiensis* В-5351 не влиял на экспрессию данного гена (рис. 3.15, А). Из трех бактериальных смесей только две значительно индуцировали экспрессию гена *PR1* *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351, проявляя при этом аддитивный эффект (рис. 3.15, А). Скорее всего, аддитивный эффект проявлялся за счет улучшения свойств эндофитности вторых штаммов в композициях (*B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-5351) (табл. 3.6) и в смеси *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis*

11ВМ возможно было сложение влияния двух липопептидов сурфактина и итурина.

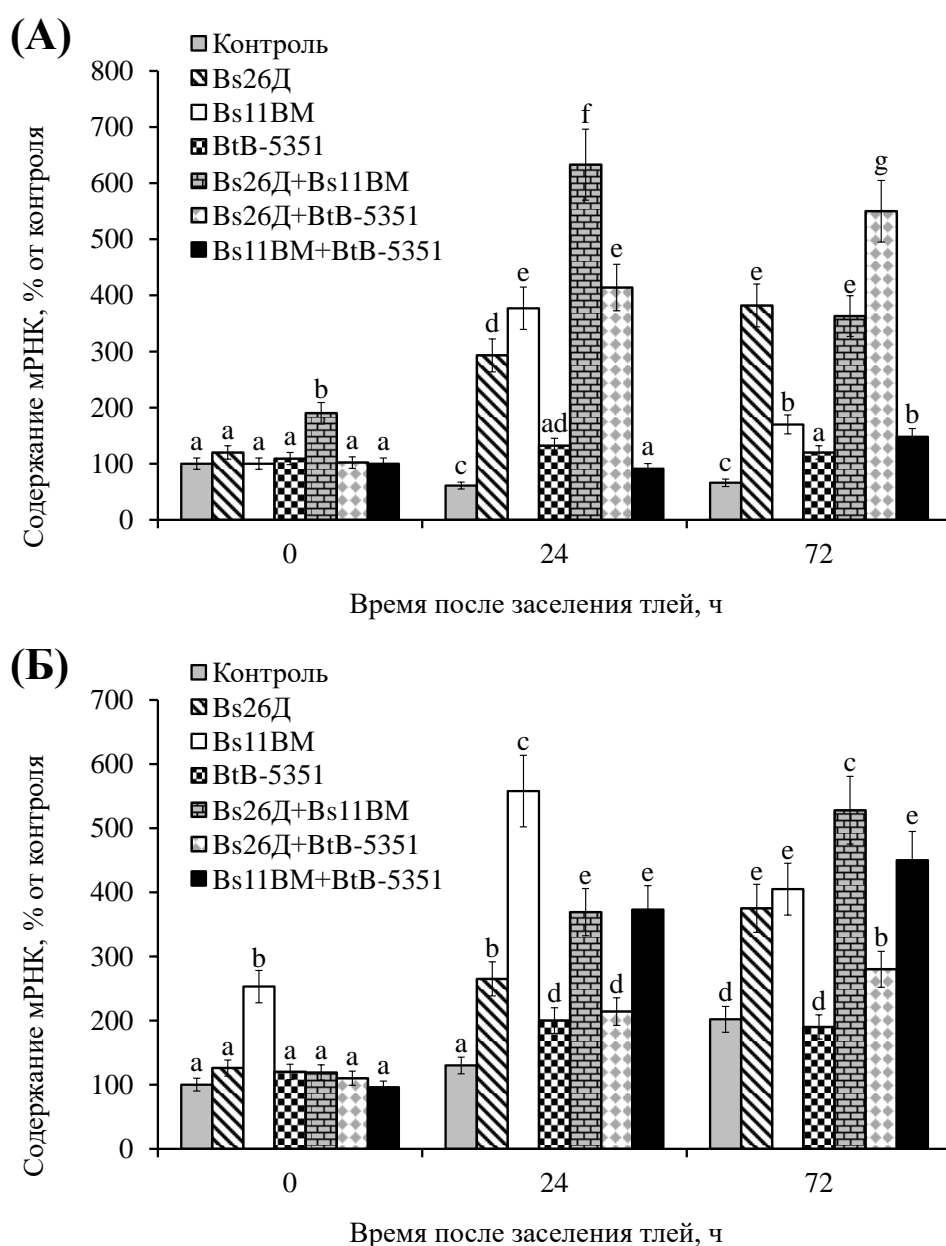


Рисунок 3.15 – Влияние бактериальных штаммов *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и их композиций на транскрипционную активность генов *TaPR1* (А) и *TaPR9* (Б) в растениях пшеницы, заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Транскрипцию гена *PR9* через 24 часа после заселения растений тлей индуцировали все три штамма и их смеси (рис. 3.15, Б). Однако штамм *B. subtilis* 11ВМ и композиции с этим штаммом *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 влияли на экспрессию данного гена гораздо сильнее, чем штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* В-5351 и их композиция в этой временной точке (рис. 3.15, Б). Через 72 часа после заселения растений тлей влияние штамма *B. subtilis* 11ВМ на транскрипцию гена *PR9* несколько снижалось и повышалось влияние штамма *B. subtilis* 26Д (рис. 3.15, Б). При этом композиция *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ проявила аддитивный эффект при влиянии на транскрипцию гена *PR9* через 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3.15, Б), который мог проявиться благодаря влиянию двух липопептидов сурфактина и итурина (Rumyantsev et al., 2023).

Транскрипцию гена *PR3*, маркера этиленового сигнального пути, через 24 часа после заселения растений тлей значительно индуцировали все три штамма и все три композиции штаммов (рис. 3.16, А).

Однако два штамма *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-5351 оказывали наибольший эффект на содержание мРНК гена *PR3* через 24 часа после заселения растений тлей, уровень транскриптов повышался в 5 раз (рис. 3.16, А). Все три композиции проявили аддитивный эффект при влиянии на экспрессию гена *PR3* через 24 часа после заселения растений тлей, содержание мРНК гена в это время повышалось в 7-9 раз (рис. 3.16, А). Через 72 часа после заселения растений тлей обработка бактериальными штаммами и их композициями слабо влияла на экспрессию гена *PR3* (рис. 3.16, А).

Транскрипцию гена *PR6*, маркера жасмонатного сигнального пути у растений, заселенных тлей, значительно индуцировал только штамм *B. thuringiensis* В-5351 и две бактериальные композиции, содержащие этот штамм *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 (рис. 3.16, Б). Причем только смесь *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 проявляла аддитивный эффект (рис. 3.16, Б). Обработка растений штаммами *B.*

subtilis 26Д и *B. subtilis* 11ВМ и их композицией либо не влияла на экспрессию данного гена, либо подавляла ее (рис. 3.16, Б).

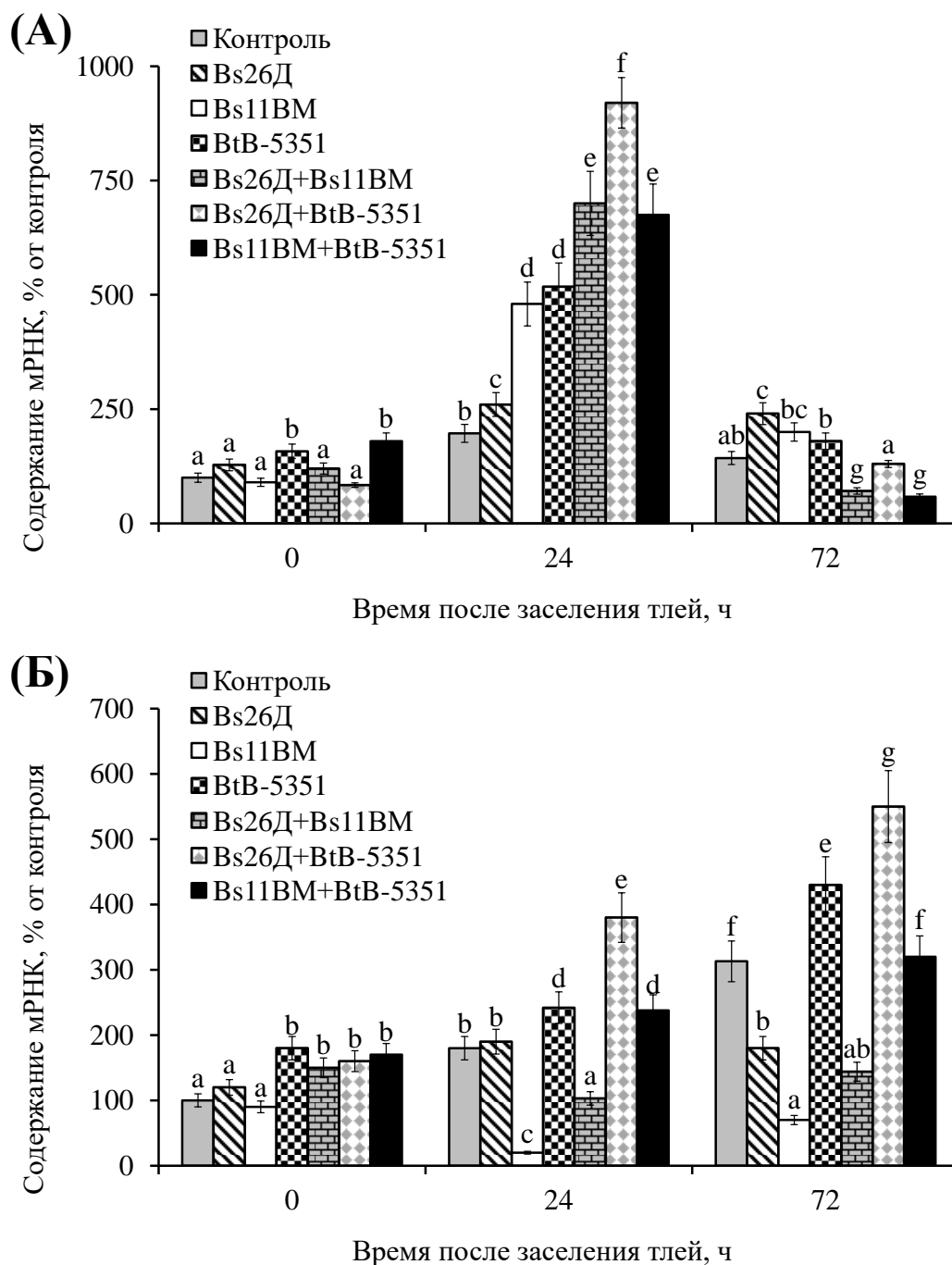


Рисунок 3.16 – Влияние бактериальных штаммов *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и их композиций на транскрипционную активность генов *TaPR3* (А) и *TaPR6* (Б) в растениях пшеницы, заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Таким образом, все три композиции бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 оказывали влияние на иммунную систему растений, индуцируя системную устойчивость. Однако бактериальные штаммы и их композиции по-разному запускали гормональные сигнальные пути. Так штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и их смесь индуцировали СК- и этилен-сигнальные пути, а штамм *B. thuringiensis* В-5351 запускал ЖК/этилен-сигнальные пути. Бактериальная композиция *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 значительно индуцировала транскрипцию трех генов *PR9*, *PR3* и *PR6*, и не запускала экспрессию маркера СК-пути гена *PR1*, несмотря на то, что штамм *B. subtilis* 11ВМ значительно индуцировал экспрессию этого гена. Напротив, бактериальная смесь *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 индуцировала экспрессию всех изученных маркеров - *PR1*, *PR9*, *PR3* и *PR6*, а значит запускала СК-, ЖК- и этилен-сигнальные пути.

Чтобы проверить элиситорную роль ЛП, было изучено влияние ЛБФ из трех штаммов и влияние смеси ЛБФs26Д + ЛБФs11ВМ на транскрипцию *PR*-генов у растений заселенных тлей (рис. 3.17, рис. 3.18).

Характер влияния ЛБФ на экспрессию *PR*-генов был сходным с влиянием штаммов на этот показатель, однако степень влияния ЛБФ и штаммов различалась (рис. 3.17, рис. 3.18). Обработка ЛБФs26Д влияла на накопление транскриптов генов *PR1* и *PR2* у растений, зараженных *S. graminum*, в большей степени, чем обработка штаммом *B. subtilis* 26Д (рис. 3.17, А, Б). Обработка ЛБФs11ВМ повышала уровень экспрессии генов *PR1* и *PR3* у растений, зараженных *S. graminum*, в два раза больше, чем обработка штаммом *B. subtilis* 11ВМ (рис. 3.17, рис. 3.18). Влияние ЛБФtВ-6066 на экспрессию *PR*-генов напоминало действие штамма *B. thuringiensis* В-6066 (рис. 3.17, рис. 3.18). Важно, что экспрессия некоторых *PR*-генов, индуцированная ЛБФ, активировалась позже, чем при обработке соответствующими бактериальными штаммами, через 3 или 6 суток после заселения растений тлей (рис. 3.17, рис. 3.18).

