

**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 ЛИПОПЕПТИДОВ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА
BACILLUS В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ЗЛАКОВОЙ
ТЛЕ *SCHIZAPHIS GRAMINUM***

06.06.01 Биологические науки

1.5.21 – Физиология и биохимия растений

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа 2022

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук
Веселова Светлана Викторовна

Рецензенты:

Авальбаев Азамат Мелсович
кандидат биологических наук, снс

Федяев Вадим Валентинович
Кандидат биологических наук, доцент
кафедры биохимии и биотехнологии
ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность: Защита растений от патогенов путем их бактериализации представляет один из наиболее перспективных и экологически безопасных методов повышения урожайности и качества сельскохозяйственной продукции. При умелом использовании законов роста и развития ризобактерий в сообществе с растениями, а так же, знаний об изменении их видового состава можно добиться значительных результатов в биологической борьбе с вредителями и патогенной микрофлорой. К важным аргументам в пользу использования ризобактерий можно отнести невысокую стоимость, низкую энергоемкость при производстве, возможность сочетания с другими профилактическими мерами, неспособность вызывать инфекционные процессы в организме человека и непатогенность по отношению к растениям. Они способны инактивировать вырабатываемые патогенами токсины и некоторые из них могут применяться в качестве эффективных пробиотиков, обладают фунгицидной активностью [Мелентьев, 2007; Ongena et al., 2010; Meena, Kanwar, 2015], способностью влиять на ростовые параметры растений [Kudoyarova et al., 2014] и стимулировать их защитные свойства против стрессов различной природы [Van Loon, 2007; Pieterse et al., 2014]. Соответственно, их использование при соблюдении регламентов применения может быть эффективной альтернативой для замены пестицидов [Максимов и др., 2011].

В отличие от других ризосферных бактерий у эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* есть ряд кардинальных преимуществ. Эндофитность позволяет им «уходить» от конкурентного давления со стороны других видов ризобактерий, чему в сильной степени подвергаются другие микроорганизмы, искусственно привносимые в биоценозы, поскольку они занимают экологическую нишу, на которую претендуют разве что только патогены.

В настоящее время защиту растений от патогенов, вредителей и вирусов с помощью СРРБ связывают, с синтезом различных метаболитов с антибиотической активностью (антибиотиков, биосурфактантов, липопептидов), и синтезом различных ферментов, а также с элиситорной активностью и запуском системной индуцированной устойчивости (СИУ) [Miljakovic et al., 2020]. Кроме того, СРРБ оказывают прямое влияние на рост растений, что связано с повышением доступности для растений элементов минерального питания и продукции метаболитов с гормональной и сигнальной функциями (ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая (АБК), салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты) [Максимов и др., 2015, Miljakovic et al., 2020]. Бактериальные метаболиты являются действующим началом любого биопрепарата. 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 *B. subtilis* отвечает за синтез антимикробных соединений, которые являются в основном антимикробными пептидами [Максимов и др., 2015, Miljakovic et al., 2020].

Липопептиды (ЛП) – небольшие пептиды, обладающие антибиотическими свойствами по отношению к вирусам, микоплазмам, бактериям, дрожжам, грибам, оомицетам и вредителям из-за их способности связываться с липидным бислоем плазмалеммы и изменять его проницаемость [Andric et al., 2020]. Кроме того, ЛП способны запускать в растениях системную индуцированную устойчивость [Максимов и др., 2020]. Бактерии рода *Bacillus* продуцируют липопептиды трех семейств: сурфактины, фенгицины и итурины, что может объяснить высокий антипатогенный потенциал данных бактерий [Andric et al., 2020].

Подбор штаммов синтезирующих различные типы пептидов поможет отобрать консорциумы способствующие увеличению урожайности и снижению содержания токсических веществ в продуктах питания. Таким образом, наш подход к разработке молекулярных методов борьбы с вредителями и патогенами растений является принципиально новым.

Однако, информация об особенностях влияния бактерий рода *Bacillus*, проявляющих высокую степень инсектицидности по отношению к вредителям, на рост, устойчивость к неблагоприятным факторам среды и продуктивность растений остается пока ограниченной. Практически нет сведений об их влиянии на выживаемость вредителей. Мы считаем, что для преодоления отмеченных трудностей и решения поставленной глобальной задачи экологизации растениеводства, необходимо более досконально изучить саму природу индуцированной эндофитами системной устойчивости растений к патогенам и вредителям.

