

УДК 632.937:579.64:579.26

БАКТЕРИИ РОДА *Bacillus* В РЕГУЛЯЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕ *Schizaphis graminum* Rond.

© 2019 г. С. В. Веселова¹, *, Г. Ф. Бурханова¹, С. Д. Румянцев¹, Д. К. Благова¹, И. В. Максимов¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа 450054, Россия

*e-mail: veselova75@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.02.2018 г.

После доработки 14.07.2018 г.

Подписано в печать 25.07.2018 г.

Обнаружена способность бактерий *Bacillus subtilis* Cohn. (штамм 26Д) и *Bacillus thuringiensis* Berliner (штаммы В-6066 и В-5689) подавлять жизнедеятельность обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* Rond. Защитный эффект изученных штаммов *Bacillus* spp. проявлялся в прямой афицидной активности и в опосредованной индукции системной устойчивости в растениях посредством регуляции генерации перекиси водорода, активности пероксидазы и каталазы. Анализ накопления транскриптов генов белков защитного ответа НАДФН-оксидазы, ингибиторов протеиназ (PR-6) и пероксидазы (PR-9), показал, что штаммы *B. thuringiensis* индуцировали гены жасмонат-зависимого, а штамм *B. subtilis* — салицилат-зависимого сигнальных путей. Обнаружено аддитивное влияние композиции изученных штаммов *Bacillus* spp. на устойчивость пшеницы к вредителю, что предполагает возможность создания на их основе биопрепарата против злаковой тли.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Schizaphis graminum*, *Triticum aestivum* L., системно индуцированная устойчивость, редокс-метаболизм, транскрипционная активность генов

DOI: 10.1134/S0555109919010185

Среди насекомых-вредителей, наносящих значительный ущерб сельскому хозяйству, на долю отряда Полужесткокрылые (*Hemiptera*), куда относится обыкновенная злаковая тля (*Schizaphis graminum* Rond.), приходится очень много экономически важных вредителей [1, 2]. Меры борьбы против тли ограничиваются использованием системных высокотоксичных инсектицидов, а при применении биопрепаратов на основе стимулирующих рост растений бактерий (СРРБ) (PGPB, plant growth promoting bacteria) возникают некоторые трудности, разрешить которые возможно, как предполагается, только посредством использования эндофитных штаммов бактерий, (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.) [3, 4]. Среди представителей рода *Bacillus* идентифицировано много эндофитных штаммов [4, 5], обладающих такими свойствами как фунгицидная и стимулирующая рост растений активности [6], синтез антибиотиков и биосурфактантов [6], запуск системной индуцированной устойчивости (СИУ) против патогенов и вредителей [6, 7], а также инсектицидная и афицидная активности [4, 8]. Так, более 80 лет бактерии *Bacillus thuringiensis* используются как эффективные регуляторы численности насекомых, благодаря синтезу δ -эндотоксинов (Cgt и Cyt) [9]. Ряд штаммов этого вида обладает, в том числе, афицидной активностью [10]. Обнаружены штаммы *B. thuringiensis*, запускающие в расте-

ниях СИУ к патогенам [11] и характеризующиеся определенной степенью эндофитности [12]. Однако вопрос о механизмах и метаболических путях этой индукции остается пока открытым. Вместе с тем, у ряда широко известных активаторов устойчивости растений к патогенам штаммов бактерий *B. subtilis* обнаружены инсектицидная активность и способность к усилению устойчивости растений к вредителям [8, 13], но такие работы немногочисленны.

Разработка биопрепаратов на основе СРРБ нацелена на комплексную защиту растений от широкого спектра патогенов и вредителей [5, 6], заключающуюся в прямом, непосредственном биоцидном воздействии бактерий, а также в их способности опосредованно усиливать рост растений и индуцировать системную устойчивость [5, 6]. Поскольку штаммы, используемые в качестве действующего начала биопрепаратов, характеризуются высокой специализацией, задача по комплексной защите растений от патогенов и вредителей эффективно решается путем создания композиций из различных штаммов или видов микроорганизмов [14]. Вместе с тем, механизмы аддитивного защитного действия композиций СРРБ на устойчивость растений до конца не раскрыты, но предполагается, что решающее значение в этом может иметь независимая индукция

различных гормональных сигнальных путей в растениях [14]. Известно, что системно приобретенная устойчивость (СПУ) развивается по салицилат (СК)-зависимому пути и направлена против биотрофных и гемибитрофных патогенов. СИУ, запускаемая СРРБ, развивается по жасмонат (ЖАК)/этилен-зависимому пути и направлена против некротрофов и вредителей, причем ЖАК-сигнальный путь считается основным в защите растений против насекомых-вредителей [6, 14]. Ранее было показано [3], что композиция трех штаммов рода *Bacillus*, аддитивно индуцировала как СК-, так и ЖАК-зависимые гены защитного ответа, формирующие устойчивость растений пшеницы к гемибитрофному патогену *Seporia nodorum* Berk.

