

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 (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Уфа – 2023

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

Научный руководитель: Старший научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН
Веселова Светлана Викторовна, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: Главный научный сотрудник лаборатории ризосферной микрофлоры №1 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»
Белимов Андрей Алексеевич, доктор биологических наук

Финкина Екатерина Ивановна, кандидат химических наук
Старший научный сотрудник отдела «Учебно-научный центр» Государственного Научного Центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «24» января 2024 г. в «14.00» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УФИЦ РАН по адресу 450054, г. Уфа, Пр. Октября, 71 и на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru>).

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01

доктор биологических наук, доцент

Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. В современной научной литературе взаимоотношения растений с вредными организмами вместе с их микробиомами рассматриваются в рамках холобионта, совокупности хозяина и других организмов, живущих в фитосфере и взаимодействующих между собой (Oukala et al., 2021; Santoyo, 2022). Многочисленные полезные микроорганизмы микробиома или стимулирующие рост растений микроорганизмы (СРРМ) привлекают огромное внимание ученых из-за своих ростстимулирующих и иммуностимулирующих свойств (Santoyo, 2022). Особое место среди СРРМ занимают эндофиты, 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).

В последние два десятилетия установлено, что полезные свойства бактериальных эндофитов реализуются через прямые и опосредованные (непрямые) 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. Так дельта-эндотоксины (Cry и Cyt) бактерий *Bacillus thuringiensis* (Bth-токсины) и циклические липопептиды (ЛП) бактерий рода *Bacillus* обладают инсектицидными свойствами и могут быть использованы как эффективные регуляторы численности насекомых (Palma et al., 2014a; Yang et al., 2017; Rodríguez et al., 2018). Непрямые защитные механизмы связаны с активацией иммунной системы растений и запуском системной индуцированной устойчивости (СИУ), которая в настоящее время определяется как – прайминг (Pieterse et al., 2014; Khoshru et al., 2023). Прайминг, индуцированный бактериями, обеспечивает более быструю и длительную защиту растений на весь вегетационный период с низкими физиологическими затратами, что привлекает большое внимание ученых (Conrath et al., 2015; Khoshru et al., 2023). Механизмы прайминга используют различные стратегии защиты, 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). Эти опосредованные механизмы защиты растений эндофитами реализуются за счет секреции метаболитов с элиситорными свойствами, таких как фитогормоны, липополисахариды, летучие органические соединения и др. (Oukala et al., 2021; Lee et al., 2022). В последнее время ученых интересует элиситорная роль Bth-токсинов и ЛП в запуске защитных сигнальных путей у растений (Denoirjean et al., 2021; Lee et al., 2022). В последние пять лет количество исследований по этому вопросу стремительно увеличивается, и механизмы взаимодействия растений и эндофитов при развитии прайминга продолжают изучаться. Однако в этой новой области исследований остаются нерешенные вопросы (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 (Kashyap et al., 2023). 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.), которая наносит значительный ущерб посевам пшеницы, уменьшая скорость фотосинтеза, и как следствие скорость роста, во время кормления тлей на растениях (Morkunas et al., 2011; Koch et al., 2016).

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 Cry1a 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* 26DSfp⁻ 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 афицидный 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* 26ДСfp⁻ 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 (Cry-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.

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 Сгу-белков.
2. Установлено, что ЛБФ и Сгу1а 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.

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; РФФИ Аспиранты 20-316-90021; грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых МК-2543.2022.1.4.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, из них 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.5.4 – Биохимия (биологические науки) (пункт 11 «Биохимические / метаболические / энергетические процессы в тканях и органах организма в норме и при патологиях. Метабономика» и пункт 25 «Экологическая биохимия, механизмы адаптации к окружающей среде»), охватывающей проблемы метаболитов живых организмов и их функций, биохимических процессов в организме растений при патологии и экологической биохимии при адаптации растений к биотическому стрессовому фактору.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 230 страницах, содержит 21 таблицу и 20 рисунков. Включает в себя введение, обзор литературы (глава 1), описание методов исследования (глава 2), результаты исследования и их обсуждение (глава 3), заключение, выводы и список литературы (247 источников).

Благодарности. Автор благодарит научного руководителя Веселову Светлану Викторовну и заведующего лабораторией биохимии иммунитета растений д.б.н., проф. Максимова Игоря Владимировича, а также сотрудников лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН к.б.н. А.В. Сорокань, к.б.н. Г.Ф. Бурханову, к.б.н. Е.А. Черепанову за помощь при выполнении и обсуждении работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 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), три штамма *B. thuringiensis* В-5689, В-5351 и В-6066 и три изолята *Bacillus* sp. выделенные из листьев пшеницы *Bacillus* sp. Tas1 и Tas8.2. и из листьев картофеля *Bacillus* sp. Stl7, 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* 26Дsfp⁻ с неактивным геном *sfp*, кодирующим фермент 4-фосфопантенил-трансферазу, который участвует в синтезе ЛП

сурфактина, и рекомбинатная линия *B. subtilis* 26DCryChS с встроенным геном Btcry1Ia кодирующим белок Cry1Ia. 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). Для экспериментов использовали популяцию обыкновенной злаковой тли *S. graminum* собранную летом 2019 г. в Уфимском районе Республики Башкортостан и поддерживаемую в лабораторных условиях (Rumyantsev et al., 2023). Для экспериментов растения выращивали на гидропонной культуре на 10% питательном растворе Хогланда-Арнона в ростовой камере KBW E6 (Binder GmbH, Германия) как описано в работе (Rumyantsev et al., 2023). Обработку семян пшеницы бактериальными штаммами и изолятами проводили полусухим способом, а обработку растений ЛБФ проводили за 24 ч до заселения тлей путем добавления ЛБФ или их композиции в питательную среду растений (Rumyantsev et al., 2023).

Бактериальные штаммы культивировали на жидкой лизогенной бульонной среде (LB) при 28 °C на лабораторных шейкерах (120 об/мин) в течение 72 ч до полной споруляции. Эндофитность штаммов определяли на стерильных растениях пшеницы с помощью методики описанной в работах (Sorokan et al., 2020; Rumyantsev et al., 2023). Для проверки антагонистической активности использовали метод перпендикулярных штрихов. Содержания фитогормонов (цитокининов (ЦК), индолил уксусной кислоты (ИУК) и абсцизовой кислоты (АБК)) определяли в супернатанте культуральной жидкости бактерий с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Предварительно ЦК выделяли с помощью бутанольной экстракции, концентрировали и разделяли с помощью тонкослойной хроматографии. ИУК и АБК выделяли и очищали с помощью эфирной экстракции (Rumyantsev et al., 2023).