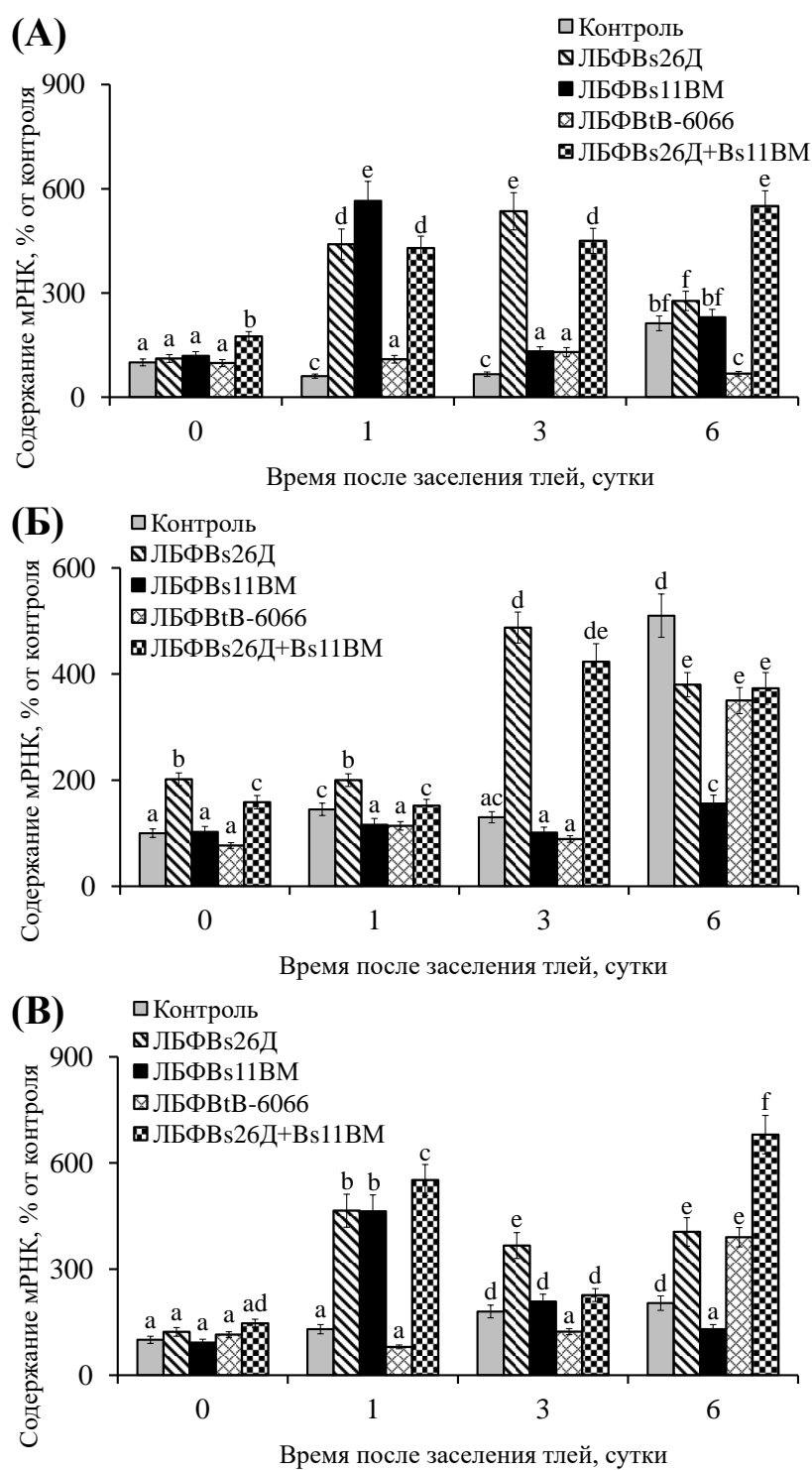


Рисунок 3.17 – Влияние ЛБФ из среды культивирования бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11BM и *B. thuringiensis* B-6066 и смеси ЛБФ двух штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11BM на транскрипционную активность генов *TaPR1* (А), *TaPR2* (Б) и *TaPR9* (В) в растениях пшеницы заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

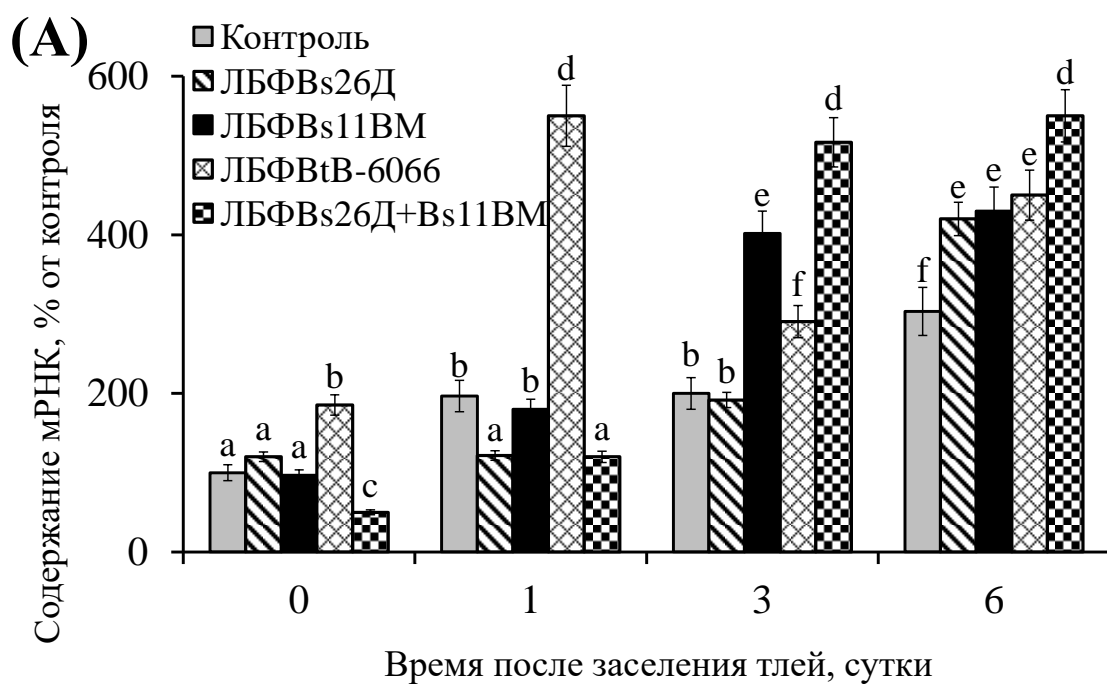


Рисунок 3.18 – Влияние ЛБФ из среды культивирования бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 и смеси ЛБФ двух штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ на транскрипционную активность генов *TaPR3* (А) и *TaPR6* (Б) в растениях пшеницы заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Таким образом, результаты данной работы показывают, что бактериальные штаммы индуцируют экспрессию защитных *PR*-генов у растений, заселенных тлей, благодаря синтезу ими ЛП.

Обработка растений смесью ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ влияла на экспрессию *PR*-генов как композиция штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ (рис. 3.17, рис. 3.18). При этом смесь ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ проявляла аддитивный эффект при влиянии на экспрессию генов *PR1* и *PR9* через 6 суток после заселения растений тлей и на экспрессию гена *PR3* через 3 и 6 суток после заселения растений тлей (рис. 3.17, рис. 3.18). Таким образом, аддитивный эффект бактериальной композиции *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ полностью совпал с аддитивным эффектом смеси ЛБФ из этих штаммов в отношении индукции экспрессии *PR*-генов, что подтверждает роль ЛП во влиянии на аддитивные эффекты смесей (Rumyantsev et al., 2023).

Индукция гормональных сигнальных путей зависит от пищевого поведения насекомых (Pineda et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017). Так ЖК-опосредованная защита активируется против насекомых с грызущим ротовым аппаратом, а СК-опосредованная защита активируется против насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом (Pineda et al., 2010; Rashid, Chrung, 2017). Предполагается, что этилен играет важную роль в индуцированной резистентности к вредителям (Lu et al., 2014). Однако сведения ограничены и часто противоречивы (Lu et al., 2014).

Анализ экспрессии генов маркеров сигнальных путей СК, ЖК и этилена показал, что питание тлей на контрольных растениях в данной работе приводило к активации только генов, связанных с ЖК/этилен-зависимым ответом (*PR3* и *PR6*). Из литературы известно, что первым фактором, индуцирующим защитную реакцию растений на заражение насекомыми с колюще-сосущим ротовым аппаратом, является механическое повреждение, которое, как полагают, управляет ЖК-зависимой активацией ингибиторов протеиназ и липоксигеназы (Morkunas et al., 2011). В некоторых работах было показано, что сигнальный путь ЖК активировался как у восприимчивых, так и

у устойчивых к тле растений, а индукция сигнального пути СК была быстрее и сильнее только у устойчивых генотипов (Morkunas et al., 2011). Роль СК в защитном ответе на питание тли отмечена у многих видов растений (Morkunas et al., 2011). Более того, многочисленные исследования показали, что активация СК-сигнального пути может быть распространенным механизмом антибиоза к тле у резистентных хозяев (Rashid, Chung, 2017). В данной работе два штамма *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ и два изолята *Bacillus* sp. Tas8.2 и *Bacillus* sp. Tas1 индуцировали у растений заселенных тлей СК-зависимый защитный ответ, как предполагается за счет синтеза сурфактина и итурина. Так ранее было показано, что сурфактин индуцировал защитный ответ в культуре клеток винограда против *Botrytis cinerea* (Farace et al., 2015), а итурин А индуцировал защитный ответ в растениях томатов против *Rhizopus stolonifer* по СК-защитному пути (Jiang et al., 2021).

Сведения о роли этилена в защите растений от тли гораздо меньше и зачастую противоречивы. В некоторых исследованиях наблюдалось повышение уровня этилена в сортах ячменя, устойчивых к тле *Schizaphis graminum* и *Rhopalophum padi* (Argandona et al. 2001). В другой работе было показано, что передача сигналов этилена способствует заселению тлей на восприимчивые растения, но содействует антиксенотической защите у устойчивых генотипов на стадии отбора хозяев (Wu et al., 2015). В серии работ было показано, что один из главных белков сигнального пути этилена EIN2 (ethylene insensitive2) вместе с транскрипционным фактором MYB44 регулируют устойчивость растений к тлям через флоэму (Phloem-Based Defense (PBD)) (Dong et al., 2004; Liu et al., 2010; Fu et al., 2014; Lu et al., 2023). Этот защитный механизм заключается в полимеризации лектиновых белков флоэмы и глюкоанов с образованием полимеров с высокой молекулярной массой, которые блокируют поры ситовидной пластинки флоэмы и, следовательно, препятствуют питанию тлей (Dong et al., 2004; Liu et al., 2010). Такая защита была продемонстрирована на растениях арабидопсиса заселенных *M. persicae* и на растениях пшеницы пораженных большой злаковой тлей *Sitobion avenae* (Fu et al., 2014; Lu et al.,

2023). И было показано, что именно этиленовый сигнальный путь необходим для активации белков флоэмы (Fu et al., 2014; Lu et al., 2023). В данной работе обработка растений штаммом *B. subtilis* 11ВМ, его ЛБФ или композициями с этим штаммом *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 кроме СК-зависимых генов значительно индуцировала экспрессию маркерного гена этиленового сигнального пути *PR3*, как предполагается за счет синтеза итурина. Так недавно было показано, что при грибковом патогенезе итурин индуцирует СК-зависимые гены (*PR1*, *PAL*) и этилензависимые гены (*PR3*, *AOC*, *ACS*), но не ЖК-зависимые гены (*LOX*) (Tunsagool et al., 2019; Jiang et al., 2021).

Давно известен антагонизм сигнальных путей СК и ЖК во многих патосистемах (Pieterse et al., 2014). Однако результаты данной работы показали, что бактериальные штаммы и изоляты активировали как СК/этилен-зависимый защитный ответ, так и ЖК/этилен-зависимый ответ, а бактериальные композиции активировали сразу три гормональных сигнальных пути и проявляли аддитивный эффект в индукции защитных реакций – увеличивали смертность насекомых и выносливость растений.

Обработка растений бобов штаммом *B. amyloliquefaciens* FZB42 снижала размножение гороховой тли *A. pisum* и повышала содержание как СК, так и ЖК в растениях, в этом исследовании фитогормоны СК и ЖК не показали признаков отрицательного перекрестного влияния (Sertejn et al., 2020). В другом исследовании с помощью высокопроизводительного транскриптомного анализа было показано, что системная устойчивость к бурой рисовой цикадке *Nilaparvata lugens* была индуцирована *B. velezensis* YC7010 посредством запуска как СК, так и ЖК путей (Rashid et al., 2018).

Несмотря на растущий интерес к бактериально-опосредованной СИУ против насекомых, питающихся флоэмным соком, основные молекулярные и химические механизмы этого явления остаются неясными (Valenzuela-Soto et al., 2010; Pangesti et al., 2016; Rashid et al., 2017; Rashid et al., 2018). Результаты данной работы предполагают, что бактериальные композиции оказывали

аддитивный эффект в защите растений от тли, поскольку индуцировали несколько гормональных сигнальных путей, что согласуется с предположениями других авторов (Pangesti et al., 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсификация сельского хозяйства привела к значительному усилению вредоносности тлей на зерновых культурах. Эффективным способом повышения устойчивости зерновых культур к тлям является применение биологических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*, синтезирующих широкий спектр антибиотических веществ белковой природы (Miljakovic et al., 2020). Особое внимание ученых в последнее время привлекают эндофитные бактерии, имеющие огромное преимущество перед филлосферными и ризосферными микроорганизмами (Oukala et al., 2021; Santoyo, 2022). Однако в отличие от ризосферных бактерий механизмы действия эндофитов еще изучены недостаточно. Бактерии, живущие в эндосфере растений, являются частью всего микробиома и действуют во взаимосвязи с другими организмами, однако совместное действие различных бактерий на растения практически не изучено. Важной задачей является изучение аддитивных механизмов действия бактериальных смесей, которое приблизит нас к расшифровке функционирования всего микробиома растения или созданию искусственных микробиомов (Oukala et al., 2021). Каждая бактерия синтезирует не один метаболит, а пул метаболитов, влияющих на другие организмы. Однако исследования по совместному применению разнообразных метаболитов пока ограничены и требуют изучения и дополнения.

В данной работе изучено девять штаммов и изолятов *Bacillus* spp. из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. Оценена эндофитность семи бактериальных штаммов и изолятов с использованием стерильных пробирочных растений пшеницы. Среди изученных бактерий штамм *B. subtilis* 26Д показал самую высокую способность проникать в ткани пшеницы и размножаться там. Восемь штаммов и изолятов рода *Bacillus* были протестированы на наличие генов липопептид-синтаз и были обнаружены гены биосинтеза сурфактина, итурина и фенгицина. Кроме того, с помощью ВЭЖХ в липопептид богатой фракции (ЛБФ) клеточного фильтрата двух штаммов *B.*

subtilis 26Д и *B. subtilis* 11ВМ было показано содержание ЛП, которые соответствовали коммерческим ЛП – сурфактину и итуруину, соответственно. Три штамма *B. thuringiensis* В-5689, В-5351 и В-6066 были протестированы на наличие генов Cry-белков. У штамма *B. thuringiensis* В-5351 был обнаружен ген *cryIIa*, у штамма *B. thuringiensis* В-6066 был обнаружен ген *cryIAb*. У штамма *B. thuringiensis* В-5689 не было обнаружено изучаемых генов Cry-белков, кроме того, эффект этого штамма на обыкновенную злаковую тлю уже был изучен (Веселова и др., 2019), поэтому в дальнейшую работу его не взяли. Кроме того, изученные в работе штаммы и изоляты *Bacillus* spp. обладали высокой рибонуклеазной активностью и синтезировали фитогормоны ЦК и ауксины.