Цель исследования:

Оценить роль липопептидов эндофитных бактерий рода *Bacillus* 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. Охарактеризовать некоторые штаммы и изоляты перспективных эндофитных бактерий из коллекции ИБГ УФИЦ РАН на способность синтезировать липопептиды и некоторые другие метаболиты;

2. Оценить прямой афицидный эффект отобранных эндофитных штаммов и изолятов бактерий рода *Bacillus* и бактериальных липопептидов на обыкновенную злаковую тлю *Schizaphis graminum*;

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

4. Изучить воздействие эндофитных бактериальных штаммов рода *Bacillus*, синтезирующих липопептиды (сурфактин, итурин или фенгицин) на индукцию защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*, включающих в себя изменения в состоянии про-/антиоксидантной системы и экспрессии генов защитных белков растений пшеницы, ответственных за формирование системной устойчивости при поражении злаковой тлей;

5. Определить роль липопептидов в индукции защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*, связанной с изменениями в редокс-статусе и экспрессии генов патоген-индуцируемых белков у растений;

6. Провести оценку роли сурфактина в формировании устойчивости растений пшеницы к злаковой тле *S. graminum* с использованием рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* 26Д_{sfp}- с пониженным синтезом сурфактина.

Научная новизна. Впервые изучена роль эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* и их липопептидов в индукции неспецифических защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum*. Впервые показан прямой афицидный эффект эндофитных штаммов бактерий *Bacillus* spp. из коллекции ИБГ УФИЦ РАН по отношению к обыкновенной злаковой тле и доказана существенная роль бактериальных липопептидов в этом процессе. Впервые показано влияние ЛБФ из среды культивирования штаммов бактерий *Bacillus* spp. на различные типы устойчивости (антибиоз, выносливость) растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Также показана роль ЛБФ из среды культивирования штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 в индукции защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*, включающих в себя изменения в состоянии про-/антиоксидантной системы и экспрессии генов защитных белков растений пшеницы, ответственных за формирование системной устойчивости при поражении злаковой тлей. С использованием рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* 26Д_{sfp}- с пониженным синтезом сурфактина доказана роль этого липопептида в афицидности бактериального штамма и в запуске СИУ.

Практическая значимость работы. Совокупность полученных данных позволяет расширить современные представления о физиологических и биохимических механизмах устойчивости растений к злаковой тле. Изученные бактериальные штаммы и изоляты рода *Bacillus* могут быть рекомендованы для эффективной биологической борьбы со злаковой тлей *S. graminum* Rond. на посевах пшеницы. Основные результаты работы могут быть использованы в учебно-исследовательской работе.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на межд. конф. «PlantGen 2021» (Новосибирск, 2021), «Геномика 21 века» (онлайн-конференция, 2021), «V (XIII) Международная ботаническая конференция молодых учёных в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2021), The 45-th FEBS Congress (онлайн-конференция, 2021), «VI Всероссийская конференция с международным участием «Экобиотех» УИБ УФИЦ РАН» (Уфа, 2019), «VII Всероссийская конференция с международным участием «Экобиотех» УИБ УФИЦ РАН» (Уфа, 2021), «VII Всероссийская научно-практическая конференция «Биологические и технологические основы селекции, семеноводства, размножения и защиты сельскохозяйственных и лесных древесных растений»» (Ялта, 2021).

Конкурсная поддержка. Исследования поддержаны соглашением грантами РФФИ-офи_м 17-29-08014 «Липопептиды эндофитных бактерий *Bacillus* ssp. - 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.», РНФ 19-46-02004 «Бактериальные эндофиты как потенциальные вируциды для биоконтроля распространённых вирусов картофеля и томатов».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 6 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты проводили на проростках, отделенных листьях и растениях мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорта Салават Юлаев). Семена получали из Башкирского государственного аграрного университета (Уфа). Семена после стерилизации 80%-ным этанолом проращивали в кюветах на влажной бумаге на 10%-ной среде Хогланда-Арнона в климатостате КС-200 СПУ (Россия). Условия выращивания: температура 20/24°C (ночь/день), 16 ч светопериод, освещенность 10 тыс. люкс (лампы Osram L 36W/77). Часть семян подвергали предпосевной обработке бактериями *Bacillus* spp. (10^8 кл/мл) (бактерии из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: три штамма *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ, №128), 11ВМ (ВНИИСХМ №519) и Ttl2 (выделен из листьев *Triticum timopheevii* Zhuk, Республика Башкортостан), два штамма *B. thuringiensis* В-5351 и В-6066 и три изолята *Bacillus* spp., выделенные из листьев пшеницы *Bacillus* spp. Tas1 и Tas8.2. и из листьев картофеля *Bacillus* spp. Stl7, произрастающих на территории Республики Башкортостан (<http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc>) и «дефицитная» по синтезу сурфактина линия бактерии *B. subtilis* 26Д Δ *sfp*- с неактивным геном *sfp*), выращенные в чашках Петри на картофельно-глюкозном агаре и среде Луриа-Бертани (LB) (1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl) в течение трех суток в термостате ES-20 (Biosan, Латвия) при 28°C. Суточную суспензию бактерий получали с использованием миксера LS-110 при температуре 37°C. Обыкновенную злаковую тлю (*S. graminum* Rond.) для экспериментов размножали на проростках мягкой яровой пшеницы (*T. aestivum* L.) сорта Салават Юлаев, выращенных в изолированных сосудах с прожаренной при 180°C почвой в климатической

камере КС-200 СПУ (“Смоленский СКТБ СПУ”, Россия) с 16-ти часовым светопериодом при температуре 20/24°C (ночь/день), интенсивность освещения 146 Вт/м² (лампы Osram L 36W/77) [Радченко, 2012]. Коэффициент размножения тли рассчитывали по формуле: К = средняя плодовитость самки за время опыта / продолжительность опыта в днях [Радченко, 2012].