Геномную ДНК из культуральной среды бактерий выделяли лизирующим буфером, содержащим 1% смолы Chelex 100 (Biorad, США) (Rumyantsev et al., 2023). Идентификацию генов липопептид-синтаз и генов Cry-белков у бактериальных штаммов *Bacillus* spp. осуществляли с помощью ПЦР с геноспецифичными праймерами в амплификаторе типа TP4-ПЦР-01-«Терцик» (ДНК-Технологии, Россия). ЛБФ из жидкой культуральной среды бактерий получали методом этанольной экстракции (Waewthongrak et al., 2015; Tunsagool et al., 2019). Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) ЛП, выделенных из культурального фильтрата бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ, выполняли на приборе LC20-AT (Shimadzu, Япония), оснащенный диодно-матричным детектором, с использованием колонки Discovery C18 (25 см × 4.6 мм × 5 мкм).

Рост-стимулирующие концентрации для бактерий, ЛБФ и их смесей определяли по всхожести семян согласно ГОСТ 12038-84. 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 мкл суспензии на 1 г семян). Концентрации ЛБФ составили 0.5 - 4.5 мкг/мл. В работе была проверена афицидность бактериальных штаммов и их ЛБФ по модифицированной для

пшеницы методике (Веселова и др., 2019). Афицидность штамма, изолята, рекомбинантной линии или ЛБФ по отношению к злаковой тле выражали в % смертности от общего числа тлей (Rumyantsev et al., 2023). Тест на антибиоз и выносливость проводили, как описано ранее (Rumyantsev et al., 2023). Смертность тли выражали в % от их общего количества (Радченко, 2008). Выносливость выражали в % прироста листа от незараженного контроля. Измерение генерации перекиси водорода (H_2O_2) и активности ферментов пероксидазы (КФ 1.11.1.7) и каталазы (КФ 1.11.1.6) проводили, как описано ранее (Rumyantsev et al., 2023). Для анализа экспрессии *PR*-генов тотальную РНК пшеницы экстрагировали с использованием реагента TRIzol™ (Merck KGaA, Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкциями производителя. 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). Все праймеры были разработаны с помощью онлайн ресурса IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home>). 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

В работе была оценена эндофитность семи бактериальных штаммов и изолятов с использованием стерильных пробирочных растений пшеницы. Самую высокую способность проникать в ткани пшеницы и размножаться там показал штамм *B. subtilis* 26Д (173×10^4 КОЕ/г сырой массы). Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) у *B. subtilis* Ttl2 и *B. thuringiensis* B-5689 было примерно одинаковым ($50-60 \times 10^4$ КОЕ/г сырой массы). Способность *Bacillus* sp. Stl7 колонизировать внутренние ткани растений была на порядок меньше, а у штаммов *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* B-5351 и B-6066 – на два порядка меньше, чем у штамма *B. subtilis* 26Д. Для рода *Bacillus* sp., свойство эндофитности можно считать доказанным (Максимов и др., 2018). Напротив, сообщений об эндофитах *B. thuringiensis* очень мало (Praca et al., 2012; Тао et al., 2014).

В работе было проанализировано содержание ЦК, ИУК и АБК в культуральной среде восьми штаммов и изолятов рода *Bacillus* (все кроме *B. thuringiensis* B-5689). Среди изученных штаммов не обнаружены супер-продуценты ауксинов и ЦК, скорее всего, из-за того, что все они были эндофитами. Так, наибольшее содержание ЦК было обнаружено в культуральной жидкости (КЖ) штамма *B. subtilis* 26Д и изолята *Bacillus*

sp. Tas8.2 (130-150 нг/мл КЖ), а наибольшее содержание ИУК было обнаружено в КЖ штаммов *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и *B. thuringiensis* В-5351 и изолята *Bacillus* sp. Stl7 (310-580 нг/мл КЖ). АБК продуцировал только один изолят *Bacillus* sp. Stl7 (40 нг/мл КЖ).

Восемь штаммов и изолятов рода *Bacillus* (все кроме *B. thuringiensis* В-5689) были протестированы на наличие генов липопептид-синтаз (рис. 1, А). 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. 1, А). Дополнительно у штамма *B. subtilis* 26Д был обнаружен ген итурин-синтазы А (рис. 1, А). У штаммов *B. subtilis* 11ВМ, *B. subtilis* Ttl2 и изолята *Bacillus* sp. Stl7 были обнаружены гены биосинтеза итурина и фенгицина (рис. 1, А). Дополнительно у штамма *B. subtilis* 11ВМ был обнаружен ген сурфактин-синтазы (рис. 1, А). У штамма *B. thuringiensis* В-6066 были обнаружены гены биосинтеза сурфактина и фенгицина (рис. 1, А).

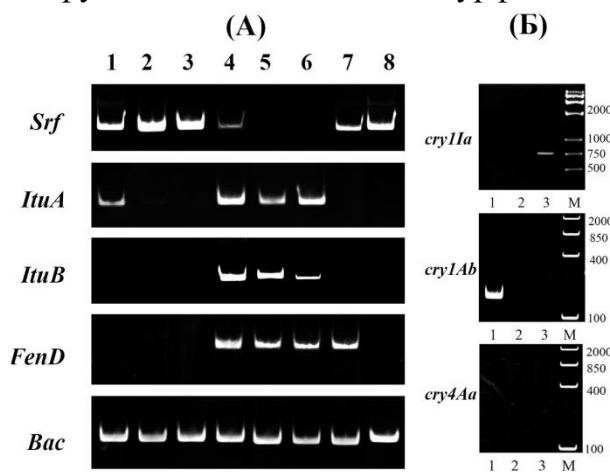


Рис. 1. ПЦР анализ бактерий рода *Bacillus* на наличие генов, кодирующих липопептид-синтазы: *Srf* – сурфактин-синтазу, *ItuA* и *ItuB* – итурин-синтазы, и *FenD* – фенгицин-синтазу, *Bac* – референсный ген (А) и на наличие генов кодирующих Cry-белки: *BtcryIIa*, *BtcryIAb*, *Btcry4Aa* (Б). Обозначения на рисунке: (А): 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. (Б): 1 – *B. thuringiensis* В-6066; 2 – *B. thuringiensis* В-5689; 3 – *B. thuringiensis* В-5351; М – ДНК-маркеры, 100–5000 п.н.