Проверка афицидной активности восьми штаммов и изолятов рода *Bacillus* показала, что все бактерии обладали высокой инсектицидной активностью против обыкновенной злаковой тли *S. graminum*, которая проявлялась благодаря синтезу ими ЛП и Cry-белков. Этот факт был доказан с помощью ЛБФ и двух рекомбинантных линий: *B. subtilis* 26ДСfr⁻ дефицитной по синтезу сурфактина и *B. subtilis* 26ДCryChS с интегрированным геном, кодирующим инсектицидный белок CryIIa от бактерии *B. thuringiensis*.

Были подобраны рост-стимулирующие концентрации бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. и их ЛБФ, которые оказались также иммуностимулирующими концентрациями. Предпосевная обработка семян пшеницы бактериальными штаммами и изолятами *Bacillus* spp. и обработка растений ЛБФ в этих концентрациях повышала не только толерантность растений к обыкновенной злаковой тле, что выражалось в ускорении роста листьев растений при кормлении вредителя. Но также, бактериальные штаммы и изоляты *Bacillus* spp. и их ЛБФ в рост-стимулирующих концентрациях опосредованно влияли на жизненные показатели злаковой тли, кормившейся на обработанных растениях пшеницы, увеличивая смертность тли и уменьшая ее плодовитость и размножаемость. Такое опосредованное влияние бактерий на рост растений было связано с синтезом бактериями фитогормонов, обеспечивающих прямое влияние на рост, и с синтезом ЛП, влияющих на

ростовые параметры опосредованно через уменьшение нагрузки на растение со стороны вредителя, улучшение свойств эндوفитности бактерий и запуск защитных реакций в растениях (Сорокань и др., 2019; Miljakovic et al., 2020; Chaudhary et al., 2022). Это утверждение подтверждается тем, что все бактерии синтезировали ЦК и ауксины, а ЛБФ показали рост-стимулирующий эффект на растениях, заселенных злаковой тлей. Кроме этого, рекомбинантная линия *B. subtilis* 26ДСfr⁻ и ее ЛБФ не стимулировали рост листьев растений заселенных тлей, что подтверждает утверждение о влиянии сурфактина на стимуляцию роста растений. В отличие от ЛП, Cry1Ia белок не влиял на рост-стимулирующие свойства штаммов, что было показано с помощью рекомбинантной линии *B. subtilis* 26DCryChS, которая не увеличивала рост листьев пшеницы заселенных тлей по сравнению с материнским штаммом *B. subtilis* 26Д.

Опосредованное влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. на жизнеспособность злаковой тли связывают с запуском системной индуцированной устойчивости (СИУ), при которой происходит регуляция редокс-статуса растений и гормональных сигнальных путей, что приводит к синтезу различных защитных метаболитов и повышению смертности вредителя (Lee et al., 2022). Все изученные бактериальные штаммы и изоляты *Bacillus* spp. влияли на редокс-статус растений, вызывая окислительный взрыв в растениях пшеницы заселенных тлей и повышали экспрессию *PR*-генов, активируя как СК/этилен-зависимый защитный ответ, так и ЖК/этилен-зависимый ответ. Косвенное влияние бактерий на защитные механизмы растений связывают с элиситорной ролью бактериальных метаболитов (Lee et al., 2022). Результаты данной работы показали, что ЛП сурфактин, итурин и фенгицин и Cry1Ia белок обладали элиситорной активностью и опосредованно участвовали в развитии защитных реакций растений пшеницы против обыкновенной злаковой тли *S. graminum*.

Так как в мировой научной литературе практически отсутствуют сведения об эффекте комбинированного действия эндوفитных штаммов

бактерий и их метаболитов на защитные системы растений, направленные против вредителей, в данной работе были составлены и изучены бактериальные композиции. Бактериальные композиции были составлены в соответствии с синтезом ими различных метаболитов (ЛП + ЛП, ЛП + Cry-белок), проявленной степенью эндофитности и антагонизмом по отношению друг к другу. Результаты работы показали, что при составлении бактериальных композиций важна как концентрация каждого штамма бактерий при обработке, так и соотношение между штаммами в смеси. Также важным фактором усиленного действия композиции по сравнению с отдельными штаммами стала способность индуцировать СИУ по разным гормональным сигнальным путям.

В ходе работы были сформулированы принципы создания комплексных биопрепаратов на основе смеси бактериальных штаммов:

1. Установить инсектицидную, фунгицидную или противовирусную активность метаболитов, вырабатываемых изучаемыми штаммами бактерий.
2. Проверить антагонизм штаммов по отношению друг к другу и проверить их эндофитность индивидуально и в композиции на предполагаемых объектах применения (виды и сорта растений).
3. Подобрать рост-стимулирующие и иммуностимулирующие концентрации, как индивидуальных штаммов, так и их композиций.
4. Выбрать штаммы, которые индуцируют различные гормональные сигнальные пути у данного растения, пораженного определенным патогеном или вредителем, так как каждый сигнальный путь может отвечать за часть защитных реакций, а все вместе они способны индуцировать более широкий спектр защитных реакций и синтез большего количества защитных белков.

Результаты показали, что правильно составленные бактериальные композиции улучшали свойства друг друга и проявляли аддитивные эффекты по всем показателям – афицидность, антибиоз, толерантность, а главное индукция СИУ, что приводило к повышенной устойчивости растений пшеницы

к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Изученные бактериальные штаммы и изоляты рода *Bacillus* могут быть рекомендованы для эффективной биологической борьбы со злаковой тлей *S. graminum* на посевах пшеницы.

ВЫВОДЫ

1. В геноме восьми штаммов и изолятов рода *Bacillus* обнаружены гены, кодирующие различные липопептид-синтазы. В липопептид-богатых фракциях штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ с помощью ВЭЖХ обнаружены липопептиды сурфактин и итурин, соответственно. В геноме штаммов *B. thuringiensis* В-5351 и *B. thuringiensis* В-6066 были обнаружены гены *cryIIa* и *cryIAb*, соответственно. Все исследованные штаммы бактерий синтезировали цитокинины и ауксины.

2. Выявлен прямой афицидный эффект изученных бактерий *Bacillus* spp. по отношению к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*, который проявлялся благодаря синтезу бактериями липопептидов и Cry-белков. Афицидность липопептидов и CryIIa белка была доказана с помощью липопептид-богатых фракций и двух рекомбинантных линий: *B. subtilis* 26ДСfr⁻ дефицитной по синтезу сурфактина и *B. subtilis* 26ДCryChS с интегрированным геном, кодирующим инсектицидный белок CryIIa от бактерии *B. thuringiensis*.

3. Показана положительная роль липопептид-богатых фракций из среды культивирования штаммов и изолятов *Bacillus* spp. в рост-стимулирующем эффекте бактерий и развитии опосредованной через растение антибиотической активности к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Обнаружено отсутствие рост-стимулирующего эффекта CryIIa белка, но показана опосредованная через растение антибиотическая активность CryIIa белка по отношению к злаковой тле.

4. Показано, что продукция сурфактина, итурина и фенгицина штаммами *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 играла важную роль во влиянии бактерий на компоненты про-/антиоксидантной системы – увеличение содержания перекиси водорода, повышение активности пероксидазы и снижение активности каталазы, что приводило к индукции защитных реакций растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum*.

5. Показано, что продукция сурфактина, итурина и фенгицина штаммами *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 и синтез Cry1Ia белка рекомбинантной линией *B. subtilis* 26ДCryChS играли важную роль во влиянии бактерий на индукцию экспрессии *PR*-генов, кодирующих защитные белки пшеницы, отвечающих за формирование системной устойчивости при поражении злаковой тлей.

6. С использованием рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Д*sfp*-дефицитной по синтезу сурфактина, доказано, что сурфактин играет критическую роль в опосредованной через растение антибиотической активности штамма *B. subtilis* 26Д; впервые обнаружено, что сурфактин играет критическую роль в регуляции редокс-статуса и активации транскрипции генов *PR*-белков - маркеров салицилатного- и этиленового-сигнальных путей при формировании устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum* опосредованной бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д.

7. Сформулированы принципы создания комплексных биопрепаратов на основе смеси бактериальных штаммов: установить активность метаболитов; проверить антагонизм штаммов по отношению друг к другу и проверить их эндофитность индивидуально и в композиции; подобрать рост-стимулирующие и иммуностимулирующие концентрации, как индивидуальных штаммов, так и их композиций; выбрать штаммы, которые индуцируют различные гормональные сигнальные пути. Выявлены аддитивные эффекты бактериальных композиций по всем показателям – афицидность, антибиоз, толерантность, а главное индукция СИУ, что приводило к повышенной устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. В композиции штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ доказана роль липопептидов сурфактина и итурина в развитии аддитивного эффекта смеси.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АБК – абсцизовая кислота
- АК – аминокислоты
- АМС - антимикробные соединения
- АФК – активные формы кислорода
- БПБ - бактериальные пестицидные белки
- ГК – гибберелловая кислота
- ДИБОА - 2,4-дигидрокси-(2Н)-1,4-бензоксазин-3(4Н)-она
- ДИМБОА - 2,4-дигидрокси-7-метокси-(2Н)-1,4-бензоксазин-3(4Н)-она
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖК – жасмоновая кислота
- ИУК - индол-3-уксусная кислота
- ЛОС – летучие органические соединения
- ЛП – липопептиды
- ЛПС – липополисахариды
- МАРК - митоген–активирующие протеинкиназы
- МБОА - бензоксазолинонов 6-метоксибензоксазолин-2(3Н)-она
- МеЖК –метилжасмонат
- НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НРПС/ NRPS - Нерибосомные пептидсинтазы
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СИУ – системная индуцированная устойчивость
- СК – салициловая кислота
- СПУ - системно приобретенная устойчивость
- СРРБ - стимулирующие рост растений бактерии
- СРРМ – стимулирующие рост растений микроорганизмы
- ЦК – цитокинины
- ЭТ – этилен

Bs 26ДCryChS - *Bacillus subtilis* 26ДCryChS
Bs 26Дsfp⁻ - *Bacillus subtilis* 26Дsfp⁻
Bs11BM - *Bacillus subtilis* 11BM
Bs26Д – *Bacillus subtilis* 26Д
BSt17 – *Bacillus* sp. St17
BsTt12 - *Bacillus subtilis* Tt12
BTas1 – *Bacillus* sp. Tas1
BTas8.2 - *Bacillus* sp. Tas8.2
BtB-5351 – *Bacillus thuringiensis* B-5351
BtB-6066 - *Bacillus thuringiensis* B-6066
Bth - *Bacillus thuringiensis*
H₂O₂ – перекись водорода
LOX – lipoxygenase (липоксигеназа)
NCBI - Национальный центр биотехнологической информации
NGS - Next-generation sequencing (Секвенирование следующего поколения)
NRPs - нерибосомные пептиды
PAL - phenylalanine ammonia lyase (фенилаланин-аммиаклиаза)
PDF1.2 - plant defensin 1.2
PI - Protease inhibitor (ингибиторы протеаз)
PKS – поликетидсинтаза
PKs – поликетиды
PR - pathogenesis-related protein (связанный с патогенезом белок)
PRR – pattern recognition receptors (рецепторы опознавания паттерна или образ-распознающие рецепторы)
RPs - рибосомные пептиды
TRX5 – тиоредоксин

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.Ю. Афицидная и иммуностимулирующая активность бактериальных липопептидов продуцируемых штаммами *Bacillus subtilis* / В.Ю. Алексеев, С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов // Труды Кубанского Государственного аграрного университета. 2021. В. 6. №. 93. С. 169-173. doi: 10.21515/1999-1703-93-168-173.
2. Алексеев В.Ю. Поиск штаммов липопептид-продуцирующих эндофитных бактерий рода *Bacillus* с рост-стимулирующими и иммуностимулирующими свойствами, способных модулировать устойчивость растений пшеницы к злаковой тле *Schizaphis graminum* / В.Ю. Алексеев, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, С.Д. Румянцев, И.В. Максимов // Экобиотех. 2022. Т. 5. № 3. С. 118-129. doi: 10.31163/2618-964X-2022-5-3-118-129
3. Веселова, С.В. Бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. / С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, С.Д. Румянцев, Д.К. Благова, И.В. Максимов // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55(1). С. 56–63. doi: 10.1134/S0555109919010185.
4. Веселова С.В. Бактерии рода *Bacillus* как перспективный источник для создания биопрепаратов от патогенов и вредителей сельскохозяйственных культур / С.В. Веселова, А.В. Сорокань, Г.Ф. Бурханова, С.Д. Румянцев, В.Ю. Алексеев, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов // Труды Кубанского Государственного аграрного университета. 2022. Выпуск 4. №97. С. 40-45. DOI: 10.21515/1999-1703-97-40-45.
5. Журавлева, Н.В. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии / Н.В. Журавлева, П.А. Лукьянов // Вестн. ДВО РАН. №3. 2004. С. 76–86.

6. Конарев, А.В. Ингибиторы ферментов как генетические маркеры / А.В. Конарев // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 44-52. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2002-3-44-51>.
7. Каролюк, М.А. Определение активности каталазы // М.А. Каролюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16-19.
8. Максимов, И.В. (а) Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) / И.В. Максимов, Б.П. Сингх, Е.А. Черепанова, Г.Ф. Бурханова, Р.М. Хайруллин // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 19–34. doi: 10.31857/S0555109920010134.
9. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И.В. Максимов, С.В. Веселова, Т.В. Нужная, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин // Ж. Физ. раст. 2015. Т. 62. №. 6. С. 763–775. doi:10.7868/S0015330315060111.
10. Максимов, И.В. Эндوفитные бактерии как агенты для биопестицидов нового поколения / И.В. Максимов, Т.И. Максимова, Е.Р. Сарварова, Д.К. Благова // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 36-50. doi: 10.7868/S0555109918020034.
11. Минибаева, Ф.В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе / Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Физиология растений. 2003. Т. 50. №. 3. С. 459-64.
12. Празднова, Е.В. Нерибосомально синтезируемые метаболиты и генетические механизмы их синтеза в реализации фунгицидного эффекта бактерий р. *Bacillus* и *Paenibacillus* (обзор) / Е.В. Празднова, А.И. Андриянов, Н.Г. Васильченко // «Живые и биокосные системы». 2018. №. 25. doi: 10.18522/2308-9709-2018-25-6.
13. Радченко, Е.Е. Злаковые тли / Е.Е. Радченко // Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам / Под ред. Е.Е. Радченко. М.: Россельхозакадемия. 2008. С. 214 – 257.