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. Идентификацию генов липопептид-синтетаз: сурфактин-синтазы *Sfp* (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 18S РНК бактерий рода *Bacillus*. Продукты ПЦР разделяли в 7% ПААГ, окрашенном бромистым этидием, с использованием маркерной ДНК Gene Ruler DNA Ladder (Fermentas).

Получение липопептид-богатой фракции из среды культивирования *Bacillus* spp. осуществлялось очисткой с помощью ряда стадий осаждения и экстракции 2М HCl, KOH и 80% этанолом. Затем неочищенный комплекс очищали с помощью фильтра Amicon (Merck), отсекающего вещества с молекулярной массой выше 3 кДа. Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) липопептидов, выделенных из культурального фильтрата бактерий *B. subtilis*, выполняли на приборе LC20-AT (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.

Афицидность бактериальных штаммов и изолятов проводили на отрезанных первых листьях проростков пшеницы, помещенных в пробирки с бактериальной суспензией, как описано ранее. Афицидность штамма и изолята выражали в % смертности от общего числа тлей.

Выносливость растений оценивали путем регистрации увеличения длины первого листа проростков в течение 14 дней эксперимента, как описано ранее и выражали в виде % прироста листа по сравнению с незараженным контролем.

Концентрацию H₂O₂ определяли по методу [Bindschedler et al., 2001], используя ксиленол оранжевый в присутствии Fe²⁺. Оптическую плотность комплекса измеряли при 560 нм на спектрофотометре BioSpec_Mini (“Shimadzu”, Япония). Активность пероксидазы (КФ 1.11.1.7, **ПО**) определяли по модифицированному методу [Ермаков и др., 1987]. Оптическую плотность измеряли при 490 нм и активности ферментов выражали в оптических ед./мг белка. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6, **КАТ**) определяли по методу [Королюк, 1988].

Количественную ПЦР проводили с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием набора предварительно определенных реагентов EvaGreenI (Synthol, Москва, Россия) и устройства CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров для генов *Tapr1*, *TaD-GLU*, *TaChiI*, *TaPI*, *TaPrx*, кодирующих соответственно PR-белки пшеницы PR-1, PR-2 (β-1-3 глюканаза), PR-3 (хитиназа), PR-6 (ИП), PR-9 (анионная ПО), в качестве гена «домашнего хозяйства» использовали ингибитор РНКаз / *TaRLI*. Эксперименты проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. Для статистической обработки результатов использовали компьютерные программы Statistica (“StatSoft”, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка некоторых перспективных эндофитных бактерий из коллекции ИБГ УФИЦ РАН на способность синтезировать липопептиды

Несмотря на то, что у одних и тех же бактерий рода *Bacillus* обнаруживают нескольких хозяйственно-полезных свойств, в практике растениеводства обычно используют штаммы с одной из преобладающих активностей, а для усиления полезных функций биопрепаратов их составляют из различных штаммов бактерий.

Однако поиск совместимых штаммов, усиливающих полезные свойства друг друга, может занять много времени, поэтому для разработки биологических препаратов с комплексной активностью важно всесторонне изучить полезные свойства бактериальных штаммов для их дальнейшего успешного применения в растениеводстве.

Восемь штаммов и изолятов рода *Bacillus* были протестированы на наличие генов липопептид-синтаз (рис.1а). У штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* B-5351 был обнаружен ген биосинтеза сурфактина (рис.1а). У изолятов *Bacillus* sp. Tas1 и *Bacillus* sp. Tas8.2 были обнаружены гены биосинтеза сурфактина и итурина (рис.1а). У штаммов *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и *B. thuringiensis* B-6066 и изолята *Bacillus* sp. Stl7 были обнаружены гены биосинтеза итурина и фенгицина (рис.1а).

Широко используемым методом идентификации и определения липопептидов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на колонках с обращенно-фазовым сорбентом. Показано, что для элюции сурфактина можно использовать смеси ацетонитрила с водой, подкисленные уксусной кислотой или ее галогензамещенными производными [Cao et al., 2012.].

ВЭЖХ-анализ фракции липопептидов, выделенных из культуральной жидкости бактерий *B. subtilis* 26Д, выявил в их составе соединение со временем удержания Rt около 4.5 мин, равный по подвижности коммерческому сурфактину (рис. 1б).