Три штамма *B. thuringiensis* В-5689, В-5351 и В-6066 были протестированы на наличие генов Cry-белков (рис. 1, Б). На основании предыдущих исследований других авторов (Pogcar et al., 2009) для проверки штаммов *B. thuringiensis* в данной работе были выбраны три гена, кодирующие белки CryIIa, Cry4Aa и CryIAb, вызывающие смертность тлей до 100% (рис. 1, Б). У штамма *B. thuringiensis* В-5351 был обнаружен ген *BtcryIIa*, у штамма *B. thuringiensis* В-6066 был обнаружен ген *BtcryIAb* (рис. 1, 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 (рис. 1, Б), кроме того, эффект этого штамма на *S. graminum* уже был изучен (Веселова и др., 2019), поэтому в дальнейшую работу его не взяли.

С помощью ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) в ЛБФ клеточного фильтрата двух штамов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ было показано содержание ЛП, которые соответствовали коммерческим ЛП – сурфактину (рис. 2, Б) и итурину (рис. 2, Е), соответственно. Это были основные ЛП этих штаммов. Ранее в

других исследованиях также проводился геномный анализ штаммов на наличие генов ЛП-синтаз, который совпал с результатами ВЭЖХ (Rodriguez et al., 2018).

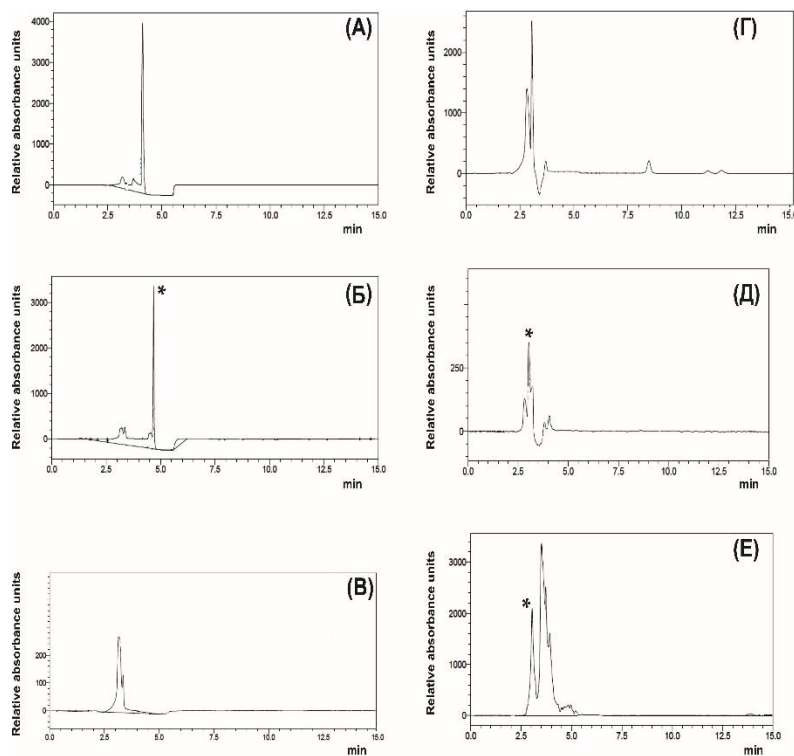


Рис. 2. Хроматографические профили ВЭЖХ-анализа препаратов бактериальных липопептидов ($\lambda=210$ нм). (А) - коммерческий сурфактин (Sigma-Aldrich, США; 0.1 мг/мл); (Б) и (Д) - липопептид-содержащая фракция культуральной жидкости *B. subtilis* 26Д; (Г) – коммерческий итурин (Sigma-Aldrich, США; 0.1 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 итурину (Д, Е).

Предполагается, что продукция ЛП и фитогормонов может играть важную роль в полезных свойствах бактерий для защиты растений от вредителей и что недостатки отдельных штаммов можно исправить при составлении бактериальных смесей. Однако для составления бактериальных композиций важно разработать принципы, по которым будут составлены смеси для дальнейшего применения. Все эндофиты, изученные в данной работе, являются перспективными для создания композиций. Было выбрано шесть штаммов и изолятов для составления смесей (табл. 1).

Таблица 1 Антагонистическая активность штаммов и изолятов рода *Bacillus*

Штамм	Расстояние от колонии антагониста, мм					
	Антагонист					
	Bs26Д	Bs11ВМ	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
Bs11ВМ	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; Bs11ВМ – *B. subtilis* 11ВМ; BsTtl2 – *B. subtilis* Ttl2; BStl7 – *Bacillus* sp. Stl7; Bth B-5351 – *B. thuringiensis* B-5351; Bth B-6066 – *B. thuringiensis* B-6066.

При комбинации штаммов бактерий в одном препарате необходимым свойством каждого из них является отсутствие антагонизма между собой. Было выявлено, что изученные штаммы проявляли умеренную антагонистическую активность по

отношению друг к другу, исключение составил штамм *B. thuringiensis* В-6066, рост которого подавляли практически все штаммы (табл. 1).

Другим важным свойством для составления бактериальных композиций является эндофитность штамма. Было составлено две смеси из штаммов, которые не подавляли, либо слабо подавляли друг друга при совместном росте (*B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351) и (*B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ), соответственно (табл. 1). Причем один штамм обладал высокой эндофитностью (*B. subtilis* 26Д), а другой штамм в смеси изначально обладал низкой эндофитностью (*B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-5351) (табл. 2).

Таблица 2 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 $p \leq 0.05$.

Но как показали результаты, при совместной обработке растений пшеницы бактериальными композициями количество КОЕ у низко эндофитных штаммов увеличивалось, особенно в побегах (табл.2), что было определено с помощью высева бактерий на селективные среды или с помощью RAPD анализа (Rumyantsev et al., 2023). 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. В настоящее время предполагается, что увеличению проникновения бактериальных клеток во внутренние ткани растений мог способствовать сурфактин или экзополисахариды, гидролитические ферменты (Сорокань и др., 2019; Oukala et al., 2021, Zhaogao et al., 2022). Таким образом, 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 Cry-белки, в отличие от штаммов *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В5351, соответственно (рис. 1). Предполагается, что при применении композиций может появиться аддитивный эффект.

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

Известно, что бактерии рода *Bacillus* проявляют инсектицидную активность благодаря своим метаболитам, ЛП, Cry-белкам и др. (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 (от 66.7 до 78.5% смертности) по отношению к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* (табл. 3, табл. 4).

Высокую афицидность показали не только штаммы синтезирующие Cry-белки, но и штаммы синтезирующие ЛП (табл. 3, табл. 4).