14. Румянцев С.Д. Роль эндофитных бактерий рода *Bacillus* в регуляции экспрессии генов транскрипционных факторов, вовлеченных в защитный ответ пшеницы против тли *Schizaphis graminum* (rond.) / С.Д. Румянцев, В.Ю. Алексеев, С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // Труды Кубанского Государственного аграрного университета. 2022. В. 4. №. 97. С. 124-130. DOI: 10.21515/1999-1703-97-124-130.
15. Сорокань, А.В. Роль сурфактина эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* 26д в развитии симбиотических отношений с растениями картофеля / А.В. Сорокань, З.Ф. Искандарова, Д.К. Благова, Е.В. Сарварова, И.В. Максимов // Экобиотех. 2019. Т. 2. №. 3. С. 257-261. doi: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-257-261. doi: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-257-261.
16. Хайруллин, Р.М. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. Взаимодействие анионных пероксидаз пшеницы с хитином, хитозаном и телиоспорами *Tilletia caries* (DC.) Tul. / Р.М. Хайруллин, З.Р. Юсупова, И.В. Максимов // Физиология растений. 2000. Т. 47(1). С. 108-113.
17. Харвуд, К. Бациллы. Генетика и биотехнология / К. Харвуд. - М. // Изд. «Мир». 1992. 472 с.
18. Шишова, М.Ф. Рецепция и трансдукция сигналов у растений. / М.Ф., Шишова, О.В. Танкелюн, В.В. Емельянов, В.В. Полевой // Изд. С.-Петербург. универс., 2008. 262 стр.
19. Яруллина, Л.Г. Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы в регуляции взаимоотношений растений с патогенами (обзор) / Л.Г. Яруллина, А.Р. Ахатова, Р.И. Касимова // Физиология растений. 2016. Т. 63(2). С. 205-217. doi: 10.7868/S0015330316020159.
20. Adimpong, D.B. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis // D.B. Adimpong, K.I. Sorensen, L. Thorsen, B. Stuer-Lauridsen, W.S. Abdelgadir,

- D.S. Nielsen, P.M. Derkx, L. Jespersen. Applied and environmental microbiology. 2012. V. 78 №. 22. PP. 7903–7914. [doi: 10.1128/AEM.00730-12](https://doi.org/10.1128/AEM.00730-12).
21. Afsharmanesh, H. Aflatoxin degradation by *Bacillus subtilis* UTB1 is based on production of an oxidoreductase involved in bacilysin biosynthesis / H. Afsharmanesh, A. Pérez-García, H. Zerriouh, M. Ahmadzadeh // Food Control. 2018. V. 94. №. 1. PP. 48-55. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.03.002.
22. Alekseev V. Bacteria of the genus *Bacillus* and their lipopeptides enhance endurance of wheat plants to the greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond / V. Alekseev, S. Veselova, S. Rummyantsev, G. Burkhanova, E. Cherepanova, I. Maksimov // AIP Conference Proceedings 2388. 2021. №. 030001. PP. 1-5. doi: 10.1063/5.0071841.
23. Allen, D.A. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery / Allen D.A., Austin A.R., Colwell R.R. // J. Gen. Microbiol. 1983. № 129. PP. 2043-2062. doi:10.1099/00221287-129-7-2043.
24. Almagro, L. Class III peroxidases in plant defence reactions / L. Almagro, L.V. Gomez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barcello, M.A. Pedreno // J. Exp. Botany. 2009. V. 60. P. 377–390. doi: 10.1093/jxb/ern277.
25. Alstrom, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads // J. Gen. Appl. Microbiol. 1991. V. 37. P. 495–501. <https://doi.org/10.2323/jgam.37.495>.
26. Andric, S. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities / S. Andric, T. Meyer, M. Ongena // Front. Microbiol. V. 11. 2020. Art. 1350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>.
27. Araújo, E.O. Rhizobacteria in the control of pest insects in agriculture / E.O. Araújo // Afr. J. Plant Sci. 2015. V. 9. № 9. P. 368-373. doi:10.5897/AJPS2015.1318.

28. Argandona, V.H. Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley / V.H. Argandona, M. Chaman, L. Cardemil, O. Munoz, G.E. Zuniga, L.J. Corcuera // *J. Chem. Ecol.* V. 27. 2001. PP. 53–68. doi: 10.1023/a:1005615932694.
29. Arkhipova, T.N. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants / T.N. Arkhipova, S.U. Veselov, A.I. Melentiev, E.V. Martynenko, G.R. Kudoyarova // *Plant Soil.* 2005. №. 272. PP. 201–209. doi:10.1007/s11104-004-5047-x.
30. Banerjee, R. Peptide mediated, enhanced toxicity of a bacterial pesticidal protein against southern green stink bug / R. Banerjee, B. Flores-Escobar, N.P. Chougule, P.E. Cantón, R. Dumitru, B.C. Bonning // *Microbial biotechnology.* 2022. V. 15 №. 7. PP. 2071–2082. doi: [10.1111/1751-7915.14030](https://doi.org/10.1111/1751-7915.14030).
31. Bano, A. Plant defence induced by PGPR against *Spodoptera litura* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) / A. Bano, R. Muqarab // *Plant biology* (Stuttgart, Germany). 2017. V. 19 №. 3. PP. 406–412. doi: [10.1111/plb.12535](https://doi.org/10.1111/plb.12535).
32. Baum, J.A. Cotton plants expressing a Hemiptera-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygys hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs / J.A. Baum, U.R. Sukuru, S.R. Penn, S.E. Meyer, S. Subbarao, X. Shi, S. Flasiniski, G.R. Heck, R.S. Brown, T.L. Clark // *J. Econ. Entomol.* 2012. V. 105. PP. 616-624. doi: 10.1603/ec11207.
33. Bel, Y. Insights into the Structure of the Vip3Aa Insecticidal Protein by Protease Digestion Analysis / Y. Bel, N. Banyuls, M. Chakroun, B. Escriche, J. Ferré // *Toxins.* 2017. V. 4. №. 131. doi: 10.3390/toxins9040131.
34. Belimov, A.A. Rhizosphere bacteria containing ACC deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone

- signaling/ A.A. Belimov, I.C. Dodd, N. Hontzeas, J.C. Theobald, V.I. Safronova, W.J. Davies // *New Phytol.* 2009. V. 181. PP. 413–423. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02657.x.
35. Berry, C. Structural classification of insecticidal proteins – Towards an in-silico characterisation of novel toxins / C. Berry & N. Crickmore // *Journal of Invertebrate Pathology.* 2017. V. 142. PP. 16-22. doi: [10.1016/j.jip.2016.07.015](https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.015).
36. Bindschedler, L.V. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca²⁺ / L.V. Bindschedler, F. Minibayeva, S.L. Gardner, C. Gerrish, D.R. Davies, G.P. Bolwell // *New Phytologist.* 2001. V. 151. P. 185-194. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x.
37. Bing, L. Potential resistance of tricin in rice against brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal) / L. Bing, D. Hongxia, Z. Maoxin, X. Di, W. Jingshu // *Acta Ecol. Sin.* 2007. V. 27. PP. 1300–1306. doi: 10.1016/S1872-2032(07)60031-6.
38. Birkett, M.A. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense / M.A. Birkett, C.A. Campbell, K. Chamberlain, E. Guerrieri, A.J. Hick, J.L. Martin, M. Matthes, J.A. Napier, J. Pettersson, J.A. Pickett, G.M. Poppy, E.M. Pow, B.J. Pye, L.E. Smart, G.H. Wadhams, L. Wadhams, C.M. Woodcock // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2020. V. 97(16). PP. 9329–9334. doi: [10.1073/pnas.160241697](https://doi.org/10.1073/pnas.160241697).
39. Bostock, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers / R.M. Bostock // *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 1999. 55(2). PP. 99-109. doi: 10.1006/pmpp.1999.0218.
40. Boter, M. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis / M. Boter, O. Ruíz-Rivero, A. Abdeen, S. Prat // *Genes development.* 2004. V. 18(13). PP. 1577–1591. doi: [10.1101/gad.297704](https://doi.org/10.1101/gad.297704).

41. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Annal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
42. Bravo, A. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains / A. Bravo, I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S.S. Gill, M. Soberón // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. №. 1667. PP. 38–46. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.08.013.
43. Cao, B. Cry78Ba1, one novel crystal protein from *Bacillus thuringiensis* with high insecticidal activity against rice planthopper / B. Cao, C. Shu, L. Geng, F. Song, J. Zhang // *Journal of agricultural and food chemistry.* 2020. V.68(8). PP. 2539–2546. doi: [10.1021/acs.jafc.9b07429](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07429).
44. Cao, H.H. Antibiosis and tolerance but not antixenosis to the grain aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae), are essential mechanisms of resistance in a wheat cultivar / H.H. Cao, M.Z. Pan, H.R. Liu, S.H. Wang, T.X. Liu // *Bull // Entomol. Res.* 2015. V. 105. PP. 448–455. doi: 10.1017/S0007485315000322.
45. Cao, Y. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber / Y. Cao, Z.H. Xu, N. Ling, Y.J. Yuan, X.M. Yang, L.H. Chen, B. Shen, Q.R. Shen // *Scientia Horticulturae.* 2013. V. 135. PP. 32-39. doi: 10.1016/j.scienta.2011.12.002.
46. Caulier, S. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group / S. Caulier, C. Nannan, A. Gillis, F. Licciardi, C. Bragard, J. Mahillon // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 302. doi: 10.3389/fmicb.2019.00302.
47. Cawoy, H. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* / H. Cawoy, D.

- Debois, L. Franzil, E. De Pauw, P. Thonart, M. Ongena // *Microb. Biotechnol.* 2015. V. 2. PP. 281–295. doi: 10.1111/1751-7915.12238.
48. Chaman, M.E. Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation / M.E. Chaman, S.V. Copaja, V.H. Argandona // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. PP. 2227–2231. doi: 10.1021/jf020953b.
49. Chandler, S. Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.) / S. Chandler, N. Van Hese, F. Coutte, P. Jacques, M. Höfte, D. De Vleeschauwer // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2015. V. 1. PP. 20–30. doi: 10.1016/j.pmpp.2015.05.010.
50. Chandrasekaran, R. *Bacillus subtilis* chitinase identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight/time of flight mass spectrometry has insecticidal activity against *Spodoptera litura* Fab / R. Chandrasekaran, K. Revathi, A. Thanigaivel, S.A. Kirubakaran, S. Senthil-Nathan // *Pesticide biochemistry and physiology.* 2014. V. 116. PP. 1–12. doi: [10.1016/j.pestbp.2014.09.013](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.013).
51. Chattopadhyay, P. Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field / P. Chattopadhyay, G. Banerjee // *3 Biotech.* 2018. V. 8(4). P. 201. doi: [10.1007/s13205-018-1223-1](https://doi.org/10.1007/s13205-018-1223-1).
52. Chaudhary, P. Overview of biofertilizers in crop production and stress management for sustainable agriculture / P. Chaudhary, S. Singh, A. Chaudhary, A. Sharma, G. Kumar // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. 930340. doi: 10.3389/fpls.2022.930340.
53. Chen, M.A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids / M. Chen, J.Z. Zhao, H.L. Collins, E.D. Earle, J. Cao, A.M. Shelton // *PLoS ONE.* 2008, 3, e2284. doi: 10.1371/journal.pone.0002284.
54. Chisholm, P.J. Reciprocal plant-mediated interactions between a virus and a non-vector herbivore / P.J. Chisholm, N. Sertsuvalkul, C.L. Casteel, D.W. Crowder // *Ecology* 99. 2018. PP. 2139–2144. doi: 10.1002/ecy.2449.

55. Chougule, N.P. Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests / N.P., Chougule, H. Li, S. Liu, L.B. Linz, K.E. Narva, T. Meade, B.C. Bonning // Proc Natl Acad Sci USA. 2013. V. 110. PP. 8465–8470. doi: 10.1073/pnas.1222144110.
56. Chowdappa, P. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3 / P. Chowdappa, S.M. Kumar, M.J. Lakshmi, S.P. Mohan, K.K. Upreti // Biol. Control. 2013. V. 65. PP. 109–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.009>.
57. Chun, J.-I. Tomato ARPC1 regulates trichome morphology and density and terpene biosynthesis / J.-I. Chun, S.-M. Kim, N.-R. Jeong, S.H. Kim, C. Jung, J.-H. Kang // Planta. 2022. V. 12. №. 256(2). P. 38. doi: 10.1007/s00425-022-03955-7. doi: 10.1007/s00425-022-03955-7.
58. Conrath, U. Priming for enhanced defense. Annual review of phytopathology / U. Conrath, G.J. Beckers, C.J. Langenbach, M.R. Jaskiewicz // 2015. V. 53. PP. 97–119. [doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120132](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132).
59. Conrath, U. Priming: Getting ready for battle / U. Conrath, G.J. Beckers, V. Flors, P. García-Agustín, G. Jakab, F. Mauch, M.A. Newman, C.M. Pieterse, B. Poinssot, M.J. Pozo // Mol. Plant Microbe Interact. 2006. 19. PP. 1062–1071. doi: 10.1094/MPMI-19-1062.
60. Crespo-Herrera, L. Genetics of Greenbug Resistance in Synthetic Hexaploid Wheat Derived Germplasm. Frontiers in plant science / L. Crespo-Herrera, R.P. Singh, M. Reynolds, J. Huerta-Espino // 2019. V. 10. №. 782. [doi:10.3389/fpls.2019.00782](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00782).
61. Crespo-Herrera, L. Resistance to aphids in wheat / L.A. Crespo Herrera // Plant Breeding and Biotechnology. 2012. ISSN 1654-3580.
62. Crickmore, N. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins / N. Crickmore, C. Berry, S. Panneerselvam, R. Mishra, T.R. Connor, B.C. Bonning // Journal of

- Invertebrate Pathology. 2020. V. 186. 107438. [doi: 10.1016/j.jip.2020.107438](https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438).
63. Crickmore, N. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins / N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, D.H. Dean // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998. V. 62. PP. 807-813. doi: 10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998.
64. Deleu, M. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review / M. Deleu, J.M. Crowet, M.N. Nasir, L. Lins // Biochimica et biophysica acta. 2014. V. 1838(12). PP. 3171–3190. [doi: 10.1016/j.bbamem.2014.08.023](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.023).
65. Denoirjean, T. Effects of *Bacillus* lipopeptides on the survival and behavior of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* / T. Denoirjean, G. Doury, P. Poli, F. Coutte, A. Ameline // Ecotoxicol Environ Saf. 2021. V. 15. 226. 112840. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112840.
66. Denoirjean, T. Effects of surfactins, *Bacillus* lipopeptides, on the behavior of an aphid and host selection by its parasitoid / T. Denoirjean, A. Ameline, A. Couty, F. Dubois, F. Coutte, G. Doury // Pest Manag. Sci. 2022. V. 78. PP. 929–937. doi: 10.1002/ps.6702.
67. Dong, H.P. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense / H.P. Dong, J. Peng, Z. Bao, X. Meng, J.M. Bonasera, G. Chen, S.V. Beer, H. Dong // Plant Physiol. 2004. V. 136. PP. 3628–3638. doi: 10.1104/pp.104.048900.
68. Du, B. Phloem-exudate proteome analysis of response to insect brown planthopper in rice / B. Du, Z. Wei, Z. Wang, X. Wang, X. Peng, B.J. Du // Plant Physiol. V. 183. 2015. PP. 13–22. doi: 10.1016/j.jplph.2015.03.020.
69. Egorshina, A.A. Phosphate-mobilizing activity of the endophytic *Bacillus subtilis* strains and their effect on wheat roots micorrhization ratio / A.A. Egorshina, R.M. Khairullin, M.A. Lukyantsev, Z.M. Kuramshina, Y.V.