Цель работы — изучение формирования механизмов устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* под влиянием штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* B-6066 и B-5689 и их композиций.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Обыкновенную злаковую тлю (*Schizaphis graminum* Rond.) для экспериментов размножали на молодых проростках мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Салават Юлаев (селекция Башкирского государственного аграрного университета, Россия), выращенных в изолированных сосудах с прогретой при 180°C почвой в климатической камере КС-200 СПУ (“Смоленский СКТБ СПУ”, Россия) с 16-часовым световым периодом при температуре 20/24°C (ночь/день), интенсивность света 146 Вт/м² (лампы Osram L 36W/77, Германия). Семена пшеницы предоставлены авторами сорта В.А. Зыкиным и Р.К. Кадиковым.

В экспериментах использовали штаммы *B. thuringiensis* (B-6066) и *B. thuringiensis* (B-5689), полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), а также штамм *B. subtilis* 26Д, выделенный из коммерческого биопрепарата Фитоспорин—М (“Башинком”, Россия). Штаммы выращивали на среде Лурия—Бертани (%), бактотриптон — 1.0, дрожжевой экстракт — 0.5, NaCl — 0.5) в ротационном инкубаторе при 200 об./мин и 28°C в течение 72 ч до полной споруляции. Семена пшеницы сорта Салават Юлаев перед посадкой обрабатывали суспензией клеток бактерий полусухим способом из расчета 20 мкл суспензии с конечным титром 10⁸ кл./мл на 1 г семян. Варианты опыта включали обработку семян каждым штаммом в отдельности и в композиции. Соотношение бактерий в композиции было подобрано заранее, как описано в работе [15].

Для экспериментов семисуточные проростки пшеницы, выращенные в климатической камере

КС-200 СПУ (“Смоленский СКТБ СПУ”, Россия) в условиях размножения обыкновенной злаковой тли, в изолированных пластиковых сосудах емкостью 1 л по 50–70 растений в 400 мл 10%-ного раствора Хогланда—Арнона на плотиках, обернутых стерильной фильтровальной бумагой, заселялись тлями. Для этого одинаковое количество тлей разных возрастов стряхивали в каждый сосуд с растениями так, чтобы нагрузка на одно растение составляла 10 особей тли [16]. Во избежание миграции тлей сосуды накрывались пластиковыми изоляторами, затянутыми пористым нетканым материалом.

Тест на антибиоз. В изолированных сосудах объемом 500 мл в 100 мл 10%-ного раствора Хогланда—Арнона на пластиковом плотике, обернутом стерильной фильтровальной бумагой, выращивалось по 5 растений одного варианта опыта в условиях, описанных для размножения обыкновенной злаковой тли. На трехсуточные всходы под изоляторы подсаживали личинок первого возраста из расчета 1 особь на растение. Через 28 сут подсчитывали абсолютное количество живых тлей, а также число погибших взрослых особей и личинок [16]. Коэффициент размножения рассчитывали по формуле: K = средняя плодовитость самки за время опыта/продолжительность опыта в днях [16]. Плодовитость и смертность выражали в % от общего количества тлей.

Тест на афицидность бактериальных штаммов. Отрезанные первые листья 7-суточных проростков пшеницы помещали в стеклянные пробирки на 50 мл с 5 мл бактериальной суспензии исследуемого штамма в концентрации 10⁷ спор/мл. Контрольные пробирки содержали 5 мл стерильной воды. На каждый лист подсаживали по 10 бескрылых самок, пробирку закрывали ватной пробкой и помещали в условия, описанные для размножения обыкновенной злаковой тли. Через 5 сут в пробирках подсчитывали количество мертвых и живых тлей. Афицидность бактериального штамма по отношению к злаковой тле выражали в % смертности от общего числа тлей [12]. Коэффициент размножения при прямом воздействии бактериальной суспензии рассчитывали, как описано выше [16].

Тест на выносливость растений. Растения пшеницы исследуемых вариантов выращивали индивидуально в изолированных пластиковых сосудах объемом 500 мл в 100 мл 10%-ного раствора Хогланда—Арнона на пластиковом плотике, обернутом стерильной фильтровальной бумагой, в условиях описанных выше. В возрасте 3 сут измеряли длину проростков от уровня плотика до кончика листа, а затем каждое растение заселяли 20 бескрылыми самками и изолировали. Постоянную численность тлей поддерживали путем удаления через каждые 48 ч отрождающихся личинок в течение двух недель. В конце эксперимента прово-

Таблица 1. Исследованные гены мягкой яровой пшеницы

Номер последовательности в Генбанке	Обозначение гена	Продукт	Источник
AY561153	<i>TaRboh</i>	НАДФН-оксидаза	[18]
EU293132	<i>PR-6</i>	Ингибитор протеиназ	[19]
AK333699	<i>PR-9</i>	Анионная пероксидаза	[20]
AY059462	<i>RLI</i>	Ингибитор РНКаз	[21]
AB050957	<i>ARF</i>	Фактор АДФ-рибозилирования	[22]

дили повторное измерение высоты первого и второго листьев растений незаселенных и заселенных тлями, результаты сравнивали с первоначальным измерением [16].

Биохимические параметры. Измерение генерации пероксида водорода (H_2O_2) и активности ферментов пероксидазы (КФ 1.11.1.7) и каталазы (КФ 1.11.1.6) через 48 и 72 ч после заселения проростков пшеницы *S. graminum* проводили, как описано ранее [17].