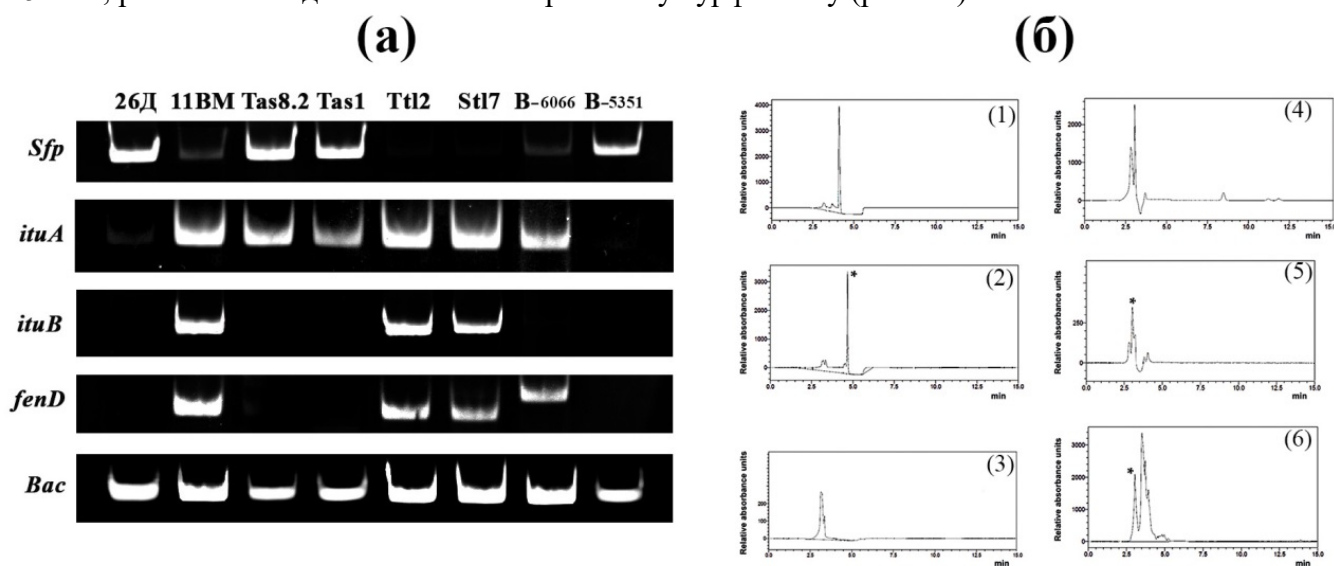


Рис. 1 (а) Скрининг бактерий рода *Bacillus* на наличие генов, кодирующих липопептид-синтазы: *Sfp* – сурфактин-синтазу, *ituA* и *ituB* – итурин-синтазы, и *fenD* – фенгицин-синтазу, *Bac* – референсный ген. (б) Хроматографические профили ВЭЖХ-анализа препаратов бактериальных липопептидов ($\lambda=210$ нм). (1) - коммерческий сурфактин (Sigma-Aldrich, США; 0.1 мг/мл); (2) и (3) - липопептид-содержащая фракция культуральной жидкости *B. subtilis* 26Д; (4) – коммерческий итурин (Sigma-Aldrich, США; 0.1 мг/мл); (5) и (6) - липопептид-содержащая фракция *B. subtilis* 11ВМ. (1, 2, 4, 5) - элюент 1 (вода:уксусная кислота 0.1% в соотношении 60:40), (3 и 6) - элюент 2 (ацетонитрил:уксусная кислота 0.1% в соотношении 40:60). Звездочкой (*) отмечены пики, соответствующие в образцах липопептидов коммерческому сурфактину (2) и итурину (5, 6).

Таким образом, согласно данным ПЦР (рис. 16) и ВЭЖХ-анализа (рис. 16) основным липопептидом, продуцируемым клетками *B. subtilis* 26Д является сурфактин. У липопептидов бактерий *B. subtilis* 11ВМ обнаружили 3 липопептида с другими характеристиками подвижности на колонке. Учитывая то, что ПЦР показала наличие в геноме бактерий *B. subtilis* 11ВМ гена итурин-синтетазы, можно с большой степенью вероятности предполагать, что мажорным липопептидом, синтезируемым клетками этих бактерий является итурин.

2. Прямой афицидный эффект эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* и бактериальных липопептидов на обыкновенную злаковую тлю *Schizaphis graminum*

Известно, что ЛП проявляют антифунгальную и противовирусную активность, кроме того, недавно стали появляться работы, в которых показана инсектицидная активность липопептидов, в частности сурфактина к тлям [Максимов и др., 2020]. Проверка афицидной активности пяти штаммов и изолятов рода *Bacillus* показала, что все бактерии обладали высокой инсектицидной активностью против обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (табл. 1). Как показали наши результаты, инсектицидность бактериальных штаммов по отношению к злаковой тле проявлялась благодаря синтезу ими липопептидов (ЛП). ЛБФ пяти штаммов и изолятов также как и сами штаммы оказывали негативный эффект на жизнеспособность *S. graminum* при прямом воздействии (табл. 1).