- Smirnova // J. Sib. Fed. Univ. Biol. 2011. V. 4. PP. 172–182. doi: 10.17516/1997-1389-0179.
70. Eid, A.M. Harnessing bacterial endophytes for promotion of plant growth and biotechnological applications: An overview / A.M. Eid, A. Fouda, M.A. Abdel-Rahman, S.S. Salem, A. Elsaied, R. Oelmüller, M. Hijri, A. Bhowmik, A. Elkelish, S.E.-D. Hassan // *Plants*. 2021. V. 10 №. 935. doi: 10.3390/plants10050935.
71. Farace, G. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine / G. Farace, O. Fernandez, L. Jacquens, F. Coutte, F. Krier, P. Jacques, C. Clement, E.A. Barka, C. Jacquard, S. Dorey // *Mol. Plant Pathol.* 2015. V. 16. PP. 177–187. doi: 10.1111/mpp.12170.
72. Farzand, A. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by the induction of systemic resistance and regulation of antioxidant pathways in tomato using fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 / Farzand A., A. Moosa, M. Zubair, A.R. Khan, V.C. Massawe, H.A.S. Tahir, T.M.M. Sheikh, M. Ayaz, X. Gao // *Biomolecules*. 2019. V. 16.9 №.10. P. 613. doi: 10.3390/biom9100613.
73. Fenibo, E.O. Microbial Surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation / E.O. Fenibo, G.N. Ijoma, R. Selvarajan, C.B. Chikere // *Microorganisms*. 2019. V. 7(11). P. 581. doi: 10.3390/microorganisms7110581.
74. Fernandez-Luna, M.T. Toxicity of *Bacillus thuringiensis*-Derived Pesticidal Proteins Cry1Ab and Cry1Ba against Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera) / M.T. Fernandez-Luna, P. Kumar, D.G. Hall, A.D. Mitchell, M.B. Blackburn, B.C. Bonning // *Toxins*. 2019. V. 11(3). P. 173. [doi: 10.3390/toxins11030173](https://doi.org/10.3390/toxins11030173).
75. Field, D. Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both gram positive and gram-negative pathogens / D. Field, M. Begley, P.M.

- O'Connor, K.M. Daly, F. Hugenholtz, P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross // PLoS One. 2012. V. 7(10): P. 7. e46884 [doi: 10.1371/journal.pone.0046884](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046884).
76. Fischhoff, D.A. Insect tolerant transgenic tomato plants / D.A. Fischhoff, K.S. Bowdish, F.J. Perlak, P.G. Marrone, S.M. McCormick, J.G. Niedermeyer, D.A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E.J. Mayer, D.E. Rochester // Nat. Biotechnol. 1987. V. 5. PP. 807–813. doi: 10.1016/0378-1119(86)90031-4.
77. Fu, M. Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against English grain aphid / M. Fu, M. Xu, T. Zhou, D. Wang, S. Tian, L. Han, H. Dong, C. Zhang // Journal of experimental botany. 2014. V. 65(6). PP. 1439–1453. [doi: 10.1093/jxb/ert488](https://doi.org/10.1093/jxb/ert488).
78. Fu, Z.Q. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants / Z.Q. Fu, S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, R. Mohan, S.H. Spoel, Y. Tada, N. Zheng // Nature. 2012. V. 486. PP. 228–232. doi: 10.1038/nature11162.
79. Gamalero, E. Bacterial modulation of plant ethylene levels / E. Gamalero, B.R. Glick // Plant Physiol. 2015. V. 169. PP. 13–22. doi: 10.1104/pp.15.00284.
80. Gao, L.L. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula* / L.L. Gao, J.P. Anderson, J.P. Klingler, R.M. Nair, O.R. Edwards, K.B. Singh // MPMI. 2007. V. 20. PP. 82–93. doi: 10.1094/MPMI-20-0082.
81. Garzo, E. Feeding behavior and virus-transmission ability of insect vectors exposed to systemic insecticides / E. Garzo, A. Moreno, M. Plaza, A. Fereres // Plants. 2020. V. 9. №. 7. P. 895. doi: 10.3390/plants9070895.
82. Gimenez, M.J. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae / M.J. Gimenez, F. Piston, S.G. Atienza // Planta. 2011. V. 233(1). P. 163–173. doi: 10.1007/s00425-010-1290-y.

83. Glas, J.J. Plant glandular trichomes as targets for breeding of resistance to herbivores / J.J. Glas, B.C. Schimmel, J.M. Alba, R. Esobar-Bravo, R.X.C. Chuurink, M.R. Kant // *Int J Mol Sci*. 2012. V. 13. PP. 17077–17103. doi: 10.3390/ijms131217077.
84. Gómez, I. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis* / I. Gómez, L. Pardo-López, C. Muñoz-Garay, L.E. Fernandez, C. Pérez, J. Sánchez, M. Soberón, A. Bravo // *Peptides*. 2007. V. 28(1). PP. 169–173. doi: [10.1016/j.peptides.2006.06.013](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.013).
85. Gong, P. Field evolved resistance to pyrethroids, neonicotinoids, organophosphates and macrolides in *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) and *Sitobion avenae* (Fabricius) from China / P. Gong, X. Li, H. Gao, C. Wang, M. Li, Y. Zhang, X. Zhu // *Chemosphere*. 2021. V. 269. №. 128747. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.
86. Goossens, J. Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses / J. Goossens, P. Fernández-Calvo, F. Schweizer, A. Goossens // *Plant Molecular Biology*. 2016. V. 91. PP. 673–689. doi: 10.1007/s11103-016-0480-9.
87. Gowda, A.A transgenic approach for controlling *Lygus* in cotton / A. Gowda, T.J. Rydel, A.M. Wollacott, R.S. Brown, W. Akbar, T.L. Clark, S. Flasiński, J.R. Nageotte, A.C. Read, X. Shi, B.J. Werner, M.J. Pleau, J.A. Baum // *Nature communications*. 2016. V. 7. №. 12213. doi:10.1038/ncomms12213.
88. Gulsen, O. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turfgrasses challenged by *Blissus occiduus* / O. Gulsen, T. Eickhoff, T. Heng-Moss, R. Shearman, F. Baxendale, G. Sarath // *Arthropod Plant Interact*. 2010. V. 4. PP. 45–55. doi: 10.1007/s11829-010-9086-3.
89. Guo, D.-L. Cyclic lipopeptides with herbicidal and insecticidal activities produced by *Bacillus clausii* DTM1 / D.-L. Guo, B. Wan, S.-J. Xiao, S.

- Allen, Y.-C. Gu, L.-S. Ding, Y. Zhou // Nat. Prod. Commun. 2015. V. 10. PP. 2151–2153. doi: 10.1177/1934578X1501001235.
90. Gutierrez-Manero, F.J. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins / F.J. Gutierrez-Manero, B. Ramos-Solano, A. Probanza, J.R. Mehouchi, F. Tadeo, M. Talon // Physiol. Plant. 2001. V. 111. PP. 206–211. doi:10.1034/J.1399-3054.2001.1110211.X.
91. Hagelin, G. Use of synthetic analogues in confirmation of structure of the peptide antibiotics maltacines / G. Hagelin, B. Indrevoll, T. Hoeg-Jensen // Int J Mass Spectrom. 2007. №. 268 PP. 254–264. doi:10.1016/J.IJMS.2007.05.011.
92. Han, Z. The function of plant PR1 and other members of the CAP protein superfamily in plant-pathogen interactions. Molecular plant pathology / Z. Han, D. Xiong, R. Schneider, C. Tian // 2023. V. 24(6). PP. 651–668. doi: [10.1111/mpp.13320](https://doi.org/10.1111/mpp.13320).
93. Harfouche, A.L. Ethylene signaling mediates a maize defense response to insect herbivory / A.L. Harfouche, R. Shivaji, R. Stocker, P.W. Williams, D.S. Luthe // Molecular plant-microbe interactions: MPMI. 2006. V. 19(2). PP. 189–199. doi: [10.1094/MPMI-19-0189](https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0189).
94. Herman, M.A.B. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York / M.A.B. Herman, B.A. Nault, C.D. Smart // 2008. V. 27(6). PP. 996-1002. doi: 10.1016/j.cropro.2007.12.004.
95. Höfte, H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* / H. Höfte, H.R. Whiteley // Microbiol. Rev. 1989. V. 5. PP. 242–255. doi: 10.1128/mr.53.2.242-255.1989.
96. Huang, J. Phytochrome B mediates dim-light-reduced insect resistance by promoting the ethylene pathway in rice / J. Huang, Z.-Y. Qiu, J. He, H.-S. Xu, K. Wang, H.-Y. Du, D. Gao, W.-N. Zhao, Q.-G. Sun, Y.-S. Wang, P.-Z. Wen, Q. Li, X.-O. Dong, X.-Z. Xie, L. Jiang, H.-Y. Wang, Y.-Q. Liu, J.-M.

- Wan // Plant Physiology. 2022. V. 191. 2. PP. 1272-1287. [doi: 10.1093/plphys/kiac518](https://doi.org/10.1093/plphys/kiac518).
97. Ilinskaya O. The native monomer of *Bacillus pumilus* ribonuclease does not exist extracellularly / O. Ilinskaya, V. Ulyanova, I. Lisevich, E. Dudkina, N. Zakharchenko, A. Kusova, D. Faizullin, Y. Zuev // BioMed Res. International. 2018. 4837623. doi: 10.1155/2018/4837623.
98. Ilinskaya, O.N. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases / O.N. Ilinskaya, N.S. Karamova, O.B. Ivanchenko, L.V. Kipenskaya // Mutat Res. 1996. V. 22. №. 354(2):203-9. doi: 10.1016/0027-5107(96)00012-7.
99. Inès, M. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications / M. Inès, G. Dhouha // Carbohydrate research. 2015. V. 416. PP. 59–69. [doi: 10.1016/j.carres.2015.07.016](https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.07.016).
100. Jiang, M. Iturin A induces resistance and improves the quality and safety of harvested cherry tomato / M. Jiang, X. Pang, H. Liu, F. Lin, F. Lu, X. Bie, Z. Lu, Y. Lu // Molecules. 2021. V. 26. №. 6905. doi: 10.3390/molecules26226905.
101. Kahia, M. Insecticidal effect of *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185 used alone and in combination against the foxglove aphid and the melon aphid (Hemiptera: Aphididae) / M. Kahia, T. Nguyen, F. McCune, R. Naasz, H. Antoun, V. Fournier // The Canadian Entomologist. 2021. 153(6). PP. 726-740. doi: 10.4039/tce.2021.41.
102. Kashyap, N. Biocontrol Screening of Endophytes: Applications and Limitations / N. Kashyap, S.K. Singh, N. Yadav, V.K. Singh, M. Kumari, D. Kumar, L. Shukla, Kaushalendra, N. Bhardwaj, A. Kumar // Plants. 2023. V. 12. №. 2480. [doi: 10.3390/plants12132480](https://doi.org/10.3390/plants12132480).
103. Kaur, G. Harnessing the action mechanisms of microbial endophytes for enhancing plant performance and stress tolerance: current understanding and future perspectives / G. Kaur, A. Patel, V. Dwibedi, S.K. Rath //

- Archives of Microbiology. 2023. V. 205. P. 303. [doi: 10.1007/s00203-023-03643-4](https://doi.org/10.1007/s00203-023-03643-4).
104. Kerchev, P.I. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways / P.I. Kerchev, B. Fenton, C. H. Foyer, R. D. Hancock // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. PP. 441–453. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x.
105. Khalid, A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat / A. Khalid, M. Arshad, Z. A. Zahir // Journal of applied microbiology. 2004. V. 96(3). PP. 473–480. [doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x).
106. Khedher, S.B. *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut / S.B. Khedher, H. Boukedi, O. Kilani-Feki, I. Chaib, A. Laarif, L. Abdelkefi-Mesrati, S. Tounsi // J. Invertebr. Pathol. 2015. V. 132. PP. 42–47. doi: 10.1016/j.jip.2015.08.010.
107. Khoshru, B. Decrypting the multi-functional biological activators and inducers of defense responses against biotic stresses in plants / B. Khoshru, D. Mitra, K. Joshi, P. Adhikari, S.I. Md Rion, F. Fadiji, A.E. Mehrdad Alizadeh, A. Priyadarshini, A. Senapati, M.R. Sarikhani, P. Panneerselvam, M.K.D. Mohapatra, S. Sushkova, T. Minkina, C. Keswani // Heliyon. 2023. V. 9. 3. [doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13825](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13825).
108. Kim, P. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26 / P. Kim, H. Bai, D. Bai, H. Chae, S. Chung, Y. Kim, R. Park, Y.T. Chi // J. Appl. Microbiol. 2004. №. 97. PP. 942–949. [doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x).
109. Kloth, K.J. AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling / K.J. Kloth, G.L. Wieggers, J. Busscher-Lange, J.C. van Haarst, W. Kruijer, H.J. Bouwmeester, M. Dicke, M.A. Jongsma // Journal of experimental botany. 2016. V. 67(11). PP. 3383–3396. [doi: 10.1093/jxb/erw159](https://doi.org/10.1093/jxb/erw159).