Транскрипционная активность генов. Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных растений пшеницы проводили с использованием реагента “Trizol” согласно протоколу фирмы-поставщика (“Sigma”, Германия) из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 48 и 72 ч после заселения тлями. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли при A_{260}/A_{280} на спектрофотометре Smart Spec Plus (“Bio-Rad”, США). Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием М-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия).

Анализ экспрессии генов PR-белков проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе “iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System” (“BioRad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Изменения в экспрессии интересующего гена определяли на основании вычисления уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“BioRad”, США). Используемые в работе гены приведены в табл. 1.

Статическая обработка. Все эксперименты повторяли 3 раза и проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторностях (общее $n = 9$), кроме тестов на антибиоз и выносливость, где эксперименты включали в себя не менее 10 биологических повторов (общее $n = 30$). На рис. и в табл. приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы возрос интерес к СРРБ как альтернативе химических инсектицидов и удобре-

ний [4, 7, 14]. Однако эффективность действия биопрепаратов на основе СРРБ зависит от многих факторов, решающим из которых может оказаться эндофитность, особенно в случае борьбы с тлями. Если по отношению к ряду штаммов *B. subtilis* эндофитность доказана [5], то в отношении *B. thuringiensis* сведения такого рода ограничены. Так, показано, что выделенные из растений хлопчатника эндофитные штаммы бактерий *B. thuringiensis* циркулировали по флоэме, попадали в кишечник насекомых и действовали на них напрямую [23]. Изученные в данной работе бактериальные штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) обладали свойством эндофитности, что было показано нами ранее в работе [3].

В настоящей работе исследована способность бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) и их композиции влиять на жизнеспособность обыкновенной злаковой тли напрямую и опосредованно через растение. Тест на антибиоз показал, что плодовитость тлей, кормившихся на растениях пшеницы, обработанных клетками бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) и их композицией, уменьшалась на 12–27%, а смертность, соответственно, увеличивалась (табл. 2). Как и ожидалось, воздействие штаммов *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) на эти показатели было сильнее, чем штамма *B. subtilis* 26Д, а наилучший результат среди вариантов эксперимента показала композиция трех штаммов (табл. 2). Все использованные штаммы бацилл проявили афицидность по отношению к злаковой тле *S. graminum*, но в разной степени (табл. 2). Наибольшую афицидность к вредителю проявил штамм *B. thuringiensis* В-6066, вызывая смертность более 50% особей в популяции (табл. 2). Такие же результаты показала композиция трех штаммов и кроме того бактерии отрицательно влияли на коэффициент размножения вредителя (табл. 2). Предпосевная обработка семян пшеницы уменьшала коэффициент размножения тлей примерно в 2 раза, тогда как прямое воздействие суспензии бактериальных штаммов *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) и смеси трех штаммов приводило к полному прекращению размножения вредителя (табл. 2). Вместе с тем, хотя при прямом действии штамма *B. subtilis* 26Д коэффициент размножения тлей снижался почти

Таблица 2. Показатели выживаемости и размножения злаковой тли *S. graminum* под влиянием бактерий рода *Bacillus* и афицидность изученных штаммов *Bacillus* spp.

Показатели	Вариант обработки бактериями	<i>S. graminum</i>				
		вода	<i>B. subtilis</i> 26 Д	<i>B. thuringiensis</i> В-6066	<i>B. thuringiensis</i> В-5689	Композиция штаммов
Плодовитость, %	Предпосевная обработка семян	87.8 ± 1.9	75.5 ± 2.2	63.7 ± 3.5	66.9 ± 5.2	60.5 ± 4.9
Смертность, %		12.2 ± 1.9	24.5 ± 2.2	36.3 ± 3.5	33.1 ± 5.2	39.5 ± 4.9
Коэффициент размножения тлей		2.46	1.28	1.04	1.78	1.13
Коэффициент размножения тлей	Прямое влияние бактериальной суспензии	2.33	0.73	0	0	0
Афицидность штамма, %		—	33.8 ± 7.2	56.6 ± 4.5	43.3 ± 9.8	52.8 ± 6.2

в 3 раза, часть насекомых продолжала свою жизнедеятельность (табл. 2).

Известно отрицательное влияние бактерий *B. thuringiensis*, эффективных биоинсектицидов, на выживаемость насекомых, в том числе на тлей [4], связанное с выработкой этими бактериями δ -эндотоксинов (Cry и Cyt) [24]. Несмотря на то, что токсины Cry и Cyt активны против широкого спектра вредителей [4], относительно недавно были обнаружены специфичные именно для *Hemiptera* δ -эндотоксины и была показана их афицидность [24], которая редко достигала 100%, как это наблюдали по отношению к насекомым из семейств *Lepidoptera* и *Coleoptera* [24]. Смертность гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* при действии токсина Cry1Ac составила около 70%, при действии Cry1Ab — 40%, а при действии Cry3A — 60% [10]. Кроме того, в последнее время появляются работы, в которых показано, что другие представители рода *Bacillus* (*B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. solisalsi*, *B. pumilis*, *B. subtilis*) могут эффективно сдерживать развитие вредителей на растениях и механизмы этого явления могут быть различными [25, 26], в том числе за счет продукции биосурфактантов [8]. Известно, что бактериальный штамм *B. subtilis* 26Д является эффективным продуцентом сурфактина [27]. Таким образом, прямое воздействие бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) и их композиции на показатели жизнеспособности обыкновенной злаковой тли могло быть связано с выработкой токсинов Cry и Cyt и продукцией биосурфактантов.