Таблица 3 Афицидность штаммов и изолятов рода *Bacillus*, рекомбинантных линий и их ЛБФ на 5-е сутки кормления тлей

Вариант обработки бактериальными штаммами	Смертность тли, %	Вариант обработки метаболитами	Концентрация, мкг/мл	Смертность тли, %
Вода	6.9 ± 1.7a	Вода	-	6.9 ± 1.7a
<i>B. subtilis</i> 26Д	66.7 ± 6.9b	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д	2.5	28.1 ± 2.1b
			25	51.8 ± 5.3c
			100	84.2 ± 6.5d
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	72.3 ± 8.1c	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.5	21.6 ± 1.8b
			25	52.2 ± 6.2c
			100	79.6 ± 5.8d
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	76.7 ± 9.3d	ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	2.5	18.3 ± 1.7b
			25	68.2 ± 5.1e
			100	100.0 ± 5.0f
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	73.3 ± 8.8c	ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.5	13.5 ± 1.5g
			25	45.3 ± 2.8c
			100	100.0 ± 4.7f
<i>B. thuringiensis</i> В-6066	76.8 ± 8.7d	ЛБФ <i>B. thuringiensis</i> В-6066	2.5	21.5 ± 2.6b
			25	56.7 ± 3.9c
			100	100.0 ± 4.8f
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp-	9.1 ± 1.4a	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Дsfp-	2.5	7.0 ± 2.2a
			25	11.1 ± 1.9g
			100	27.2 ± 2.5b
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	82.6 ± 7.2c	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	2.5	31.1 ± 2.3b
			25	59.1 ± 5.4c
			100	88.4 ± 7.3d

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. у пяти из них были выделены ЛБФ и изучены их свойства, в том числе афицидность (табл. 3). Как показали результаты, ЛБФ увеличивали смертность тли при прямом воздействии. 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). У большинства штаммов и изолятов концентрация ЛБФ 100 мкг/мл вызывала 100% смертность вредителя (табл. 3). Таким образом, афицидность бактериальных штаммов проявлялась благодаря синтезу ими ЛП. Ограничение синтеза сурфактина в рекомбинантной линии *B. subtilis* 26Дsfp⁻ сильно уменьшало афицидность штамма *B. subtilis* 26Д, кроме того ЛБФ из *B. subtilis* 26Дsfp⁻ не влияла на смертность тли, что доказывает роль сурфактина в афицидности (табл. 3). Об афицидной активности сурфактина против других видов тлей сообщалось недавно (Yang et al., 2017; Denoirjean et al., 2021). Встраивание CryIIa белка в линию *B. subtilis* 26ДCryChS повышало ее афицидность на 16% по сравнению с материнским штаммом

(табл. 3). Причем ЛБФ из рекомбинатной линии и материнского штамма показали одинаковую афицидность (табл. 3), что указывает на сильный афицидный эффект CryIIa.

Таблица 4 Афицидность штаммов рода *Bacillus* и их композиций на 5-е сутки кормления тлей

Бактериальные штаммы и их композиции	Афицидность штаммов и их композиций, % смертности тли
<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-5351 + <i>B. subtilis</i> 26Д	82.9 ± 9.1b
<i>B. thuringiensis</i> B-5351 + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	80.4 ± 6.4b
<i>Bacillus</i> sp. Stl7 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	72.5 ± 7.3c
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Bacillus</i> sp. Stl7	68.0 ± 4.9c
<i>B. thuringiensis</i> B-5351 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	71.4 ± 5.3c

Примечание: Латинские буквы показывают статистические различия согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Таблица 5 Афицидность композиции двух штаммов *B. subtilis* и их ЛБФ

Бактериальная композиция	Смертность тли, %	Композиция ЛБФ	Концентрация, мкг/мл	Смертность тли, %
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	77.0 ± 9.4a	ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.0 + 1.5	32.5 ± 1.9a
			8 + 6	50.2 ± 5.2b
			64 + 48	100 ± 6.8c

Примечание: Латинские буквы показывают статистические различия согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Все подобранные композиции бактериальных штаммов и изолятов проявили высокую афицидную активность и проявили аддитивный эффект (в смеси афицидность была больше, чем при индивидуальной обработке) (табл. 4). С помощью ЛБФ было доказано, что аддитивный афицидный эффект бактериальной композиции *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ проявлялся благодаря совместному действию двух ЛП сурфактина и итурина (табл. 5). Аддитивный эффект (смертность более 50% тлей) в композиции достигался с помощью более низких концентраций (8 + 6 мкг/мл), чем при применении индивидуальных ЛБФ (25 мкг/мл) (табл. 3, табл. 5).

Два типа устойчивости к тлям – антибиоз и выносливость и влияние на них бактерий, ЛБФ и их смесей

При подборе бактериальных штаммов в качестве будущих биоинсектицидов и составлении композиций важно сочетание двух свойств – стимуляции роста растений и индукции защитных механизмов. Однако механизмы обеспечивающие проявление этих свойств бактерий в одном штамме еще плохо изучены. Первоначально в работе были подобраны рост-стимулирующие концентрации. Для бактериальных суспензий рост-стимулирующие концентрации составили 1.0 – 2.0 мкл суспензии на 1г семян ($2 - 4 \times 10^6$ спор/мл), для ЛБФ - 1.5 – 2.5 мкг/мл (табл. 6). Обработка семян бактериальными

суспензиями и их ЛБФ в этих концентрациях повышала всхожесть, а также увеличивала прирост сырой и сухой биомассы растений.

Таблица 6 Опосредованное влияние бактериальных штаммов, ЛБФ и их смесей на жизнеспособность *S. graminum* и выносливость растений заселенных тлей