110. Koch, K.G. Plant tolerance: a unique approach to control hemipteran pests / K.G. Koch, K. Chapman, J. Louis, T. Heng-Moss, G. Sarath. // *Front. Plant Sci.* V. 7. 2016. P. 1363. doi: 10.3389/fpls.2016.01363.
111. Kogan, M. Antixenosis—A New Term Proposed to Define Painter's “Nonpreference” Modality of Resistance / Kogan M., Ortman E. // *Bulletin of the Entomological Society of America.* 1978. V. 24. PP. 175-176. doi:10.1093/besa/24.2.175.
112. Kortbeek, R.W.J. Natural variation in wild tomato trichomes; selecting metabolites that contribute to insect resistance using a random forest approach / R.W.J. Kortbeek, M.D. Galland, A. Muras, F.M. van der Kloet, B. André, M. Heilijgers, S.A.F.T. van Hijum, M.A. Haring, R.C. Schuurink, P.M. Bleeker // *BMC Plant Biol.* 2021. V. 2. №. 21(1). P. 315. doi: [10.1186/s12870-021-03070-x](https://doi.org/10.1186/s12870-021-03070-x).
113. Kudoyarova, G. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses / G. Kudoyarova, T. Arkhipova, T. Orshunova, M. Bakaeva, O. Loginov, I.C. Dodd // *Frontiers in plant science.* 2019. V. 10. doi: 10.3389/fpls.2019.01368.
114. Kudoyarova, G.R. Water relations and growth of original barley plants and its ABA-deficient mutants at increased air temperature / G.R. Kudoyarova, D.S. Veselov, G.V. Sharipova, R.G. Akhiyarova, I.C. Dodd, S.Y. Veselov // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. PP. 188–193. doi:10.1134/S1021443714020071.
115. Kusnierczyk, A. Towards global understanding of plant defence against aphids - timing and dynamics of early Arabidopsis defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack / A. Kusnierczyk, P. Winge, T.S. Jorstad, J. Troczynska, J.T. Rossiter, A.M. Bones // *Plant Cell Environ.* 2008. V. 31. PP. 1097–1115. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01823.x.

116. Lacomel, C.J. Branching out the aerolysin, ETX/MTX-2 and Toxin_10 family of pore forming proteins / C.J. Lacomel, M.A. Dunstone, B.A. Spicer // *J Invertebr Pathol.* 2021. 186. doi: 10.1016/j.jip.2021.10757.
117. Leconte, A. Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*) / A. Leconte, L. Tournant, J. Muchembled, J. Paucellier, A. Héquet, B. Deracinois, C. Deweer, F. Krier, M. Deleu, S. Oste // *Microorganisms.* 2022. V. 10 №. 9. P. 1810. doi: 10.3390/microorganisms10091810.
118. Lee, J.H. Root-associated bacteria are biocontrol agents for multiple plant pests / J.H. Lee, A.J. Anderson, Y.C. Kim // *Microorganisms.* 2022. V. 10. №. 1053. doi: [10.3390/microorganisms10051053](https://doi.org/10.3390/microorganisms10051053).
119. Lee, J.H. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells / J.H. Lee, S.H. Nam, W.T. Seo, H.D. Yun, S.Y. Hong, M.K. Kim, K.M. Cho // *Food Chem.* 2012. V. 131(4). PP.1347–1354. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.133.
120. Lei, J. Enhanced aphid detoxification when confronted by a host with elevated ROS production / J. Lei, K. Zhu-Salzman // *Plant Signal Behav.* 2015. V. 10(4). e1010936. doi: 10.1080/15592324.2015.1010936.
121. Li, M. The occurrence of triclin and its derivatives in plants / M. Li, Y. Pu, C.G. Yoo, A.J. Ragauskas // *Green Chem.* 2016. V. 18. PP. 1439–1454. doi: 10.1021/np2007796.
122. Li, N. Signaling Crosstalk between Salicylic Acid and Ethylene/Jasmonate in Plant Defense: Do We Understand What They Are Whispering? / N. Li, X. Han, D. Feng, D. Yuan, L.J. Huang // *International journal of molecular sciences.* 2019. V. 20(3). P. 671. doi: [10.3390/ijms20030671](https://doi.org/10.3390/ijms20030671).

123. Li, X. Temporal analysis of microRNAs associated with wing development in the English grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Homoptera: Aphidiae) / X. Li, F. Zhang, B. Coates, C. Wei, X. Zhu, Y. Zhang, X. Zhou // *Insect biochemistry and molecular biology*. 2022. V. 142. №. 103579. [doi: 10.1016/j.ibmb.2021.103579](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103579).
124. Ling, S. Enhanced anti-herbivore defense of tomato plants against *Spodoptera litura* by their rhizosphere bacteria / S. Ling, Y. Zhao, S. Sun // *BMC Plant Biol*. 2022. V. 22. P. 254. [doi: 10.1186/s12870-022-03644-3](https://doi.org/10.1186/s12870-022-03644-3).
125. Liu, L. The Defined Toxin-binding Region of the Cadherin G-protein Coupled Receptor, BT-R1, for the Active Cry1Ab Toxin of *Bacillus thuringiensis*. / L. Liu, S.D. Boyd, L.A. Bulla-Jr, D.D. Winkler // *J. Proteomics Bioinform*. 2018. 11:201–210. doi: 10.4172/0974-276X.1000487.
126. Liu, X. Reactive oxygen species are involved in plant defense against a gall midge / X. Liu, C.E. Williams, J.A. Nemacheck, H. Wang, S. Subramanyam, C. Zheng // *Plant Physiol*. 2010. V. 152:2010. PP. 985–999. doi: 10.1104/pp.109.150656.
127. Liu, Y. Cry64Ba and Cry64Ca, Two ETX/MTX2-Type *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins Active against Hemipteran Pests / Y. Liu, Y. Wang, C. Shu, K. Lin, F. Song, A. Bravo, M. Soberón, J. Zhanga // *Appl Environ Microbiol*. 2018. V. 84. e01996-17. [doi: 10.1128/AEM.01996-17](https://doi.org/10.1128/AEM.01996-17).
128. Loth, R. Highly adjustable biomaterial networks from three-armed biodegradable macromers / R. Loth, T. Loth, K. Schwabe, R. Bernhardt, M. Schulz-Siegmund, M. C. Hacker // *Acta biomaterialia*. 2015. V. 26. 82–96. [doi: 10.1016/j.actbio.2015.08.008](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.008).
129. Lu, J. Contrasting effects of ethylene biosynthesis on induced plant resistance against a chewing and a piercing-sucking herbivore in rice / J. Lu, J. Li, H. Ju, X. Liu, M. Erb, X. Wang, Y. Lou // *Mol. Plant*. 2014. V. 7. PP. 1670–1682. doi: 10.1093/mp/ssu085.

130. Lu, K. Importin β 1 Mediates Nuclear Entry of EIN2C to Confer the Phloem-Based Defense against Aphids / K. Lu, L. Zhang, L. Qin, X. Chen, X. Wang, M. Zhang, H. Dong // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. №. 8545. doi: [10.3390/ijms24108545](https://doi.org/10.3390/ijms24108545).
131. Luo, K. Candidate genes expressed in tolerant common wheat with resistant to english grain aphid / K. Luo, G. Zhang, C. Wang, T. Ouellet, J. Wu, Q. Zhu // J. Econ. Entomol. 2014. V. 107. PP. 1977–1984. doi: 10.1603/ec14112.
132. Luo, K. Prevalent pest management strategies for grain aphids: opportunities and challenges / K. Luo, H. Zhao, X. Wang, Z. Kang // Front. Plant Sci. 2022. V. 12. №. 790919. doi: [10.3389/fpls.2021.790919](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.790919).
133. Luo, K. Previous aphid infestation induces different expression profiles of genes associated with hormone-dependent responses in near-isogenic winter wheat lines / K. Luo, X. J. Yao, C. Luo, X. S. Hu, Z. Q. Hu, G. S. Zhang, H. Y. Zhao // Journal of economic entomology. 2020. V. 113(1). PP. 461–470. doi: [10.1093/jee/toz222](https://doi.org/10.1093/jee/toz222).
134. Maksimov, I. V. (a) Mechanisms of plant tolerance to RNA viruses induced by plant-growth-promoting microorganisms / I. V. Maksimov, A. V. Sorokan, G. F. Burkhanova, S. V. Veselova, V. Yu. Alekseev, M. Yu. Shein, A. M. Avalbaev, P. D. Dhaware, G. T. Mehetre, B. P. Singh, R. M. Khairullin // Plants. 2020. V. 8. №. 575. doi: [10.3390/plants8120575](https://doi.org/10.3390/plants8120575).
135. Maksimov, I.V. (b) Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene Btcry1Ia encoding Cry1Ia toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. / I.V. Maksimov, D.K. Blagova, S.V. Veselova, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, E.A. Cherepanova, E.R. Sarvarova, S.D. Rummyantsev, V.Yu. Alekseev, R.M. Khayrullin // Biol. Control. 2020. V. 144:104242. doi: [10.1016/j.biocontrol.2020.104242](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242).

136. Martins E.S. Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis Boheman*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) / E.S. Martins, R.W. Aguiar, N.F. Martins, V.M. Melatti, R. Falcão, A.C. Gomes, B.M. Ribeiro, R.G. Monnerat // J Appl Microbiol. 2008. V.104. №.5. PP. 1363-71. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03665.x.
137. Mendoza-Almanza, G. The Cytocidal Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells / G. Mendoza-Almanza, E.L. Esparza-Ibarra, J.L. Ayala-Luján, M. Mercado-Reyes, S. Godina-González, M. Hernández-Barrales, J. Olmos-Soto // Toxins. 2020. V. 12(5). P. 301. doi: [10.3390/toxins12050301](https://doi.org/10.3390/toxins12050301).
138. Miljakovic, D. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops / D. Miljakovic, J. Marinkovic, S. Balešević-Tubic // Microorganisms. V. 8. 2020. P. 1037. doi: [10.3390/microorganisms8071037](https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037).
139. Mishra, R. Bacteria-derived pesticidal proteins active against hemipteran pests / R. Mishra, A.K. Arora, J. Jimenez, C. dos Santos Tavares, R. Banerjee, S. Panneerselvam, B.C. Bonning // Journal of Invertebrate Pathology. 2022. 195:107834. doi: [10.1016/j.jip.2022.107834](https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107834).
140. Moar, W.J. The sequence, structural, and functional diversity within a protein family and implications for specificity and safety: The case for ETX_MTX2 insecticidal proteins / W.J. Moar, A.J. Evans, C.R. Kessenich, J.A. Baum, D.J. Bowen, T.C. Edrington, J.A. Haas, J.K. Kouadio, J.K. Roberts, A. Silvanovich, Y. Yin, B.E. Weiner, K.C. Glenn, M.L. Odegaard // Journal of invertebrate pathology. 2017. V. 142. PP. 50–59. doi: [10.1016/j.jip.2016.05.007](https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.05.007).
141. Morkunas, I. Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* on the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine / I. Morkunas, D. Narozna, W. Nowak, S. Samardakiewicz, D. Remlein-Starosta // J Plant Physiol. 2011. V. 168. PP. 424–433. doi: [10.1016/j.jplph.2010.08.017](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.08.017).

142. Mostafa, S. Plant Responses to Herbivory, Wounding, and Infection / S. Mostafa, Y. Wang, W. Zeng, B. Jin // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 7031. doi: 10.3390/ijms23137031.
143. Mou, D.-F. Monocot crop-aphid interactions: plant resilience and aphid adaptation / D.-F. Mou, P. Kundu, L. Pingault, H. Puri, S. Shinde, J. Louis // *Curr Opin Insect Sci.* 2023. V. 57:101038. doi: 10.1016/j.cois.2023.101038.
144. Nalam, V. Plant defense against aphids, the pest extraordinaire / V. Nalam, J. Louis, J. Shah // *Plant science: an international journal of experimental plant biology.* 2019. №. 279. PP. 96–107. doi: [10.1016/j.plantsci.2018.04.027](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.027).
145. Nicolis, V.F. Whole-body transcriptome mining for candidate effectors from *Diuraphis noxia* / V.F. Nicolis, N.F.V. Burger, A.-M. Botha // *BMC Genomics.* 2022. V. 23:493. doi: [10.1186/s12864-022-08712-4](https://doi.org/10.1186/s12864-022-08712-4).
146. Nuessly, G.S. Resistance to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Euxesta stigmatias* (Diptera: Ulidiidae) in sweet corn derived from exogenous and endogenous genetic systems / G.S. Nuessly, B.T. Scully, M.G. Hentz, R. Beiriger, M.E. Snook, N.W. Widstrom // *J. Econ. Entomol.* 2007. 100. PP. 1887–1895. doi: 10.1093/jee/100.6.1887.
147. Ocelotl, J. ABCC2 is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth / J. Ocelot, J. Sánchez, I. Gómez, B.E. Tabashnik, A. Bravo, M. Soberón // *Sci. Rep.* 2017. 7:2386. doi: 10.1038/s41598-017-02545-y.
148. Ongena, M. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol / M. Ongena, P. Jacques // *Trends Microbio.* 2008. V. 16. PP. 115-125. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009.
149. Ongena, M. Recent Developments in Management of Plant Diseases (Plant Pathology in the 21st Century) / M. Ongena, G. Henry, P. Thonart // Springer Science Business Media B.V. 2010. V.1. PP. 59–69. DOI:10.1007/978-1-4020-8804-9.