Опосредованное влияние СРРБ на показатели жизнедеятельности вредителей может выражаться в ростстимулирующем эффекте данных бактерий, приводящем к повышению выносливости растений к тлям [7]. Выносливость или толерантность растений к насекомым, питающимся флоэмным соком, заключается в быстроте восстановления фотосинтетической активности и ростовых

процессов [2]. В наших экспериментах установлена низкая выносливость растений пшеницы по отношению к *S. graminum*, проявлявшаяся в торможении роста 1 и 2 листьев в течение всего эксперимента (рис. 1а, 1б). Обработка растений клетками бактериальных штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) и их композицией ускоряла рост 1 и 2 листьев пшеницы, как в норме, так и при заселении тлей (рис. 1). Стимулируя рост растений за счет известных механизмов — продукции метаболитов гормональной природы, способствующих росту и увеличению скорости фотосинтеза, повышения доступности воды и элементов минерального питания — СРРБ, вероятно, компенсируют потери при кормлении злаковой тли и формируют определенную степень толерантности растений к вредителю [2, 5, 7].

Другой механизм, способствующий формированию устойчивости растений пшеницы к обыкновенной злаковой тле, может быть связан с опосредованной индукцией штаммами бацилл СИУ против вредителя [4, 7, 14]. Защитные реакции при развитии СИУ, индуцированной СРРБ, характеризовались ранним накоплением активных форм кислорода (АФК), в том числе H_2O_2 , отложением каллозы, повышением пероксидазной активности в апопласте, укреплении клеточных стенок растений и продукцией различных метаболитов [13, 14, 25, 26]. С одной стороны, индуцированная СРРБ генерация АФК в инфицированных растениях, могла играть критическую роль при формировании СИУ [5]. С другой стороны, редокс-статус растения, заселенного тлей, является одним из важных показателей толерантности сорта [1, 2, 28], а окислительный взрыв в месте инфицирования тлей считается типичной реакцией формирования устойчивости растения к вредителю [29]. Так, на растениях ячменя, заселенных ячменной тлей *Diuraphis noxia*, и на растениях арабидопсиса, заселенных персиковой тлей *Myzus persicae*, окислительный взрыв был обнару-

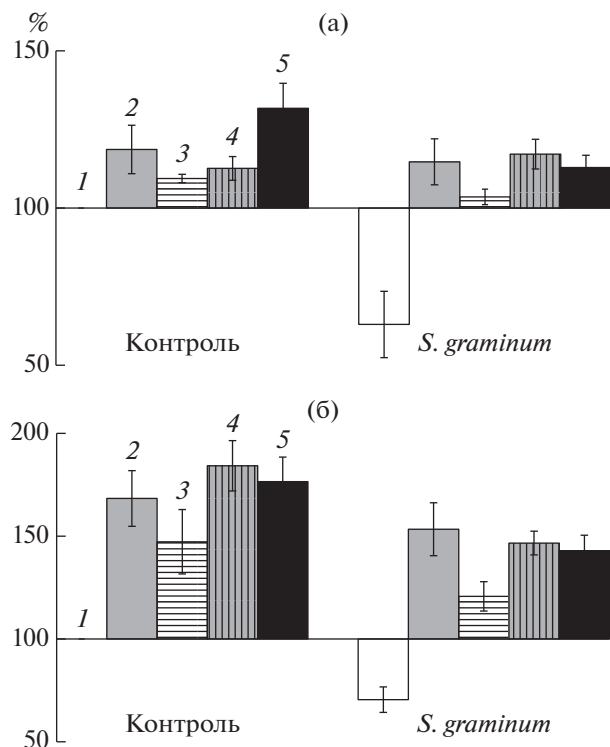


Рис. 1. Влияние бактерий рода *Bacillus* на прирост первого (а) и второго (б) листьев растений пшеницы, заселенных злаковой тлей *S. graminum*: 1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26Д, 3 – *B. thuringiensis* B-6066, 4 – *B. thuringiensis* B-5689, 5 – композиция трех штаммов. Наблюдения проводили в течение 21 сут после заселения растений вредителем.

жен только у устойчивых, а не у восприимчивых форм растений [28]. Защитная роль повышенной генерации H_2O_2 в растениях в ответ на заселение тлями может заключаться: в прямом повреждающем действии высоких концентраций H_2O_2 на тлей, приводящим к подавлению выживаемости вредителя [26, 28]; в опосредованном действии H_2O_2 через регуляцию работы ферментов про-/антиоксидантной системы и синтеза токсических соединений, в том числе лигнина [1, 2]; в сигнальной функции H_2O_2 , запускающей СИУ [7, 14].

