

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УФИМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ГЕНЕТИКИ**

На правах рукописи

Сарварова Елена Рафисовна

**ПОИСК НОВЫХ СВОЙСТВ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS
SUBTILIS* СОНН.**

Специальность 03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Хайруллин Рамиль Магзинурович**

Пермь - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Определение «эндофиты».....	10
1.2. Источники выделения эндофитов.....	11
1.3. Видовое разнообразие эндофитов.....	13
1.4. Пути колонизации растительных тканей эндофитами.....	16
1.5. Механизмы проникновения эндофитов в растительные ткани.....	18
1.6. Биологическая активность эндофитов и механизмы ее проявления...	20
1.7. Действие оксикоричных кислот на бактерии.....	30
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	34
2.1. Объекты исследования.....	34
2.2. Среды и субстраты для культивирования.....	34
2.3. Условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик.....	36
2.4. Олигонуклеотидные праймеры, использованные при проведении ПЦР.....	36
2.5. Выделение эндофитов из растительных тканей.....	37
2.6. Окрашивание бактерий по Граму.....	38
2.7. Молекулярно-генетическая оценка различий между штаммами эндофитов и их видовой принадлежности	38
2.8. Анализ антагонистической активности эндофитов	39
2.9. Изучение влияния антибиотиков на концентрацию клеток бактерий в растениях петрушки.....	40
2.10. Изучение влияния механических повреждений на проникновение эндофитов в растения.....	40
2.11. Выделение молочнокислых бактерий из растительных тканей.....	41
2.12. Выявление эндофитности штаммов бактерий.....	41
2.13. Изучение влияния способности штаммов <i>Bacillus spp.</i> защищать	

проростки растений от фитопатогенных грибов.....	43
2.14. Определение культурально-морфологических и физиолого- биохимических свойств бактерий.....	44
2.15. Определение рибонуклеазной активности.....	48
2.16. Изучение антивирусной активности бактерий рода <i>Bacillus</i> на растениях картофеля.....	49
2.17. Изучение влияния феруловой кислоты на рост бактерий рода <i>Bacillus</i>	50
2.18. Получение рекомбинантных штаммов эндофитных микроорганизмов.....	52
2.19. Статистическая обработка.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	58
3.1. Выделение эндофитов из растений разных видов, оценка влияния механических повреждений и межмикробных взаимоотношений на численность эндофитных бактерий в растительных тканях.....	58
3.2. Характеристика эндофитных штаммов бактерий.....	61
3.3. Влияние оксикоричных кислот на рост колоний эндофитных штаммов бактерий.....	73
3.4. Выявление активности РНКаз у эндофитных штаммов бактерий и способности эндофитов защищать растения картофеля от вирусных инфекций	81
3.5. Создание рекомбинантного штамма <i>B. subtilis</i> 26ДСгуChS и оценка его свойств.....	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ.....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Современное растениеводство основано на использовании синтетических химических пестицидов, которые, как правило, являются опасными для человека и окружающей среды. В качестве альтернативы химической защите растений предлагается возделывание генетически модифицированных сортов, устойчивых к вредным организмам, которое также нельзя отнести к экологически безопасным агротехнологиям (Schutte et al., 2017; Tsatsakis et al., 2017). Поэтому все большее внимание в качестве альтернативы применению химических пестицидов, а также производству растений - ГМО многими авторами указывается использование на посевах сельскохозяйственных культур биологических препаратов для контроля за популяциями вредных организмов, или биоконтроль (Silva et al., 2017; Singh et al., 2020; Panebianco et al., 2021).

По мнению исследователей (Khan et al., 2018; Gamalero and Glick, 2020; Ruiu, 2020) одним из перспективных методов биоконтроля является использование эндофитных бактерий, стимулирующих рост растений (PGPB), проявляющих комплексную биологическую активность против фитофагов и способных длительное время находиться внутри растений, что позволяет эндофитам оказывать пролонгированное благоприятное действие на макроорганизм, а также избегать конкуренции со стороны аборигенной микроорганизмов. С позиций оптимальных биотехнологических свойств, а также широкого распространения в природе и относительной безопасности наиболее перспективны в этом аспекте представители рода *Bacillus*, в первую очередь антагонистичные к фитопатогенам штаммы *B. subtilis*, а также инсектицидные штаммы *B. thuringiensis*.

Механизмы взаимоотношений эндофитов с растениями во многом остаются неизвестными. До сих пор нет четкой определенности в вопросе о путях проникновения таких бактерий в растительные ткани. Одни авторы считают, что эти микроорганизмы проникают в растения преимущественно из-за механических повреждений тканей (Hardoim et al., 2008; Kumar et al., 2020), но в этом случае к эндофитам можно отнести любую бактерию, способную колонизировать таким

образом макроорганизм. Другие авторы придерживаются мнения о специфичности взаимодействия эндофитов и растений на уровне их геномов (Pentimone et al., 2018; Zachow et al., 2010). Известно, что механические повреждения способствуют также проникновению фитопатогенных вирусов в растения. В связи с этим представляют практический интерес вопросы о том, могут ли эндофиты способствовать проявлению устойчивости растений к вирусным инфекциям, и как растительные метаболиты, появляющиеся при механических повреждениях тканей, могут влиять на рост и размножение эндофитов.

Цель настоящей работы: поиск у эндофитных бактерий *B. subtilis* новых свойств, способных играть роль во взаимоотношениях с растениями при механических повреждениях растительных тканей.