150. Oukala, N. Bacterial endophytes: The hidden actor in plant immune responses against biotic stress / N. Oukala, K. Aissat, V. Pastor // *Plants*. 2021. V. 19. P. 1012. doi: 10.3390/plants10051012.
151. Painter, H.R. The Economic Value and Biologic Significance of Insect Resistance in Plants / Reginald H. Painter // *Journal of Economic Entomology*. 1941. V. 34. I. 3. PP. 358–367. doi: 10.1093/jee/34.3.358.
152. Palma, L. (a). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity / L. Palma, D. Muñoz, C. Berry, J. Murillo, P. Caballero // *Toxins*. 2014. 6(12). PP. 3296–3325. doi: 10.3390/toxins6123296.
153. Palma, L. (b). Molecular and insecticidal characterization of a novel Cry-related protein from *Bacillus thuringiensis* toxic against *Myzus persicae* / Palma L., D. Muñoz, C. Berry, J. Murillo, I.R. de Escudero, P. Caballero // *Toxins*. 2014. V. 6(11). PP. 3144–3156. doi: 10.3390/toxins6113144.
154. Pandharikar, G. Aphid infestation differently affects the defences of nitrate-fed and nitrogen-fixing *Medicago truncatula* and alters symbiotic nitrogen fixation / G. Pandharikar, J-L. Gatti, J-C. Simon, P. Frendo, M. Poirié // *Proc. R. Soc.* 2020. B 287: 20201493. doi: 10.1098/rspb.2020.1493.
155. Pangesti, N. Jasmonic acid and ethylene signaling pathways regulate glucosinolate levels in plants during rhizobacteria-induced systemic resistance against a leaf-chewing herbivore / N. Pangesti, M. Reichelt, J.E. van de Mortel, E. Kapsomenou, J. Gershenzon, J.J. van Loon, M. Dicke, A. Pineda // *J. Chem. Ecol.* 2016. 42. PP. 1212–1225. doi: 10.1007/s10886-016-0787-7.
156. Pangesti, N. Two-way plant mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms / N. Pangesti, A. Pineda, C.M. Pieterse, M. Dicke, J.J. van Loon // *Frontiers in plant science*. 2013. V. 4. №. 414. doi: 10.3389/fpls.2013.00414.
157. Pardo-Lopez, L. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop

- protection / L. Pardo-Lopez, M. Soberon, A. Bravo // FEMS Microbiol. Rev. 2013. V. 37. PP. 3–22. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x.
158. Park, Y.-G. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones / Y.-G. Park, B.-G. Mun, S.-M. Kang, A. Hussain, R. Shahzad, C.-W. Seo, A.-Y. Kim, S.-U. Lee, K.Y. Oh, D.Y. Lee // PLoS ONE. 2017. V. 12, e0173203. doi: 10.1371/journal.pone.0173203.
159. Pickett, J.A. Chemical Ecology. In: VanEmden, H.F.H.R. (Ed.) Aphids as Crop Pests / J.A. Pickett, R.T. Glinwood // Wallingford, UK: Cabi Publishing. 2007. PP. 235-260. doi:10.14411/eje.2009.008.
160. Pieterse C.M. Induced systemic resistance by beneficial microbes / C.M. Pieterse, C. Zamioudis, R.L. Berendsen, D.M. Weller, S.C. van Wees, P.A. Bakker // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. P. 347-375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
161. Pieterse, C.M.J. Networking by small-molecule hormones in plant immunity / C.M.J. Pieterse, A. Leon-Reyes, S. Van der Ent, S.C.M. Van Wees // Nat. Chem. Biol. 2009. V. 5. PP. 308–316. doi: 10.1038/nchembio.164.
162. Pineda, A. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes / A. Pineda, S.J. Zheng, J.J. van Loon, C.M. Pieterse, M. Dicke // Trends in plant science. 2010. V. 15(9). 507–514. doi: [10.1016/j.tplants.2010.05.007](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.007).
163. Podgórska, A. Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: Apoplasmic reactive oxygen species metabolism / A. Podgórska, M. Burian, B. Szal // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1353. doi: 10.3389/fpls.2017.01353.
164. Porcar, M. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on the Pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) / M. Porcar, A.M. Grenier, B. Federici, Y. Rahbe // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. 14. P. 4897–4900. doi: 10.1128/AEM.00686-09.

165. Powell, G. Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives / G. Powell, C.R. Tosh, J. Hardie // *Annu Rev Entomol.* 2006. V. 51:309. P. 30. doi: 10.1146/annurev.ento.51.110104.151107.
166. Praca, L.B. Entophytic colonization by brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown in vitro / L.B. Praca, A.C.M.M. Gomes, G. Cabral, E.S. Martins, E.H. Sujii // *Bt Res.* 2012. V. 3. №. 3. PP. 11–19. doi: 10.5376/bt.2012.03.0003.
167. Quadri, L.E. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases / L.E. Quadri, P.H. Weinreb, M. Lei, M.M. Nakano, P. Zuber, C.T. Walsh // *Biochemistry.* 1998. 37(6). PP. 1585–1595. doi: 10.1021/bi9719861.
168. Raaijmakers, J.M. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation / J.M. Raaijmakers, I. Bruijn, M.J. Kock // *Mol Plant Microbe In.* 2006. V. 19. PP. 699–710. doi: 10.1094/MPMI-19-0699.
169. Raaijmakers, J.M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics / J.M. Raaijmakers, I. De Bruijn, O. Nybroe, M. Ongena // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. PP. 1037–1062. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x.
170. Radchenko, E.E. Resources of Cereal Crops for Aphid Resistance / E.E. Radchenko, R.A. Abdullaev, I.N. Anisimova // *Plants* (Basel, Switzerland). 2022. V. 11(11). P. 1490. doi: [10.3390/plants11111490](https://doi.org/10.3390/plants11111490).
171. Radhakrishnan, R. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce / R. Radhakrishnan, I.J. Lee // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 109. PP. 181–189. doi: 10.1094/MPMI-19-0699.
172. Rana, K.L. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural

- sustainability / K.L. Rana, D. Kour, T. Kaur, R. Devi, A.N. Yadav, N. Yadav, H.S. Dhaliwal, A.K. Saxena // Antonie Van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. №. 8. PP. 1075-1107. doi: 10.1007/s10482-020-01429-y.
173. Ranjith, S. Maize apoplastic fluid bacteria alter feeding characteristics of herbivore (*Spodoptera frugiperda*) in maize / S. Ranjith, T. Kalaiselvi, M. Muthusami, U. Sivakumar // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 1850. doi: [10.3390/microorganisms10091850](https://doi.org/10.3390/microorganisms10091850).
174. Rashid, M.H. *Bacillus velezensis* YC7010 enhances plant defenses against brown planthopper through transcriptomic and metabolic changes in rice / M.H. Rashid, H.-J. Kim, S.-I. Yeom, H.-A. Yu, M.M. Manir, S.-S. Moon, Y.J. Kang, Y.R. Chung // Front. Plant Sci. 2018. V.9 P. 1904. doi: 10.3389/fpls.2018.01904.
175. Rashid, M.H. Induction of systemic resistance against aphids by endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing PHYTOALEXIN DEFICIENT4 in arabidopsis / M.H. Rashid, A. Khan A, M.T. Hossain, Y.R. Chung // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 211. doi: 10.3389/fpls.2017.00211.
176. Rashid, M.H. Induction of systemic resistance against insect herbivores plants by beneficial soil microbes / M.H. Rashid, Y.R. Chung // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1816. doi: 10.3389/fpls.2017.01816.
177. Robert-Seilaniantz, A. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism / A. Robert-Seilaniantz, M. Grant, J.D. Jones // Annual review of phytopathology. 2011. V. 49. PP. 317–343. doi: [10.1146/annurev-phyto-073009-114447](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447).
178. Rodríguez, M. Aphicidal activity of surfactants produced by *Bacillus atropheus* L193 / M. Rodríguez, A. Marín, M. Torres, V. Béjar, M. Campos, I. Sampedro // Front. Microbiol. 2018. V. 18. PP. 3114–3123. doi: 10.3389/fmicb.2018.03114. doi: 10.3389/fmicb.2018.03114.
179. Roh, J.Y. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control / J.Y. Roh, J.Y. Choi, M.S. Li, B.R. Jin, Y.H. Je // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 17. № 4. P. 547-559.

180. Rubil, N. Specialist Aphid Feeding Causes Local Activation of Salicylic and Jasmonic Acid Signaling in Arabidopsis Veins / N. Rubil, T. Kalachova, T. P. Hauser, L. Burketová // Molecular plant-microbe interactions: MPMI. 2022. V. 35(2). PP. 119–124. [doi: 10.1094/MPMI-08-21-0203-SC](https://doi.org/10.1094/MPMI-08-21-0203-SC).
181. Rumyantsev, S.D. Additive Effect of the Composition of Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis* on Systemic Resistance of Wheat against Greenbug Aphid *Schizaphis graminum* Due to Lipopeptides / S.D. Rumyantsev, V.Y. Alekseev, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, E.A. Cherepanova, R.R. Garafutdinov, I.V. Maksimov, S.V. Veselova // Life (Basel, Switzerland). 2023. V. 13(1). №. 214. doi: 10.3390/life13010214.
182. Sahin, B. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates by their insecticidal activity and their production of Cry and Vip3 proteins / B. Sahin, J. Gomis-Cebolla, H. Güneş, J. Ferré // PLoS ONE. 2018. V. 13. e0206813. doi: 10.1371/journal.pone.0206813.
183. Santamaria, M.E. Understanding plant defence responses against herbivore attacks: an essential first step towards the development of sustainable resistance against pests / M.E. Santamaria, M. Martínez, I. Cambra, V. Grbic, I. Diaz // Transgenic Res. 2013. V. 4. PP. 697-708. doi: 10.1007/s11248-013-9725-4.
184. Santoyo, G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions / G. Santoyo // Journal of advanced research. 2022. V. 40. PP. 45–58. [doi: 10.1016/j.jare.2021.11.020](https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.11.020).
185. Sattar, S. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest / S. Sattar, M.K. Maiti // J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 21. PP. 937–946. doi: 10.4014/jmb.1105.05030.
186. Schmiesing, A. Arabidopsis MYC Transcription Factors Are the Target of Hormonal Salicylic Acid/Jasmonic Acid Cross Talk in Response to *Pieris brassicae* Egg Extract / A. Schmiesing, A. Emonet, C. Gouhier-

- Darimont, P. Reymond // *Plant physiology*. 2016. V. 170(4). PP. 2432–2443. doi: 10.1104/pp.16.00031. doi: 10.1104/pp.16.00031.
187. Schweizer, F. Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior / F. Schweizer, P. Fernández-Calvo, M. Zander, M. Diez-Diaz, S. Fonseca, G. Glauser, M.G. Lewsey, J.R. Ecker, R. Solano, P. Reymond // *The Plant cell*. 2013. V. 25(8). PP. 3117–3132. doi: 10.1105/tpc.113.115139.
188. Serteyn, L. Induced systemic resistance by a plant growth-promoting rhizobacterium impacts development and feeding behavior of aphids / L. Serteyn, C. Quaghebeur, M. Ongena, N. Cabrera, A. Barrera, M. A. Molina-Montenegro, F. Francis, C. C. Ramírez // *Insects*. 2020. V. 11(4). P. 234. doi: [10.3390/insects11040234](https://doi.org/10.3390/insects11040234).
189. Shahzad, R. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa* / R. Shahzad, A.L. Khan, S. Bilal, M. Waqas, S.-M. Kang, I-J. Lee // *Environ. Exp. Bot.* 2017. V. 136. PP. 68–77. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.01.010.
190. Shao, E. Analysis of homologs of cry-toxin receptor-related proteins in the midgut of a non-bt target, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) / E. Shao, L. Lin, S. Liu, J. Zhang, X. Chen, L. Sha, Z. Huang, B. Huang, X. Guan // *Journal of insect science (Online)*. 2018. V. 18(1). P. 10. doi: 10.1093/jisesa/iex102. doi: 10.1093/jisesa/iex102.
191. Shao, E. Loop replacements with gut-binding peptides in Cry1Ab domain II enhanced toxicity against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) / E. Shao, L. Lin, C. Chen, H. Chen, H. Zhuan, S. Wu, L. Sha, X. Guan, Z. Huang // *Scientific reports*. 2016. V. 6. 20106. doi: [10.1038/srep20106](https://doi.org/10.1038/srep20106).
192. Shavit, R. Cereal aphids differently affect benzoxazinoid levels in durum wheat / Shavit R., Batyrshina Z. S., Dotan N., Tzin V. // *PloS one*. 2018. V. 13(12). e0208103. doi: [10.1371/journal.pone.0208103](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208103).

193. Silva-Sanzana, C. Influence of cell wall polymers and their modifying enzymes during plant-aphid interactions / C. Silva-Sanzana, J.M. Estevez, F. Blanco-Herrera // Journal of experimental botany. 2020. V. 71(13). PP. 3854–3864. [doi: 10.1093/jxb/erz550](https://doi.org/10.1093/jxb/erz550).
194. Singh, B. Characterisation of bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) behaviour and aphid host preference in relation to partially resistant and susceptible wheat landraces / B. Singh, A. Simon, K. Halsey, S. Kurup, S. Clark, G.I. Aradottir // The Annals of applied biology. 2020. V. 177(2). PP. 184–194. [doi: 10.1111/aab.12616](https://doi.org/10.1111/aab.12616).
195. Singh, G. Antifungal and insecticidal potential of chitinases: A credible choice for the eco-friendly farming / G. Singh, S.K. Arya // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019. V. 20. 101289. [doi: 10.1016/j.bcab.2019.101289](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101289).
196. Smith C.M. Plant resistance to aphid feeding: behavioral, physiological, genetic and molecular cues regulate aphid host selection and feeding / C.M. Smith, W.P. Chuang // Pest management science. 2014. V. 70(4). PP. 528–540. [doi: 10.1002/ps.3689](https://doi.org/10.1002/ps.3689).
197. Smith, C.M. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status / C.M. Smith, E.V. Boyko // Entomologia Experimentalis et Applicata. 2007. V. 122(1). PP. 1-16. [doi:10.1111/j.1570-7458.2006.00503.x](https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00503.x)
198. Sokurenko, Y. Extracellular Ribonuclease from *Bacillus licheniformis* (Balifase), a New Member of the N1/T1 RNase Superfamily / Y. Sokurenko, A. Nadyrova, V. Ulyanova, O. Ilinskaya // Biomed Res Int. 2016. 4239375. [doi: 10.1155/2016/4239375](https://doi.org/10.1155/2016/4239375). [doi: 10.1155/2016/4239375](https://doi.org/10.1155/2016/4239375).
199. Sorokan, A. Endophytic *Bacillus* spp. as a Prospective Biological Tool for Control of Viral Diseases and Non-vector *Leptinotarsa decemlineata* Say. in *Solanum tuberosum* L. / A. Sorokan, E. Cherepanova, G. Burkhanova, S. Veselova, S. Rumyantsev, V. Alekseev, I. Mardanshin, E.