Изучение редокс-статуса растений пшеницы в наших экспериментах показало, что заселение контрольных растений пшеницы тлями приводило к уменьшению содержания H_2O_2 на начальных этапах инфицирования (рис. 2а) и сопровождалось высокой плодовитостью тлей (табл. 2) и низкой выносливостью растений (рис. 1). Предпосевная обработка семян пшеницы штаммами *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (B-5689 и B-6066) и их композицией приводила к резкому накоплению H_2O_2 в листьях пшеницы, заселенных *S. graminum* (рис. 2а), что, возможно, обуславливало устойчивость таких растений к вредителю. Так, недавно было показано, что бактериальный штамм *Bacil-*

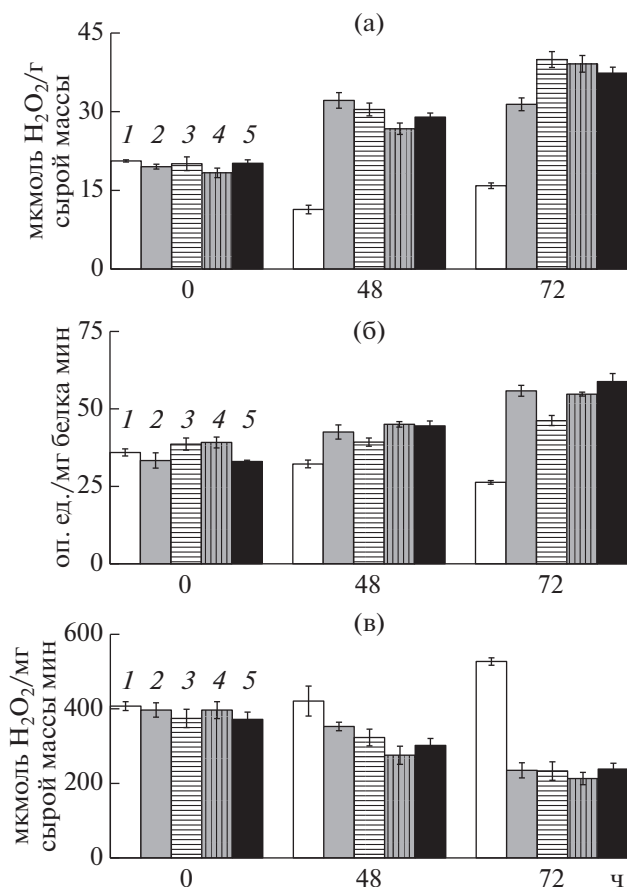


Рис. 2. Влияние бактерий рода *Bacillus* на генерацию H_2O_2 (а), активность пероксидазы (б) и каталазы (в) в листьях растений пшеницы, заселенных злаковой тлей *S. graminum*: 1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26Д, 3 – *B. thuringiensis* B-6066, 4 – *B. thuringiensis* B-5689, 5 – композиция трех штаммов.

lus velezensis YC7010 формировал устойчивость растений арабидопсиса к персиковой тле *M. persicae* посредством накопления H_2O_2 в обработанных бактерией растениях [26].

Показано, что повышенная генерация H_2O_2 у иммунизированных и устойчивых фенотипов растений, заселенных тлей, приводила к изменению активности ряда про-/антиоксидантных ферментов [1, 30]. Причем эти изменения сохраняли гомеостаз между генерацией и утилизацией АФК, обеспечивающий как защитный ответ, так и высокую скорость фотосинтеза для компенсации потерь питательных веществ при питании насекомых флоэмным соком, то есть формировали выносливость растений к вредителю [2, 30]. Активация апопластных пероксидаз на фоне высокого содержания H_2O_2 приводила к реорганизации и укреплению клеточных стенок растений за счет лигнификации, а также синтезу токсичных фенольных соединений, что может играть решающую роль в развитии устойчивости растений к

тлям за счет детоксикации больших количеств АФК и ухудшения условий питания насекомых соответственно [1, 2]. Точно также, низкая активность каталазы у заселенных тлями устойчивых фенотипов злаков [30] и подавление транскрипционной активности гена каталазы у устойчивого генотипа арабидопсиса, инфицированного персиковой тлей *M. persicae* [28], способствовало окислительному взрыву и развитию устойчивости. Напротив, сдвиг баланса в сторону антиоксидантов и поддержание их высокого уровня связывают с ослаблением защиты против тлей и чаще наблюдают у восприимчивых фенотипов [1, 28, 30]. Так повышенную активность антиоксидантного фермента каталазы связывают с направленным уменьшением окислительного взрыва в растениях, что способствует поддержанию благоприятных условий для жизнедеятельности тлей [28].