Нами была обнаружена концентрационная зависимость афицидного эффекта ЛБФ из среды культивирования бактериальных штаммов и изолятов (табл. 1). У штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ эту зависимость наблюдали в пределах концентраций от 2.5 до 150 мкг/мл (табл. 1), 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 (табл. 1). 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 (табл. 1).

Таблица 1 Афицидность штаммов и изолятов рода *Bacillus* и их ЛБФ

Вариант обработки бактериальными штаммами	Смертность тли, % (афицидность)	Вариант обработки метаболитами	Концентрация, мкг/мл	Смертность тли, % (афицидность)
Вода	6.9±1.7	Вода	-	6.9 ± 1.7
<i>B. subtilis</i> 26Д	66.7 ± 6.9	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д	2.5	28.1 ± 2.1
			25	58.8 ± 5.3
			50	67.8 ± 6.1
			100	84.3 ± 6.5
			150	100.0 ± 7.9
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	72.3 ± 8.1	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.5	21.2 ± 1.8
			25	52.1 ± 6.2
			50	60.0 ± 4.7
			100	79.5 ± 5.8
			150	100.0 ± 6.9
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	76.7 ± 9.3	ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	2.5	18.3 ± 1.7
			25	68.2 ± 5.1
			50	100.0 ± 4.9
			100	100.0 ± 5.0
			150	100.0 ± 5.2
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	73.3 ± 8.8	ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.5	13.5 ± 1.5
			25	45.3 ± 2.8
			50	100.0 ± 3.8

			100	100.0 ± 4.7
			150	100.0 ± 5.1
<i>B. thuringiensis</i> B-6066	76.8 ± 8.7	ЛБФ <i>B. thuringiensis</i> B-6066	2.5	21.5 ± 2.6
			25	56.7 ± 3.9
			50	100.0 ± 4.5
			100	100.0 ± 4.8
			150	100.0 ± 5.9

У штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ 100% смертность тли вызывала концентрация ЛБФ 150 мкг/мл (табл. 3.2), а у изолятов *Bacillus* sp. Tas8.2, *Bacillus* sp. Tas1 и штамма *B. thuringiensis* B-6066 100% смертность тли вызывала концентрация ЛБФ 50 мкг/мл (табл. 1).

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

3. Влияние эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* и бактериальных липопептидов на различные типы устойчивости (антибиоз, выносливость) растений мягкой яровой пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*

В дальнейшей работе было изучено опосредованное через растение влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. и их ЛБФ на жизнеспособность злаковой тли, которое может выражаться в рост-стимулирующем эффекте данных бактерий и их метаболитов. Такой эффект бактерий может приводить к повышению выносливости (толерантности) растений к тлям, заключающейся в быстрой восстановлении фотосинтетической активности и ростовых процессов [Koch et al., 2016, Rashid, Chung, 2017].

В наших экспериментах установлена низкая выносливость растений пшеницы сорта СЮ по отношению к *S. graminum*, которая проявлялась в торможении роста 1 и 2 листьев (табл. 2). Обработка растений клетками бактериальных штаммов или их метаболитами ускоряла рост 1 и 2 листьев пшеницы, как в норме, так и при заселении тлей (табл. 2, табл. 3).

Таблица 2 Влияние рост-стимулирующих концентраций суспензии бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. на смертность обыкновенной злаковой тли и ростовые характеристики растений пшеницы, заселенных *S. graminum*

Показатели	Бактериальный штамм/изолят					
	Вода*	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	<i>Bacillus</i> Tas 8.2	<i>Bacillus</i> Tas 1	<i>B. th.</i> B-6066
Концентрация, мкл суспензии / г семян	-	2.0	1.0	1.0	2.0	2.0
Прирост 1-ого листа, %	78.2±6.1	114.7±7.3	103.2±5.6	113.2±8.1	110±6.6	103.6±2.5
Прирост 2-ого листа, %	69.9±5.1	142±12.9	115±9.2	116±5.8	111±4.7	121±7.1
Смертность тлей, %	6.9±1.7	31.5±2.2	21.3±3.4	28.7±1.4	22.6±1.1	36.3±3.5

Примечание: *Прирост 1-ого и 2-ого листьев, не обработанных бактериальными штаммами и не заселенных тлей принят за 100%.