Вариант обработки	Рост-стимулирующие концентрации*	Выносливость растений		Опосредованное влияние
		Прирост 1-ого листа, %**	Прирост 2-ого листа, %**	Смертность, %
Вода	-	81.8 ± 6.2a	70.2 ± 5.1a	6.9 ± 1.7a
Бактериальные штаммы и изоляты				
<i>B. subtilis</i> 26Д	2.0	115 ± 7.3b	142 ± 12.9b	31.5 ± 2.2b
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.0	103.2 ± 5.6c	115.2 ± 9.2c	24.3 ± 3.4c
<i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	1.0	113.2 ± 8b	116.1 ± 5.8c	28.7 ± 1.4b
<i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.0	110 ± 6.6b	111.5 ± 4.7c	22.6 ± 1.1c
<i>B. thuringiensis</i> В-6066	2.0	103.6 ± 2.5c	121.3 ± 7d	36.3 ± 3.5d
<i>B. thuringiensis</i> В-5351	2.0	102.7 ± 4.8c	106.4 ± 5.7e	38.3 ± 4.0d
<i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0	107.8 ± 5.8c	122.5 ± 12d	22.4 ± 2.5c
<i>Bacillus</i> sp. Stl7	1.0	97.8 ± 4.6c	101.6 ± 9.5e	35.5 ± 3.8d
<i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻	2.0	82.9 ± 5.5a	78.8 ± 4.9a	1.83 ± 0.2e
<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	2.0	110 ± 4.6b	134.5 ± 14b	39.1 ± 3.7d
Липопептид богатая фракция (ЛБФ) штаммов и изолятов				
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д	2.5	106.7 ± 6c	102.0 ± 4.8e	24.9 ± 2.3c
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.5	98.1 ± 6.2c	102.3 ± 7.6e	20.9 ± 2.6cf
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas8.2	2.0	99.5 ± 3.6c	93.6 ± 5.4f	18.6 ± 4.9f
ЛБФ <i>Bacillus</i> sp. Tas1	2.5	113.0 ± 4b	100.0 ± 2.8e	14.1 ± 5.1f
ЛБФ <i>B. thuringiensis</i> В-6066	1.5	113 ± 8.2b	95.3 ± 3.1f	21.5 ± 3.9c
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Дsfp ⁻	2.5	80.4 ± 4.5a	84.0 ± 5.1g	6.90 ± 0.9a
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26ДCryChS	2.5	104.3 ± 5c	101 ± 3.2e	28.1 ± 2.7b
ЛБФ <i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	2.0 + 1.5	110.2 ± 5b	100.3 ± 3.8e	26.3 ± 3.1b
Бактериальные композиции				
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.5 + 0.5	1201 ± 6.8d	116.4 ± 8.7c	39.2 ± 2.6d
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 26Д	1.0 + 1.0	118.4 ± 6d	129 ± 7.4b	49.5 ± 3.5g
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> 11ВМ	1.0 + 1.0	113.3 ± 6b	119.9 ± 8.1d	39.3 ± 2.9d
<i>Bacillus</i> sp. Stl7 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0 + 1.0	107.0 ± 7.9c	115.3 ± 9.8c	50.1 ± 3.1g
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Bacillus</i> sp. Stl7	1.0 + 1.0	102.6 ± 5.9c	104.2 ± 10e	57.2 ± 5.2h
<i>B. thuringiensis</i> В-5351 + <i>B. subtilis</i> Ttl2	1.0 + 1.0	117.5 ± 8d	112.8 ± 6.9c	28.6 ± 3.2b

Примечание: *Объяснения в тексте. **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 $p \leq 0.05$.

В большинстве композиций простое сложение рост-стимулирующих концентраций не приводило к увеличению энергии прорастания семян, а уменьшение рост-стимулирующей концентрации индивидуального штамма в 1.5 или 2 раза приводило к стимуляции прорастания в смеси. В дальнейшей работе были

использованы подобранные концентрации, стимулировавшие прорастание семян (табл. 6).

Затем было изучено влияние бактерий на индукцию защитных механизмов растений, которое складывается из повышения выносливости (толерантности) растений к насекомым, заключающейся в скорости восстановления ростовых процессов и из опосредованного через растения снижения жизнеспособности злаковой тли (антибиоз), питающейся на обработанных бактериями растениях (Rashid, Chung, 2017; Luo et al., 2022). Установлена низкая выносливость растений пшеницы сорта СЮ по отношению к *S. graminum*, которая проявлялась в торможении роста 1-ого и 2-ого листьев (табл. 6). Предпосевная обработка семян пшеницы бактериальными штаммами или их композициями 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. 6). У одной композиции *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 был обнаружен аддитивный рост-стимулирующий эффект (табл. 6). Рекомбинантная линия *B. subtilis* 26ДСryChS влияла на рост листьев примерно также как материнский штамм *B. subtilis* 26Д, следовательно, CryIIa белок не влиял на рост-стимулирующие свойства штамма (табл. 6). Рекомбинантная линия *B. subtilis* 26Дsfp⁻ дефицитная по синтезу сурфактина теряла способность к стимуляции роста, ЛБФ *B. subtilis* 26Дsfp⁻ также не стимулировала рост листьев растений заселенных тлей, (табл. 6), что доказывает влияние сурфактина на рост-стимулирующие свойства бактериальных штаммов. ЛБФ пяти штаммов и изолятов повышали выносливость растений к вредителю, но в меньшей степени, чем сами бактериальные штаммы и изоляты. (табл. 6).

Кроме того, показано, что обработка растений бактериальными штаммами и изолятами увеличивала смертность тлей с 6.9 до 38.3% (табл. 6). 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. 6), что подтверждает гипотезу об аддитивном эффекте смесей и улучшении свойств одного штамма другим. Рекомбинантная линия *B. subtilis* 26ДСryChS усилила свое влияние на смертность тли по сравнению со штаммом *B. subtilis* 26Д, что предполагает роль CryIIa белка в опосредованном влиянии на показатели жизнеспособности тли (табл. 6). Роль сурфактина в опосредованном влиянии на показатели жизнеспособности тли была доказана обработкой растений линией *B. subtilis* 26Дsfp⁻, которая не увеличивала смертность злаковой тли кормившейся на таких растениях (табл. 6). Обработка растений ЛБФ пяти бактериальных штаммов в рост-стимулирующих концентрациях увеличивала смертность тлей с 6.9 до 25%, что подтверждает роль ЛП в опосредованном влиянии на показатели жизнеспособности тли (табл. 6).

Действие ЛП на выносливость растений, скорее всего, было косвенным и связанным с влиянием ЛП на подвижность бактерий и способность проникновения

бактерий при заселении растений (Raaijmakers et al., 2010; Сорокань и др., 2019), а также связанным с прямым афицидным эффектом ЛП, который способствует уменьшению нагрузки вредителя на растение. А опосредованное влияние бактерий на показатели жизнеспособности злаковой тли, скорее всего, было связано с индукцией системной устойчивости и элиситорной ролью бактериальных метаболитов (Oukala et al., 2021; Santoyo, 2022). Таким образом, рост-стимулирующие концентрации оказались иммуномодулирующими.

Индукция защитных реакций растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *S. graminum* бактериями *Bacillus* spp. их композициями и ЛБФ

Защитные реакции при развитии системной индуцированной устойчивости (СИУ), опосредованной бактериями, обычно характеризуются ранним накоплением активных форм кислорода (АФК), в том числе перекиси водорода (H_2O_2), изменением активности ферментов про-/антиоксидантной системы, накоплением защитных PR-белков и синтезом вторичных метаболитов (Oukala et al., 2021). Заселение контрольных растений пшеницы сорта СЮ тлями приводило к уменьшению содержания H_2O_2 , отсутствию повышения активности пероксидазы и повышению активности каталазы по сравнению с контролем через 24 и 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3) и сопровождалось низкой смертностью тлей и низкой выносливостью растений (табл. 6). Предпосевная обработка семян пшеницы бактериальными штаммами и их композициями привела к резкому накоплению H_2O_2 , увеличению активности пероксидазы и снижению активности каталазы в листьях пшеницы, колонизированных *S. graminum*, что, возможно, обусловило устойчивость таких растений к вредителю (рис. 3).