В наших экспериментах у восприимчивых к *S. graminum* растений пшеницы на фоне уменьшения содержания H_2O_2 обнаружено снижение активности пероксидаз (рис. 2б) и повышение активности каталаз (рис. 2в), что могло быть причиной ослабления устойчивости данных растений к тле. Напротив, растения, предварительно обработанные бактериальными штаммами *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) и их смесью, и затем инфицированные злаковой тлей *S. graminum*, отличались высоким уровнем генерации H_2O_2 (рис. 2а), повышенной активностью пероксидаз через 72 ч после начала кормления тлей (рис. 2б) и низкой активностью каталаз в течение всего эксперимента (рис. 2в), что можно связать с формированием устойчивости таких растений к *S. graminum*. Подобные изменения генерации H_2O_2 , активности пероксидаз и каталаз в растениях под воздействием штаммов *B. subtilis* и *B. thuringiensis* ранее наблюдали при грибном и бактериальном патогенезах [31, 32]. В настоящей работе впервые показана способность штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) индуцировать устойчивость растений пшеницы к злаковой тле, влияя на редокс-статус растений, в частности, регулируя активности пероксидазы и каталазы. Особый интерес представляет тот факт, что изученные нами штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) аддитивно влияли на активность этих ферментов в композиции.

Кроме того, АФК, в особенности молекула H_2O_2 , при защите растений от тли выполняют также сигнальную функцию, активируя и регулируя гормональные сигнальные пути при развитии СИУ [1, 33]. Показано, что заселение тлями запускало в растениях как ЖАК/этилен-, так и СК-зависимые защитные ответы [1, 7]. Первым фактором, индуцирующим защитный ответ растений на инфицирование тлями, является механическое повреждение, которое, как полагают, запус-

кает ЖАК-зависимую активацию липоксигеназ и ингибиторов протеиназ [1]. Затем растение реагирует на химические детерминанты, содержащиеся в слюне тлей, и приводит в действие защитный ответ схожий с устойчивостью к биотрофным патогенам, при этом активируется СК-зависимый сигнальный каскад [1]. Кроме того, многочисленные исследования показывают, что включение СК-сигнального пути может быть общим механизмом антибиоза и отпугивания тлей у устойчивых форм растений [1].

Защита растений от вредителей с помощью СРРБ широко изучается [7, 14, 25]. Однако механизмам активации СИУ, опосредованной СРРБ против тлей, особенно бактериям рода *Bacillus*, посвящено мало работ, где показано, что бактерии в растениях могут индуцировать как ЖАК-зависимые, так и ЖАК-независимые защитные пути [13].

Для определения способности бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* регулировать СИУ в растениях пшеницы против обыкновенной злаковой тли *S. graminum* была изучена экспрессия генов, кодирующих PR-белки, маркеры и регуляторы СК- и ЖАК-сигнальных путей. Из изученных нами генов защитных белков ген *TaRboh*, кодирующий фермент НАДФН-оксидазу, регулировался СК-зависимым сигнальным каскадом [34]. С помощью мутантных растений арабидопсиса, лишенных гена *RbohD* было показано, что НАДФН-оксидаза играла ключевую роль в генерации АФК при повреждении растений тлями [33]. Ген *PR-6*, кодирующий ингибиторы протеиназ, регулировался ЖАК-зависимым сигнальным каскадом [34], а ген *PR-9*, кодирующий анионную пероксидазу, индуцировался как при развитии ЖАК-зависимых, так и СК-зависимых защитных реакций [34, 35]. Как видно из рис. 3, в проростках пшеницы через 48 ч после заселения тлей содержание транскриптов трех изученных генов резко уменьшалось (рис. 3). Через 72 ч после начала эксперимента наблюдали накопление мРНК только гена *PR-6* (рис. 3б), а содержание транскриптов генов *TaRboh* и *PR-9* выше контрольных значений не поднималось (рис. 3а, в). Такие результаты могут свидетельствовать об отключении под влиянием злаковых тлей системной устойчивости, особенно по СК-зависимому сигнальному пути. Обработка растений штаммами *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) и их композицией увеличивала содержание транскриптов всех изученных генов (рис. 3). Транскрипция маркерного гена СК-сигнального пути *TaRboh* сильнее активировалась при обработке штаммом *B. subtilis* 26Д (рис. 3а), тогда как транскрипция маркерного гена ЖАК-сигнального пути *PR-6* при обработке штаммами *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) (рис. 3б). Содержание мРНК гена анионной пероксидазы *PR-9* было высоким при обработке растений всеми изученными штаммами (рис. 3в). Сходные ре-