Таблица 3 Влияние рост-стимулирующих концентраций ЛБФ бактериальных штаммов и изолятов рода *Bacillus* на смертность обыкновенной злаковой тли и ростовые характеристики растений пшеницы, заселенных *S. graminum*

	Метаболит из бактериального штамма/изолята
--	--

Показатели	Вода*	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	<i>Bacillus</i> Тas 8.2	<i>Bacillus</i> Тas 1	<i>B. th.</i> В-6066
Концентрация, метаболита, мкг/мл	-	2.5	1.5	2.0	2.5	1.5
Прирост 1-ого листа, %	78.2±6.1	122±5.7	114±4.8	99.5±3.6	113±4	113±8
Прирост 2-ого листа, %	69.9±5.1	98.1±6.2	98.9±7.6	93.6±5.4	100±2.8	95.3±3.1
Смертность тлей, %	6.9±1.7	24.9±2.0	20.9±2.1	18.6±4.9	14.1±5.1	21.5±3.9

Кроме того, показано, что бактериальные штаммы и изоляты *Bacillus* spp. и их метаболиты опосредованно влияли на смертность злаковой тли, кормившейся на обработанных растениях пшеницы (табл. 2, табл. 3). Обработка растений бактериями увеличивала смертность тлей на 14.4 - 29 % относительно контрольных растений (табл. 2). Наибольший опосредованный эффект на смертность тли оказывали штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-6066 и изолят *Bacillus* sp. Tas8.2 (табл. 2). Обработка растений ЛБФ изученных штаммов и изолятов, увеличивала смертность тлей на 7.2 - 18 % относительно контрольных растений (табл. 3). Наименьший эффект оказала ЛБФ изолята *Bacillus* sp. Tas1 (табл. 3).

4. Опосредованное воздействие эндофитных бактериальных штаммов рода *Bacillus*, синтезирующих липопептиды (сурфактин, итурин или фенгицин) и их ЛБФ, на индукцию защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*

Опосредованный через растение механизм, способствующий формированию устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле, может быть связан с индукцией штаммами бацилл СИУ (системной индуцированной устойчивостью) против вредителя.

Защитные реакции при развитии СИУ, обычно характеризуются ранним накоплением активных форм кислорода (АФК), в том числе H_2O_2 , и изменением активности ферментов про-/антиоксидантной системы. Заселение контрольных растений пшеницы тлями приводило к уменьшению содержания пероксида водорода (рис. 2а), снижению активности пероксидазы и повышению активности каталазы на начальных этапах инфицирования (рис. 2б, в) и сопровождалось низкой смертностью тлей и низкой выносливостью растений (табл. 2, табл. 3).