Для изучения влияния бактериальных композиций на индукцию иммунных реакций в растениях против тли были выбраны три смеси: *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ (ком. №1), *B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* В-5351 (ком. №2) и *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 (ком. №3). Во-первых, эти три смеси проявили наибольшую афицидную активность среди всех композиций и показали аддитивный эффект (табл. 4). Во-вторых, бактериальные штаммы ком. №1 синтезировали ЛП сурфактин + итурин и гормоны ЦК + ауксины; бактериальные штаммы ком. №2 синтезировали сурфактин и инсектотоксичный белок Cry1Ia, а также ЦК + ауксины; бактериальные штаммы ком. №3 синтезировали итурин + Cry1Ia и ауксины. В третьих, ком. №3 показала аддитивный эффект при влиянии на выносливость растений пшеницы к тле (табл. 6), а ком. №1 и ком. №2 проявили аддитивный эффект при опосредованном влиянии на смертность тли (табл. 6). Все три смеси проявили аддитивный эффект при влиянии на накопление H_2O_2 и активность пероксидаз через 72 часа после заселения растений тлей (рис. 3).

Чтобы доказать влияние ЛП на индукцию иммунных реакций растений было исследовано влияние ЛБФ трех штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B.*

thuringiensis B-6066, синтезирующих сурфактин, итурин и смесь фенгицина и сурфактина, соответственно, чтобы доказать аддитивный эффект смеси сурфактина + итурина была изучена смесь ЛБФ двух штаммов *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ (ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ) (рис. 3).

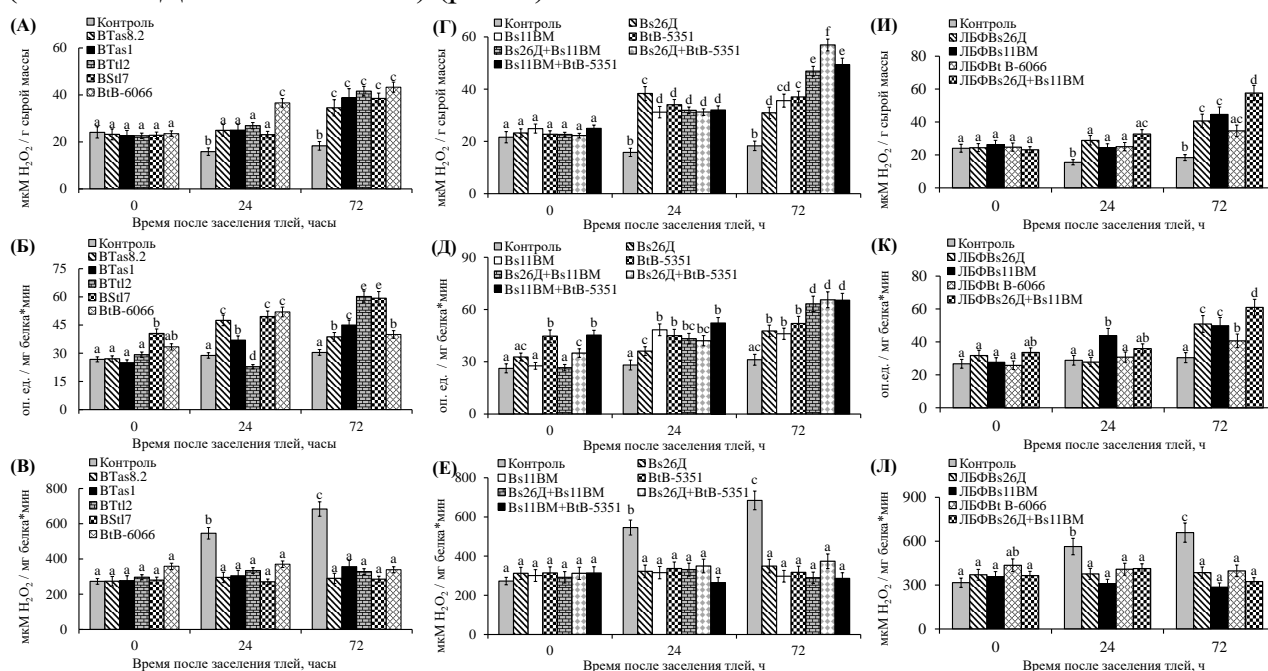


Рис. 3. Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Vacillus* spp. (А, Б, В), бактериальных композиций (Г, Д, Е) и ЛБФ и смеси ЛБФ (И, К, Л) на содержание H_2O_2 (А, Г, И), активность пероксидазы (Б, Д, К) и каталазы (В, Е, Л) в растениях пшеницы заселенных *S. graminum*. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Влияние отдельных ЛБФ и смеси ЛБФ на компоненты про-/антиоксидантной системы растений пшеницы заселенных *S. graminum* было сходным с влиянием самих штаммов на эти процессы (рис. 3). Бактериальная композиция *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ проявила аддитивный эффект при влиянии на редокс-статус растений заселенных тлей (рис. 3). Аддитивный эффект также был обнаружен при влиянии композиции ЛБФVs26Д + ЛБФVs11ВМ на эти показатели у растений пшеницы заселенных злаковой тлей (рис. 3), что предполагает аддитивный эффект двух ЛП сурфактина и итурина.

Также была изучена экспрессия генов PR-белков, регулируемая фитогормонами салициловой (СК), жасмоновой (ЖК) кислотами и этиленом, играющими важную роль в регуляции иммунитета растений против вредителей (Rashid, Chung, 2017). Наши результаты показали, что после заселения тлей у средневосприимчивого сорта СЮ активировался ЖК/этилен-сигнальный путь – содержание мРНК генов *PR3*, *PR6* и *PR9* через 72 часа после начала эксперимента повышалось, а транскрипция гена, кодирующего PR1 белок снижалась (рис. 4). Предпосевная обработка бактериальными штаммами *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ приводила к индукции СК/этиленового-сигнальных путей (накапливались транскрипты генов *PR1*, *PR9* и *PR3*), а обработка

штаммом *B. thuringiensis* В-5351 индуцировала ЖК/этилен-сигнальные пути (накапливались транскрипты генов *PR3* и *PR6*, *PR9*) у растений заселенных тлей (рис. 4).