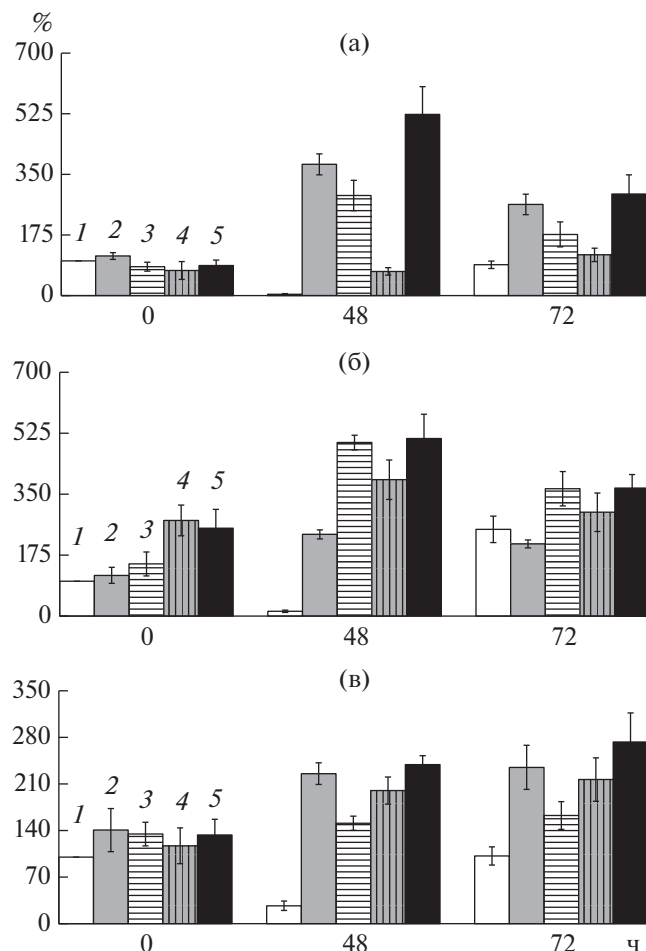


Рис. 3. Влияние бактерий рода *Bacillus* на содержание транскриптов генов защитных PR-белков (мРНК, % от контроля): НАДФН-оксидазы (а), PR-6 (ингибиторов протеиназ, (б) и PR-9 (анионной пероксидазы, (в) в листьях растений пшеницы, заселенных злаковой тлей *S. graminum*: 1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26Д, 3 – *B. thuringiensis* B-6066, 4 – *B. thuringiensis* B-5689, 5 – композиция трех штаммов.

зультаты были получены ранее на растениях пшеницы инфицированных патогеном *S. nodorum* [3]. Интересно, что штамм *B. thuringiensis* B-6066 оказался способен транзитивно активировать транскрипцию гена *TaRboh* (СК-путь), а штамм *B. subtilis* 26Д – накапливать транскрипты гена *PR-6*, кодирующего ингибиторы протеиназ (ЖАК-путь) (рис. 3). Причем, максимальное накопление мРНК всех изученных генов (*TaRboh*, *PR-6*, *PR-9*) обнаружено в заселенных тлями растениях, обработанных композицией трех штаммов (рис. 3). Полученные результаты говорят об индукции СИУ под влиянием консорциума штаммов как по СК-, так и по ЖАК-зависимым сигнальным путям, проявлении аддитивного эффекта и согласуются с данными литературы о значительном повышении устойчивости растений к патогенам и вредителям при использовании композиции бак-

териальных штаммов, индуцирующих различные сигнальные пути [14].

Таким образом, созданная нами композиция бактериальных штаммов оказывала как прямое, так и опосредованное через растение воздействие на жизнеспособность обыкновенной злаковой тли *S. graminum*. Причем, наибольшую стимулирующую рост растений активность показали штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* B-5689, тогда как штамм *B. thuringiensis* B-6066 проявил наибольшую афицидность. Штаммы *B. thuringiensis* (B-5689 и B-6066) индуцировали гены ЖАК-зависимого защитного пути, а штамм *B. subtilis* 26Д индуцировал гены СК-зависимого защитного пути. Изученные штаммы не вызывали антагонистического интерферирующего эффекта при индукции защитных систем растений пшеницы, а напротив, проявляли аддитивный эффект. Защитные реакции в инфицированных растениях, опосредованные изученными бактериальными штаммами, развивались с участием компонентов про-/антиоксидантной системы, регулирующей редокс-статус растений, что показано нами впервые. Полученные данные предполагают возможность создания на основе штаммов бактерий рода *Bacillus* spp. эффективного биопрепарата с комплексной защитой не только против гемиботрофных патогенов [3], но и злаковой тли.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № 116020350027-7 (2016–2017), а также финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.604.21.0016, RFME-FI60414X0016) (2014–2015) и РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-08014 с использованием оборудования ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morkunas I., Mai V.C., Gabrys B. // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. № 6. P. 2057–2073.
2. Koch K.G., Chapman K., Louis J., Heng-Moss T., Sarath G. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7:1363.
3. Бурханова Г.Ф., Веселова С.В., Сорокань А.В., Благова Д.К., Нужная Т.В., Максимов И.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 3. С. 308–315. doi 10.7868/S0555109917030047
4. Araújo E.O. // Afr. J. Plant Sci. 2015. V. 9. № 9. P. 368–373.
5. Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сараярова Е.Р., Хайруллин Р.М. // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 763–775.
6. Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., van Wees S.C., Bakker P.A. // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. P. 347–375.
7. Rashid M.H., Chung Y.R. // Front. Plant Sci. 2017. V. 8:1816. doi 10.3389/fpls.2017.01816