- Sarvarova, R. Khairullin, G. Benkovskaya, I. Maksimov // *Frontiers in microbiology*. 2020. V. 11. 569457. [doi: 10.3389/fmicb.2020.569457](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569457).
200. Sumanpreet, K. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents / K. Sumanpreet, K. Sukhraj // *Front. Pharmacol.* 2015. PP. 563- 587. doi: 10.3389/fphar.2015.00272.
201. Tao, A. Characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut / A. Tao, F. Panga, S. Huang, G. Yu, B. Li, T. Wang // *Biocontrol Science and Technology*. 2014. V. 24. P. 901-924. doi:10.1080/09583157.2014.904502.
202. Tiwari M. The impact of microbes in plant immunity and priming induced inheritance: A sustainable approach for crop protection / M. Tiwari, D. Pati, R. Mohapatra, B.B. Sahu, P. Singh // *Plant Stress*. 2022. V. 4:100072. doi: 10.1016/j.stress.2022.100072.
203. Tjallingii, W.F. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses / W.F. Tjallingii // *Journal of experimental botany*. 2006. V. 57(4). PP. 739–745. [doi: 10.1093/jxb/erj088](https://doi.org/10.1093/jxb/erj088).
204. Torres-Quintero, M.C. Characterization of insecticidal Cry1Cb2 protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to *Myzus persicae* (Sulzer) / M.C. Torres-Quintero, I. Arenas-Sosa, F. Zuñiga-Navarrete, V.M. Hernández-Velázquez, A. Alvear-Garcia, G. Peña-Chora // *J Invertebr Pathol*. 2022. V. 189(2):107731. [doi: 10.1016/j.jip.2022.107731](https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107731).
205. Tunsagool, P. Targeted transcriptional and proteomic studies explicate specific roles of *Bacillus subtilis* iturin A, fengycin, and surfactin on elicitation of defensive systems in mandarin fruit during stress / P. Tunsagool, W. Leelasuphakul, J. Jaresitthikunchai, N. Phaonakrop, S. Roytrakul, W. Jutidamrongphan // *PLoS ONE*. 2019. V. 14. e0217202. doi: 10.1371/journal.pone.0217202.
206. Valenzuela-Soto, J.H. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development / J.H. Valenzuela-Soto, M.G. Estrada-

- Hernández, E. Ibarra-Laclette, J.P. Délano-Frier // *Planta*. 2010. №. 231(2). PP. 397–410. doi: 10.1007/s00425-009-1061-9.
207. van Bel, A.J.E. Functional evaluation of proteins in watery and gel saliva of aphids / A.J.E. van Bel, T. Will // *Front. Plant Sci*. 2016. 7:1840. doi: [10.3389/fpls.2016.01840](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01840).
208. Van de Mortel, J.E. Cellular responses of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* to cyclic lipopeptide surfactants and their dependence on G proteins / J.E. Van de Mortel, H. Tran, F. Govers, J.M. Raaijmakers // *Appl Environ Microb*. 2009. V. 75. PP. 4950–4957. doi: 10.1128/AEM.00241-09.
209. Van Loon, L.C. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants / L.C. Van Loon, M. Rep, C.M. Pieterse // *Annual Rev. Phytopathol*. 2006. V. 44. PP. 135–162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
210. Van Oosten, V.R. Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis* / V.R. Van Oosten, N. Bodenhausen, P. Reymond, J.A. van Pelt, L.C. van Loon, M. Dicke, C.M.J. Pieterse // *Mol.Plant–Microbe Interact*. 2008. V. 21. P. 919–930. doi: 10.1094/MPMI-21-7-0919.
211. Van Peer, R. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium wilt* of carnation by *Pseudomonas* sp.WCS417r / R. Van Peer, G.J. Niemann, B. Schippers // *Phytopathology*. 1991. V. 81. P. 728–734. doi:10.1094/PHYTO-81-728.
212. Veselov, S.Y. Study of cytokinin transport from shoots to roots of wheat plants is informed by a novel method of differential localization of free cytokinin bases or their ribosylated forms by means of their specific fixation / S.Y. Veselov, L.N. Timergalina, G.R. Akhiyarova, G.R. Kudoyarova, A.V. Korobova; I. Ivanov, T.N. Arkhipova, E. Prinsen // *Protoplasma*. 2018. №. 255. PP. 1581–1594. doi: 10.1007/s00709-018-1248-7.

213. Veselova, S.V. By modulating the hormonal balance and ribonuclease activity of tomato plants *Bacillus subtilis* induces defense response against potato Virus X and Potato Virus Y / S.V. Veselova, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, S.D. Rummyantsev, E.A. Cherepanova, V.Y. Alekseev, E.R. Sarvarova, A.R. Kasimova, IV. Maksimov // *Biomolecules*. 2022. V. 10. №. 12(2):288. doi: 10.3390/biom12020288.
214. Vieira, L.J.P. Host Preference and Fitness of *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Braconidae) in Different Instars of the Aphid *Schizaphis graminum* / L.J.P. Vieira, G.M. Franco, M.V. Sampaio // *Neotropical entomology*. 2019. 48(3). PP. 391–398. doi: [10.1007/s13744-018-0662-z](https://doi.org/10.1007/s13744-018-0662-z).
215. Vos, I.A. Onset of herbivore-induced resistance in systemic tissue primed for jasmonate-dependent defenses is activated by abscisic acid / I.A. Vos, A. Verhage, R.C. Schuurink, L.G. Watt, C.M.J. Pieterse, S.C.M. Van Wees // *Front. Plant. Sci.* 2013. V. 4. Art. 539. doi: 10.3389/fpls.2013.00539.
216. Vysotskaya, L. Effect on shoot water relations, and cytokinin and abscisic acid levels of inducing expression of a gene coding for isopentenyltransferase in roots of transgenic tobacco plants / S. Veselov, G. Kudoyarova // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. PP. 3709–3717. doi: 10.1093/jxb/erq182.
217. Waewthongrak, W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit / W. Waewthongrak, S. Pisuchpen, W. Leelasuphakul // *Postharvest Biol. Technol.* 2015. №. 99. PP. 44–49. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.07.016.
218. Wan, Y. β,γ -diamino acids as building blocks for new analogues of Gramicidin S: Synthesis and biological activity / Y. Wan, A. Stanovych, D. Gori, S. Zirah, C. Kouklovsky, V. Alezra // *European journal of medicinal chemistry*. 2018. №. 149. PP. 122–128. doi: [10.1016/j.ejmech.2018.02.053](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.053).

219. Wang, J. Jasmonate action in plant defense against insects / J. Wang, D. Wu, Y. Wang, D. Xie // Journal of Experimental Botany. 2019. V. 70. N. 13. PP. 3391–3400. doi: 10.1093/jxb/erz174.
220. Wang, Y. Cry78Aa, a novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein with activity against *Laodelphax striatellus* and *Nilaparvata lugens* / Y. Wang, Y. Liu, J. Zhang, N. Crickmore, F. Song, J. Gao, C. Shu // Journal of Invertebrate Pathology. 2018. V. 158. PP. 1–5. doi: 10.1016/j.jip.2018.07.007.
221. War, A.R. Mechanisms of plant defense against insect herbivores / A.R. War, M.G. Paulraj, T. Ahmad, A.A. Buhroo, B. Hussain, S. Ignacimuthu, H.C. Sharma // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. № 10. P. 1306-1320. doi: 10.4161/psb.21663.
222. Wasternack, C. Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds / C. Wasternack, M. Strnad // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19(9). P. 2539. doi: [10.3390/ijms19092539](https://doi.org/10.3390/ijms19092539).
223. Wei, G. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria / G. Wei, J.W. Kloepper, S. Tuzun // Phytopathology. 1991. V. 81. P. 1508–1512. doi:10.1093/jee/90.2.391.
224. Wu, C. The ethylene response factor Pti5 contributes to potato aphid resistance in tomato independent of ethylene signalling / C. Wu, C.A. Avila, F.L. Goggin // J Exp Bot. 2015. V. 66. №. 2. PP. 559-70. doi: 10.1093/jxb/eru472.
225. Xia, Y. The Multifunctions and future prospects of endophytes and their metabolites in plant disease management / Y. Xia, J. Liu, C. Chen, X. Mo, Q. Tan, Y. He, Z. Wang, J. Yin, G. Zhou // Microorganisms. 2022. V. 10(5). P. 1072. doi: 10.3390/microorganisms10051072.
226. Yan, X. Multifunctionality of jasmonic acid accumulation during aphid infestation in altering the plant physiological traits that suppress the

- plant defenses in wheat cultivar XN979 / X. Yan, S. Xu, J. Guo, J. Hu, D. He, L. Jia, H. Shang, G. Li, K. Luo // *Insects*. 2023. V. 14(7). P. 622. [doi: 10.3390/insects14070622](https://doi.org/10.3390/insects14070622).
227. Yang, S.Y. Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9 / S.Y. Yang, D.J. Lim, M.Y. Noh, J.C. Kim, Y.C. Kim, I.S. Kim // *Entomol. Res.* 2017. V. 47. PP. 55–59. [doi: 10.1111/1748-5967.12200](https://doi.org/10.1111/1748-5967.12200).
228. Yaseen, Y. Polynucleotide phosphorylase is involved in the control of lipopeptide fengycin production in *Bacillus subtilis* / Y. Yaseen, A. Diop, F. Gancel, M. Béchet, P. Jacques, D. Drider // *Arch Microbiol.* 2018. V. 200(5). PP. 783-791. doi: 10.1007/s00203-018-1483-5.
229. Yi, Y. Exploring plant-microbe interactions of the rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus mycoides* by use of the CRISPR-Cas9 system / Y. Yi, Z. Li, C. Song, O.P. Kuipers // *Environ Microbiol.* 2018. V. 20. № 12. PP. 4245–4260. doi: 10.1111/1462-2920.14305.
230. Yokota, T. Extraction, purification and identification / T. Yokota, N. Murofushi // In *Hormonal Regulation of Development*. 1980. P. 113. doi:10.1007/978-3-642-67704-5_3.
231. Yu Y. Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes / Y. Yu, Y. Gui, Z. Li, C. Jiang, J. Guo, D. Niu // *Plants*. 2022. V. 11:386. [doi: 10.3390/plants11030386](https://doi.org/10.3390/plants11030386).
232. Yu, Y. Increased oriental armyworm and aphid resistance in transgenic wheat stably expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) endotoxin and Pinellia ternate agglutinin (PTA) / Y. Yu, Z. Wei // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2020. 94. PP. 33–44. [doi: 10.1007/s11240-008-9384-y](https://doi.org/10.1007/s11240-008-9384-y).
233. Yudina, T.G. Antimicrobial activity of different proteins and their fragments from *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals against clostridia and archaea / T.G. Yudina, A.L. Brioukhanov, I.A. Zalunin, L.P. Revina, A.I. Shestakov, N.E. Voyushina, G.G. Chestukhina, A.I. Netrusov // *Anaerobe*. 2007. V. 13. PP. 6–13. doi: 10.1016/j.anaerobe.2006.09.006.

234. Zebelo, S. Rhizobacteria activates (+)- δ -cadinene synthase genes and induces systemic resistance in cotton against beet armyworm (*Spodoptera exigua*) / S. Zebelo, Y. Song, J. W. Kloepper, H. Fadamiro // Plant, cell & environment. 2016. V. 39(4). PP. 935–943. [doi: 10.1111/pce.12704](https://doi.org/10.1111/pce.12704).
235. Zehnder, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria / G. Zehnder, J.W. Kloepper, C. Yao, G. Wei // Biol Microb Control. 1997. V. 90. PP. 391–396. doi:10.1093/jee/90.2.391.
236. Zhang, L. Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects / L. Zhang, F. Zhang, M. Melotto, J. Yao, S.H. He // Journal of Experimental Botany. 2017. V. 68. No. 6. PP. 1371–1385. [doi: 10.1093/jxb/erw478](https://doi.org/10.1093/jxb/erw478).
237. Zhang, Q. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae / Q. Zhang, G. Hua, M.J. Adang // Insect Sci. 2017. V. 24. PP. 714–729. doi: 10.1111/1744-7917.12401.
238. Zhang, X. Nuclear localization of NPR1 is required for regulation of salicylate tolerance, isochorismate synthase 1 expression and salicylate accumulation in Arabidopsis / X. Zhang, S. Chen, Z. Mou // J. Plant Physiol. 2010. V. 167. PP. 144–148. doi: 10.1016/j.jplph.2009.08.002.
239. Zhang, Y. Comparative transcriptome and histological analyses of wheat in response to phytotoxic aphid *Schizaphis graminum* and non-phytotoxic aphid *Sitobion avenae* feeding / Y. Zhang, Y. Fu, J. Fan, Q. Li, F. Francis, J. Chen // BMC Plant Biology. 2019. 19:547. [doi: 10.1186/s12870-019-2148-5](https://doi.org/10.1186/s12870-019-2148-5).
240. Zhang, Y. Insight into watery saliva proteomes of the grain aphid, *Sitobion avenae* / Y. Zhang, Y. Fu, F. Francis, X. Liu, J. Chen // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2020. doi: 10.1002/arch.21752.
241. Zhang, Y. Plant-Mediated Interactions between Two Cereal Aphid Species: Promotion of Aphid Performance and Attraction of More Parasitoids by Infestation of Wheat with Phytotoxic Aphid *Schizaphis*

- graminum* / Y. Zhang, J. Fan, Y. Fu, F. Francis, J. Chen // Journal of agricultural and food chemistry. 2019. 67(10). PP. 2763–2773. doi: [10.1021/acs.jafc.8b06150](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06150).
242. Zhao, H. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus* / H. Zhao, D. Shao, C. Jiang, J. Shi, Q. Li, Q. Huang, M.S.R. Rajoka, H. Yang, M. Jin // Applied microbiology and biotechnology. 2017. 101(15). PP. 5951–5960. doi: [10.1007/s00253-017-8396-0](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0).
243. Zhao, J. Development of a novel compound microbial agent for degradation of kitchen waste / J. Zhao, C. Zhang, Z. Lu // Braz J. Microbiol. 2017. V. 49(1). PP. 166–177. doi: [10.1016/j.anaerobe.2006.09.006](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.09.006).
244. Zhaogao, L. Biosynthetic mechanisms of secondary metabolites promoted by the interaction between endophytes and plant hosts / L. Zhaogao, W. Weie, Q. Ming, H. Yuqi, X. Delin, L. Lin // Front. Microbiol. 2022. v. 13. 928967. doi: [10.3389/fmicb.2022.928967](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928967).
245. Zhong, C. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin which is toxic to insects in three orders / C. Zhong, D.J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S. Lin, E.R. Hart // J. Invertebr. Pathol. 2000. 76:b131–b139. doi: [10.1006/jipa.2000.4962](https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4962).
246. Zhu-Salzman, K. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores / K. Zhu-Salzman, D.S. Luthe, G.W. Felton // Plant Physiol. 2008. V. 146. 852. P. 8. doi: [10.1104/pp.107.112177](https://doi.org/10.1104/pp.107.112177).
247. Zhu-Salzman, K. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid / K. Zhu-Salzman, R.A. Salzman, J.E. Ahn, H. Koiwa // Plant physiology. 2004. 134(1). PP. 420–431. doi: [10.1104/pp.103.028324](https://doi.org/10.1104/pp.103.028324).