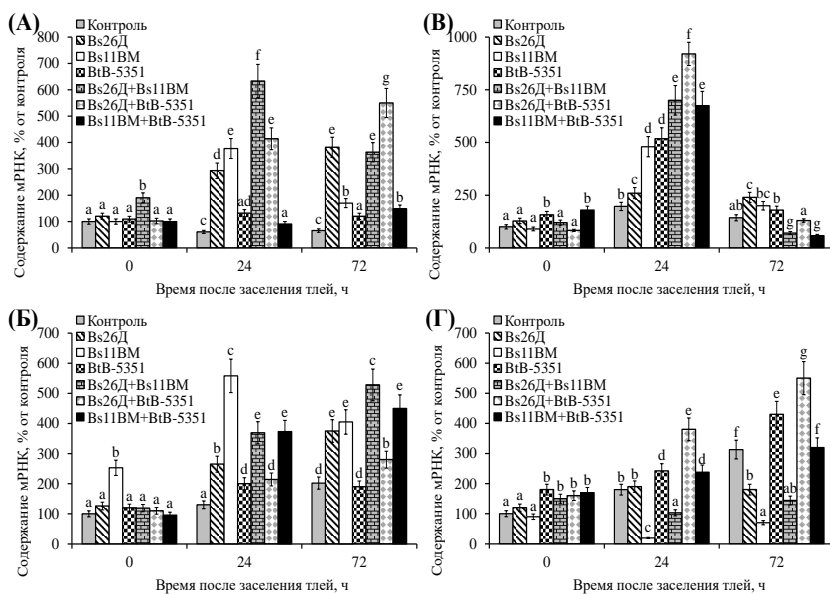


Рис. 4. Влияние бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-5351 и их композиций на транскрипционную активность генов, кодирующих PR-белки пшеницы, маркеры СК-пути *PR1* (А), *PR9* (Б), этиленового-пути *PR3* (В) и ЖК-пути *PR6* (Г) и *PR9* (Д) у заселенных *S. graminum* растений пшеницы. Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

Бактериальная композиция *B. subtilis* 26Д + *B. subtilis* 11ВМ, как и индивидуальные штаммы индуцировала гены СК/этиленового-сигнальных путей (накапливались транскрипты генов *PR1*, *PR9* и *PR3*), проявляя при этом аддитивный эффект в силе индукции (рис. 4). Бактериальная композиция *B. subtilis* 11ВМ + *B. thuringiensis* В-5351 значительно индуцировала ЖК/этилен-сигнальные пути (накапливались транскрипты генов *PR3* и *PR6*, *PR9*), как штамм *B. thuringiensis* В-5351, и не запускала экспрессию маркера СК-пути гена *PR1*, как штамм *B. subtilis* 11ВМ (рис. 4). 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, проявляя как количественный, так и качественный аддитивный эффект (рис. 4). Характер влияния ЛБФ на экспрессию *PR*-генов был сходным с влиянием штаммов на этот показатель (табл. 7).

Таким образом, результаты данной работы показали, что бактериальные штаммы индуцировали экспрессию защитных *PR*-генов у растений, заселенных тлей, благодаря синтезу ими ЛП. 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 (рис. 4, табл. 7), что подтверждает роль ЛП во влиянии на аддитивные эффекты смесей.

Анализ опосредованного влияния рекомбинантных линий *B. subtilis* 26Дsfp- и *B. subtilis* 26ДCryChS показал возможность наличия элиситорного эффекта у сурфактина и CryIIa белка. Для проверки этого утверждения было изучено влияние этих линий на редокс-статус и экспрессию *PR*-генов растений пшеницы заселенных тлей (рис. 5).

Предпосевная обработка семян пшеницы рекомбинантной линией *B. subtilis* 26Дsfp^r не влияла на генерацию H₂O₂ и активность пероксидазы и каталазы и не приводила к накоплению мРНК изученных PR-генов у растений пшеницы заселенных тлей (рис. 5). Эти результаты говорят об элиситорной роли сурфактина и его влиянии на иммунную систему растений. Предпосевная обработка семян пшеницы линией *B. subtilis* 26ДCryChS влияла на редокс-показатели так же как обработка штаммом *B. subtilis* 26Д (рис. 5).

Таблица 7 Влияние ЛБФ отдельно и в композиции на транскрипционную активность генов, кодирующих PR-белки пшеницы

Вариант обработки	Время кормления тли, сутки	Гены, содержание мРНК, % от контроля			
		<i>TaPR1</i>	<i>TaPR3</i>	<i>TaPR6</i>	<i>TaPR9</i>
Контроль	3	100 ± 5a	100 ± 6a	100 ± 3a	100 ± 7a
	6	100 ± 4a	100 ± 5a	100 ± 6a	100 ± 6a
<i>S. graminum</i>	3	66 ± 3b	200 ± 17b	270 ± 18b	180 ± 12b
	6	213 ± 15c	303 ± 31c	167 ± 12c	203 ± 17b
ЛБФ <i>Bs</i> 26Д	3	535 ± 38d	192 ± 13b	178 ± 12c	366 ± 33c
	6	277 ± 21e	420 ± 34d	111 ± 9a	405 ± 41d
ЛБФ <i>Bs</i> 11ВМ	3	132 ± 9f	402 ± 39d	100 ± 5a	208 ± 17b
	6	230 ± 14c	430 ± 41d	78 ± 4d	130 ± 11e
ЛБФ <i>Bt</i> В-6066	3	129 ± 8f	291 ± 19c	436 ± 39e	123 ± 10e
	6	67 ± 6b	450 ± 40e	380 ± 28f	390 ± 32d
ЛБФ <i>Bs</i> 26Д + ЛБФ <i>Bs</i> 11ВМ	3	450 ± 42g	517 ± 42f	190 ± 12c	267 ± 18f
	6	550 ± 35d	550 ± 47f	180 ± 11c	680 ± 57g

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

Однако обработка растений линией *B. subtilis* 26ДCryChS приводила к повышению содержания мРНК всех исследуемые PR-генов (*PR1*, *PR3*, *PR6* и *PR9*), т.е. запускала СК/этилен-сигнальные пути, как штамм *B. subtilis* 26Д, и ЖК/этилен-сигнальные пути, как штамм *B. thuringiensis* В-5351 (рис. 5).