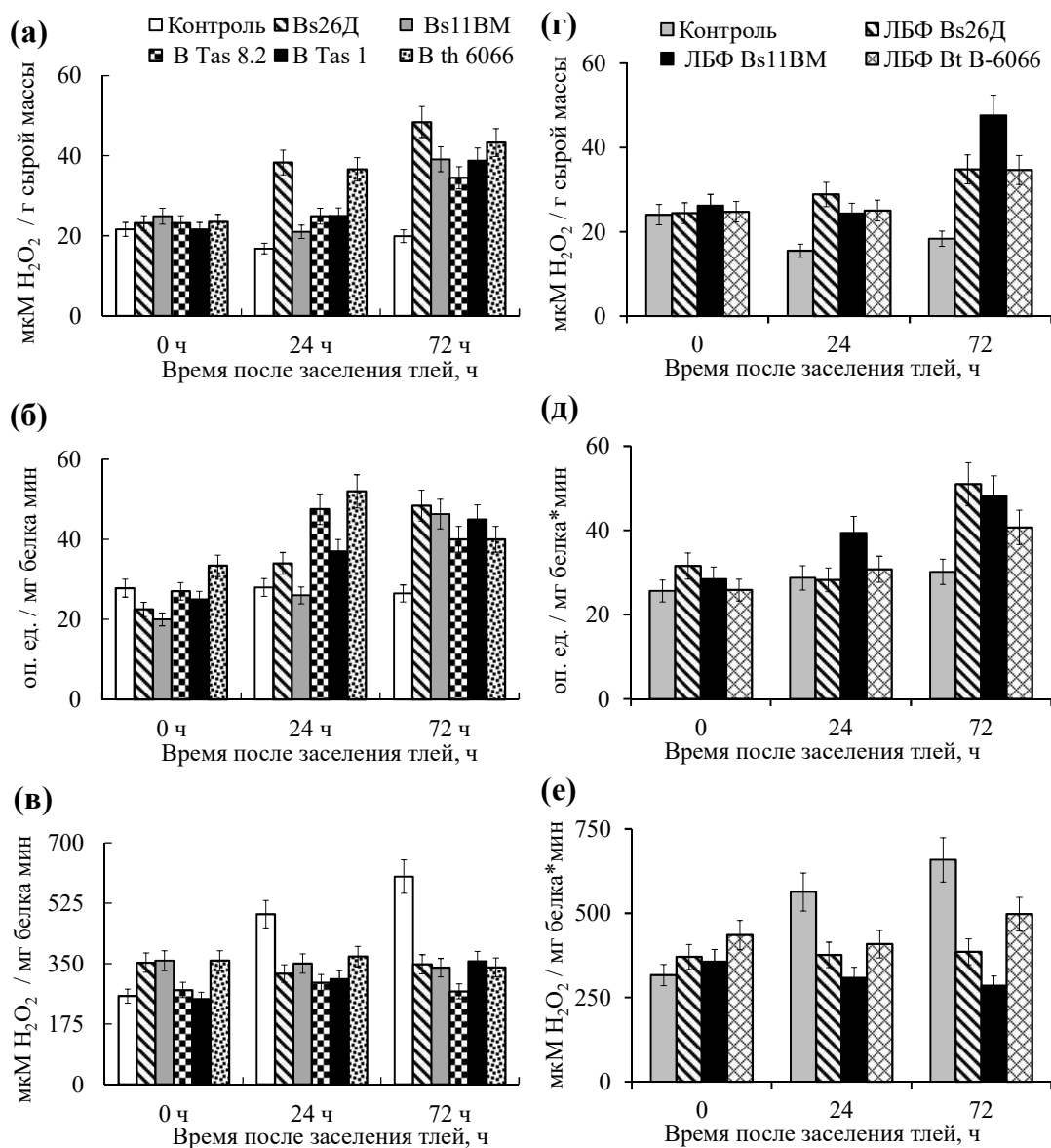


Рис.2 Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. (а, б, в) и ЛБФ из среды культивирования бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 (г, д, е) на содержание перекиси водорода (а, г), активность пероксидазы (б, д) и каталазы (в, е) в заселенных *S. graminum* растениях пшеницы.

Предпосевная обработка семян пшеницы штаммами и изолятами *Bacillus* spp. приводила к резкому накоплению H₂O₂ повышению активности пероксидазы и снижению активности каталазы в листьях пшеницы, заселенных *S. graminum*, что, возможно, обуславливало устойчивость таких растений к вредителю (рис. 2а, б, в). Во всех вариантах обработки наблюдали положительную корреляцию смертности злаковой тли с изменением содержания H₂O₂ (табл. 2, рис. 2а). Наибольшее повышение содержания перекиси водорода через 24 и 72 часа после заселения злаковой тлей наблюдали у растений, обработанных штаммами *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* В-6066, оказавшими наибольший эффект на смертность тли и на выносливость растений (табл. 2). Наибольший эффект на повышение активности пероксидазы оказали изолят *Bacillus* sp. Tas8.2 и штамм *B. thuringiensis* В-6066 (рис. 2б). Наибольший эффект на снижение активности каталазы оказал изолят *Bacillus* sp. Tas8.2 (рис. 2в).