8. Yang S.Y., Lim D.J., Noh M.Y., Kim J.C., Kim Y.C., Kim I.S. // Entomological Research. 2017. V. 47. № 1. P. 55–59. doi 10.1111/1748-5967.12200
9. Roh J.Y., Choi J.Y., Li M.S., Jin B.R., Je Y.H. // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 17. № 4. P. 547–559.
10. Porcar M., Grenier A.M., Federici B., Rahbe Y. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. 14. P. 4897–4900.
11. Hyakumachi M., Nishimura M., Arakawa T., Asano Sh., Yoshida Sh., Tsushima S., Takahashi H. // Microbes Environ. 2013. V. 28. № 1. P. 128–134.
12. Melatti V.M., Praça L.B., Martins E.S., Sujii E., Berry C., Monnerat R.G. // BioAssay. 2010. V. 5. P. 1–4.
13. Valenzuela-Soto J.H., Estrada-Hernández M.G., Ibarra-Laclette E., Délano-Frier J.P. // Planta. 2010. V. 231. P. 397–410. doi 10.1007/s00425-009-1061-9
14. Pangesti N., Pineda A., Pieterse C.M., Dicke M., van Loon J.J. // Front. Plant Sci. 2013. V. 4:414. doi 10.3389/fpls.2013.00414
15. Патент РФ, 2018. № 265469.
16. Радченко Е.Е. // Злаковые тли. В кн.: Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам. Методическое пособие. М.: Россельхозакадемия, 2008. С. 214–257.
17. Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 5. С. 649–660.
18. Giovanini M.P., Puthoff D.P., Nemacheck J.A., Mittapalli O., Saltzmann K.D., Ohm H.W., Shukle R.H., Williams C.E. // Mol. Plant Microbe Interact. 2006. V. 19. № 9. P. 1023–33.
19. Adhikari T.B., Balaji B., Breeden J.D., Goodwin S.B. // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2007. V. 71. P. 56–68.
20. Бурханова Г.Ф., Яруллина Л.Г., Максимов И.В. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 1. С. 104–110.
21. Giménez M.J., Pistón F., Atienza S.G. // Planta. 2011. V. 233. P. 163–173.
22. Zimmerman C., Klein K.C., Kiser P.K., Singh A.R., Firestein B.L., Riba S.C., Lingappa J.R. // Nature. 2002. V. 415. № 6867. P. 88–92.
23. Monnerat R.G., Soares C.M., Capdeville G., Jones G., Soares M.E., Praça L., Cordeiro B.A., Braz S.V., Dos Santos R.C., Berry C. // Microbial. Biotechnol. 2009. V. 2. P. 512–520.
24. Chougule N.P., Bonning B.C. // Toxins. 2012. V. 4. P. 405–429.
25. Zebelo S., Song Y., Kloepper J.W., Fadamiro H. // Plant, Cell and Environment. 2016. V. 39. P. 935–943.
26. Rashid M.H., Khan A., Hossain M.T., Chung Y.R. // Front. Plant Sci. 2017. V. 8:211. doi 10.3389/fpls.2017.00211
27. Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Благова Д.К., Максимов И.В. // Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего. Материалы межд. научн. конф. PLAMIC 2018, Уфа. 2018. С. 15.
28. Lei J., Zhu-Salzman K. // Plant Signaling & Behavior. 2015. V. 10. № 4: e1010936
29. Moloi M.J., van der Westhuizen A.J. // J. Plant Physiol. 2006. № 11. V. 163. P. 1118–1125.
30. Zhu-Salzman K., Salzmann R.A., Ahn J.-E., Koiwa H. // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 420–431.
31. Ahn I.P., Lee S.W., Kim M.G., Park S.R., Hwang D.J., Ba S.C. // Mol. Cells. 2011. V. 32. P. 7–14.
32. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. // Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development. Ch. 3. / Ed. L. Morrison. N.Y.: Nova Sci. Publ., 2015. P. 33–66.
33. Kerchev P.I., Fenton B., Foyer C.H., Hancock R.D. // Plant, Cell and Environment. 2012. V. 35. P. 441–453.
34. Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. // Annual Rev. Phytopathol. 2006. V. 44. P. 135–162.
35. Almagro L., Gomez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcello A., Pedreno M.A. // J. Exp. Botany. 2009. V. 60. P. 377–390.

Strains of *Bacillus* Regulate Wheat Resistance to Greenbug Aphid *Schizaphis graminum* Rond.

S. V. Veselova^{a,*}, G. F. Burkhanova^a, S. D. Rumyantsev^a, D. K. Blagova^a, and I. V. Maksimov^a

^aInstitute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: veselova75@rambler.ru

Received February 14, 2018

Revised July 14, 2018

Accepted July 25, 2018

The ability of bacteria *Bacillus subtilis* Cohn. (strain 26 D) and *Bacillus thuringiensis* Berliner (strains V-6066 and V-5689) to negative influence on the livelihood of greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. has been detected. Protective effects of the studied strains of *Bacillus* spp. consisted in direct aphicide activity and indirect induce systemic resistance in wheat plants by the regulation of hydrogen peroxide generation, activity of peroxidase and catalase and an increase expression of defense related genes such as NADPH oxidases, PR-6, and PR-9. It has been shown that *B. thuringiensis* strains induced genes of jasmonate-dependent signaling pathway, and *B. subtilis* strain induced genes of salicylate-dependent signaling pathway. It has been found that the composition of the studied strains of *Bacillus* spp. had an additive effect of wheat plant resistance to pest. These results suggest use these strains *Bacillus* spp. as a basis for further development of bio preparation against cereal aphids.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Schizaphis graminum*, *Triticum aestivum* L., induced systemic resistance, redox metabolism, defense-related genes