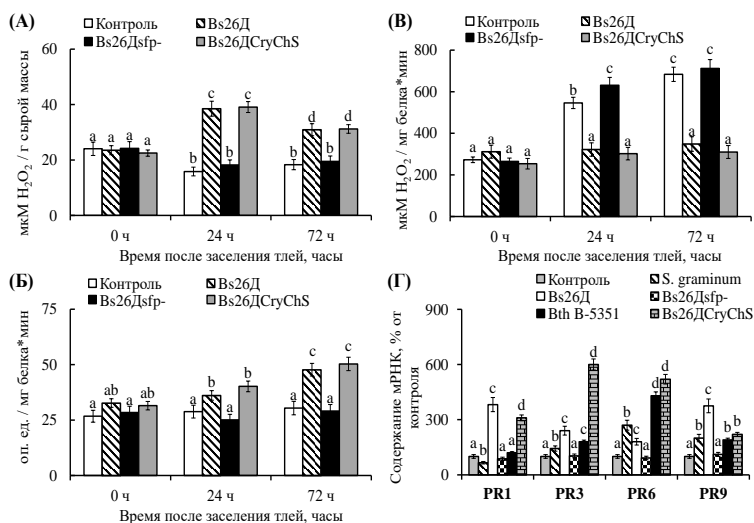


Рис. 5. Влияние бактериального штамма *B. subtilis* 26Д и рекомбинантных линий *B. subtilis* 26Дsfp^r и *B. subtilis* 26ДCryChS на содержание H₂O₂ (А), активность пероксидазы (Б) и каталазы (В) в заселенных *S. graminum* растениях пшеницы, а также транскрипционная активность PR-генов, пшеницы через 72 часа после заселения растений вредителем (Г). Значения на каждой гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$.

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.

Известно, 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; Rashid, Chung, 2017). Кроме того, фитогормоны СК и ЖК не показали признаков отрицательного перекрестного влияния при активации защитных реакций против тлей (Serteyn et al., 2020). А активация сигнального пути этилена была необходима для запуска устойчивости растений к тлям с помощью полимеризации лектиновых белков флоэмы (Fu et al., 2014; Lu et al., 2023). Несмотря на появляющиеся новые результаты основные молекулярные и химические механизмы защиты растений от тлей остаются неясными (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

Таким образом, в ходе работы было охарактеризовано девять штаммов и изолятов рода *Bacillus* из коллекции ИБГ УФИЦ РАН, показана афицидность и элиситорная активность ЛП сурфактина, итурина и фенгицина и *CryIIa* белка. В ходе работы были сформулированы принципы создания комплексных биопрепаратов на основе смеси бактериальных штаммов, изучено шесть бактериальных композиций, которые 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* 26ДС^{fr} 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 CryIIa 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 – афидицидность, 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ВХОДЯЩИЕ В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК МОН РФ

1. Maksimov I.V. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene BtcryIIa encoding CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. / 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 // *Biological Control*. 2020. V. 144. 104242. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104242 (Wos Q1, IF 3.857) – (Главы 1, 3).
2. 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. Rummyantsev, V. Alekseev, I. Mardanshin, E. Sarvarova, R. Khairullin, G. Benkovskaya and I. Maksimov // *Front. Microbiol.* 2020. 11:569457. doi: 10.3389/fmicb.2020.569457 (Wos Q1, IF 6.064) – (Главы 2, 3).
3. Veselova 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 / V. Veselova, A. Sorokan, G. Burkhanova, S. Rummyantsev, E. Cherepanova, V. Alekseev, E. Sarvarova, A. Kasimova, I. Maksimov // *Biomolecules*. 2022. V. 12(2). P. 288. doi: 10.3390/biom12020288. (WOS Q2, Scopus Q1. IF 6.064) – (Глава 3).
4. Rummyantsev 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. Rummyantsev, V.Y. Alekseev, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, E.A. Cherepanova, R.R. Garafutdinov, I.V. Maksimov, S.V. Veselova // *Life*. 2023. V. 13. 214. doi: 10.3390/life13010214. (BAK, WOS Q2. IF 3.253) – (Главы 2, 3)
5. 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. (BAK, RSCI) – (Глава 3).
6. 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. (BAK, RSCI) – (Глава 3).
7. 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. (BAK, RSCI) – (Глава 3).

ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ (все, не входящие в ВАК)

8. 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. P. 1-5. doi: 10.1063/5.0071841. (Scopus). (Глава 3).
9. 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 (РИНЦ) – (Главы 2, 3).
10. Алексеев В.Ю. Повышение толерантности растений пшеницы к злаковым тлям бактериями рода *Bacillus* и их метаболитами / В.Ю. Алексеев, С.В. Веселова, С.Д. Румянцев, Г.Ф. Бурханова, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов // *Сборник статей по материалам VI Всероссийской конференции с международным участием «Экобиотех», Уфа, 1-4 октября 2019 г. Уфа, 2019. С. 11-15. – статья в сборнике.*

11. Алексеев В. Роль бактерий рода *Bacillus* и их метаболитов в регуляции защитного ответа растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.) / В. Алексеев, С. Румянцев, С. Веселова, Г. Бурханова, А. Касимова, И. Максимов // Экобиотех 2021. Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием, г. Уфа 4-7 октября 2021 г. Уфа: УИБ УФИЦ РАН, 2021. [Электронный ресурс: <http://ib.anrb.ru/eht2021/ecobiotech2021.pdf>]. С. 100-104. – статья в сборнике.
12. Алексеев В.Ю. Рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* дефицитный по продукции сурфактина теряет способность индуцировать устойчивость растений пшеницы к злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.) / В.Ю. Алексеев, С.В. Веселова, Д.К. Благова, Е.Р. Сарварова, Г.Ф. Бурханова, С.Д. Румянцев, А.Р. Касимова, И.В. Максимов // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов / отв. ред. И.А. Тихонович – 2020. с. 17. – тезисы.
13. Алексеев В.Ю. Рост-стимулирующая активность эндофитных бактерий рода *Bacillus* / В.Ю. Алексеев, С.В. Веселова, Е.Р. Сарварова, И.В. Максимов // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов / отв. ред. И.А. Тихонович – 2020. с. 18. – тезисы.
14. Alekseev V.Y. Lipopeptide producing endophytic bacteria of the genus *Bacillus* in the regulation of the expression of genes involved in the defense response of wheat against greenbug aphid *Schizaphis graminum* / V.Y. Alekseev, M.Yu. Shein, S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021): The 6th International Scientific Conference (June 14–18, 2021, Novosibirsk, Russia); Abstracts / Eds. A.V. Kochetov, E.A. Salina. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; – Novosibirsk: ICG SB RAS. 2021. P. 22. doi: 10.18699/PlantGen2021-006. – тезисы.
15. Алексеев В.Ю. Роль липопептидов бактерий рода *Bacillus* в регуляции защитного ответа растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.) / В.Ю. Алексеев, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, С.Д. Румянцев, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // Материалы V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (25 - 29 апреля 2022). СПб.: БИН РАН, 2022. С. 100. – тезисы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода; ЖК – жасмоновая кислота; КАТ – каталаза; ПО – пероксидаза; СИУ – системная индуцированная устойчивость; СК – салициловая кислота; СРРБ - стимулирующие рост растений бактерии; ФБ – Na-фосфатный буфер; ЦК – цитокинины; PR-белки – патоген-индуцированные белки.