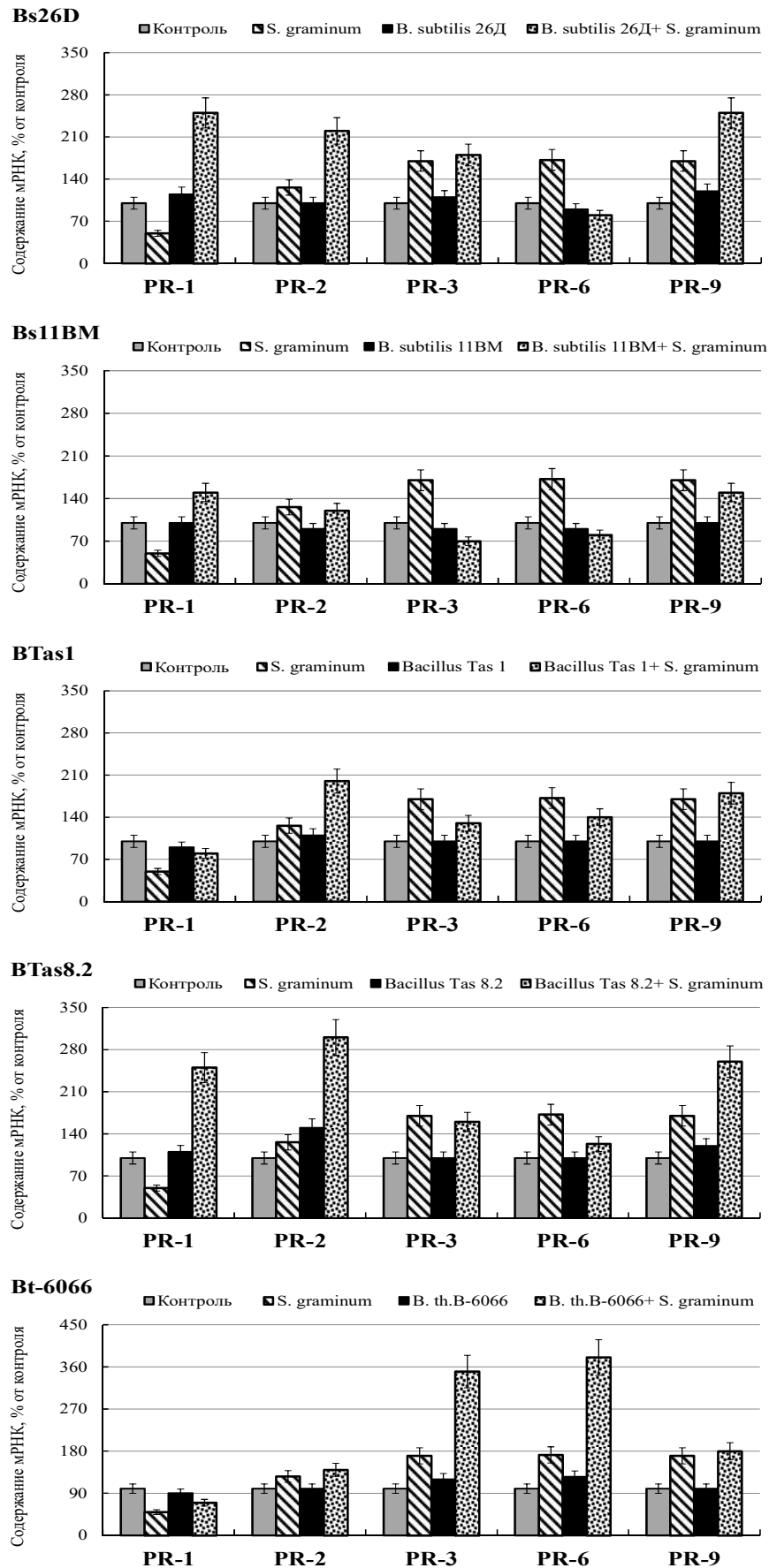


Рис. 3 Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. на транскрипционную активность генов, кодирующих PR-белки пшеницы, маркеры сигнальных путей, через 72 часа после заселения растений злаковой тлей *S. graminum*.

В нашей работе было исследовано влияние ЛБФ из среды культивирования трех штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066, синтезирующих ЛП сурфактин, итурин и фенгицин, соответственно, на индукцию защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Влияние ЛБФ на компоненты про-/антиоксидантной системы растений пшеницы заселенных злаковой тлей было сходным с влиянием самих штаммов на эти процессы. Однако ЛБФ всех трех штаммов значительно индуцировали накопление H_2O_2 и повышали активность ПО только через 72 часа после заселения растений вредителем (рис. 2г, д), в то время как бактериальные штаммы индуцировали эти процессы уже через 24 часа после заселения тлей растений пшеницы (рис. 2г, д). Активность КАТ в растениях пшеницы заселенных злаковой тлей ЛБФ снижали также как и бактериальные штаммы (рис. 2в, е). Такие результаты могут говорить о роли ЛП в индукции системной устойчивости и развитии защитных реакций у пшеницы против злаковой тли.

Еще одним показателем формирования системной устойчивости в растениях считается экспрессия генов PR-белков, регулируемая промежуточными продуктами сигнальных систем клеток (например, H_2O_2) и фитогормонами [Van Loon et al., 2006]. Для определения способности бактерий рода *Bacillus* spp. и их ЛБФ 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.

Наши результаты показали, что через 72 часа после заселения тлей у восприимчивого сорта СЮ активировался ЖК/этилен- сигнальный путь – мы обнаружили небольшое повышение содержания транскриптов генов *PR-3*, *PR-6* - маркеров ЖК/этилен-сигнального пути и гена *PR-9* (рис. 3). Предпосевная обработка бактериальными штаммами Bs26Д, BsTas8.2 приводила к накоплению мРНК генов *PR-1*, *PR-2* и *PR-9* маркеров СК-сигнального пути у растений заселенных злаковой тлей (рис. 3).

Таблица 4 Влияние ЛБФ из среды культивирования бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-6066 на транскрипционную активность генов, кодирующих PR-белки через 72 часа после заселения растений злаковой тлей *S. graminum*

Показатели		Вариант обработки ЛБФ штаммов				
Накопление транскриптов генов PR-белков, % от контроля	Гены PR-белков	Вариант	Вода	ЛБФ Bs26Д	ЛБФ Bs11ВМ	ЛБФ Вt В-6066
	TaPR1	Контроль		100	111 ± 13	119 ± 14
<i>S. graminum</i>			66 ± 7	350 ± 30	132 ± 15	129 ± 19
TaPR2	Контроль		100	202 ± 23	102 ± 10	77 ± 7
	<i>S. graminum</i>		116 ± 8	488 ± 27	101 ± 18	89 ± 2
TaPR3	Контроль		100	92 ± 9	97 ± 7	185 ± 26
	<i>S. graminum</i>		111 ± 13	14 ± 2	198 ± 10	291 ± 20
TaPR6	Контроль		100	85 ± 6	67 ± 18	85 ± 4
	<i>S. graminum</i>		177 ± 12	178 ± 18	100 ± 13	336 ± 33
TaPR9	Контроль		100	122 ± 23	92 ± 9	115 ± 13
	<i>S. graminum</i>		224 ± 18	266 ± 11	102 ± 11	