Задачи исследования.

1. Провести сравнительную оценку распространенности эндофитных бактерий в тканях различных видов сельскохозяйственных культур, влияние физиологических особенностей растений, механических повреждений, а также совместной инокуляции растений разными эндофитами на плотность их популяции в растительных тканях.

2. Исследовать характер влияния оксикоричных кислот, как компонентов укрепления клеточных стенок растений при механических повреждениях, на рост колоний и размножение эндофитных бактерий.

3. Определить наличие активности РНКаз у эндофитов и способность бактерий защищать растения от вирусных инфекций.

4. Оценить возможность использования эндофитных бактерий как модифицированных векторов для повышения устойчивости системы растение-эндофит к вредным организмам.

Научная новизна. Выделены новые эндофитные бактерии из растений различных видов, охарактеризована их антагонистическая активность по отношению к распространенным фитопатогенным грибам. Показано, что эндофитные бактерии реже выделяются из тканей растений, секретирующих при

поранении экссудаты, закупоривающие сосуды, в сравнении с растениями других видов. Исследованы взаимоотношения между штаммами эндофитных бактерий и установлено, что антагонизм одного эндофита по отношению к другому *in vitro* может не влиять на плотность популяции последнего в растительных тканях. Впервые исследовано влияние оксикоричных кислот на подвижность эндофитных представителей бактерий *B. subtilis* и выявлена способность коммерческого штамма *B. subtilis* 26Д разрушать феруловую кислоту. Установлено, что феруловая и кумаровая кислоты усиливают рост колоний исследованных штаммов бактерий *B. subtilis* на агаризованных средах с небольшим содержанием агара (0,7%). Впервые выявлена способность депонированных (*B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ 128), *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066)) и новых штаммов бактерий секретировать РНКазы в среду культивирования. Определены бактерии, эффективно уменьшающие распространение вирусных инфекций на посадках картофеля. На примере использования бактерии *B. subtilis* 26Д показано, что эндофиты могут использоваться как модифицированные вектора переноса необходимых свойств для повышения устойчивости растений к вредным организмам.

Практическая значимость. Во Всероссийской коллекции непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ РАН депонирован новый штамм бактерий *B. subtilis* 26ДCryChS (RCAM04928) с хозяйственно-полезными свойствами. Показано, что применение микробиологического препарата, включающего штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ 128), *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066) эффективно защищает растения картофеля от вирусных болезней. Выделенные эндофитные бактерии переданы в коллекцию микроорганизмов Центра коллективного пользования «Коллекция симбиотических микроорганизмов «Симбионт» Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. (<https://ckp-rf.ru/ckp/499349/>).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эндوفитная бактерия *Bacillus subtilis* 26Д при совместной инокуляции с неэндифитом *Lactobacillus plantarum* 3L способствует проникновению лактобацилл в растения картофеля без механических повреждений растительных тканей.
2. Оксикоричные кислоты – феруловая и кумаровая играют роль в распространении бактериальных клеток по поверхности агаризованных сред.
3. Исследованные штаммы бактерий способны уменьшать распространение вирусной инфекции у растений картофеля.
4. Эндифитную бактерию *Bacillus subtilis* 26Д можно использовать в качестве вектора, придающего растениям устойчивость к вредным насекомым.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2014), Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2014), международной Пущинской школе – конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2015), конференции с международным участием «Эколого-генетические основы современных агротехнологий» (Пушкин, 2016), Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016), научной конференции и школе молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 2017), международной научной конференции PLAMIC (Уфа, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы и методы в защите растений» (Екатеринбург, 2018), международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019), международной научной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (Новосибирск, 2019).

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, из них 7 статей - индексируемые в международных базах Web of Science или Scopus. Создано одно изобретение, на которое получен патент РФ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 124 страницах текста, содержит 12 рисунков и 21 таблицу, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов работы, 5 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 212 наименований работ, в том числе 8 отечественных и 204 зарубежных авторов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ИБГ УФИЦ РАН и является частью работ по теме «Молекулярные механизмы адаптации организмов к окружающей среде» № АААА-А21-121011990120-7. Часть исследований проведена в рамках выполнения работ, поддержанных грантами ФЦП Министерства образования и науки РФ № 14.604.21.0016 «Разработка многофункционального биопестицида для защиты растений от патогенов и вредителей», РФФИ и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии № 19-46-02004 «Бактериальные эндофиты как потенциальные вируциды для биоконтроля распространенных вирусов картофеля и томатов», РФФИ – офи_м № 17-29-08014 «Липопептиды эндофитных бактерий *Bacillus ssp.* – модуляторы защитных систем растений от вредных организмов», Республики Башкортостан молодым ученым и молодежным научным коллективам №3 от 02.07.18 «Создание коллекции эндофитных микроорганизмов сельскохозяйственных растений Республики Башкортостан».

Личный вклад автора состоял в выделении изолятов из растительных тканей планировании и проведении экспериментов. Автор провел критический анализ полученных данных и их интерпретацию, участвовал в подготовке результатов работы к публикации и их представлении на научных конференциях. Секвенирование выделенных изолятов производили по заказу в компании

«Евроген» (Москва). Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Список принятых сокращений: ГМО — генно-модифицированный организм; КГА — картофельно - глюкозный агар; КОЕ — колониеобразующая единица; МПБ — мясопептонный бульон; МС – среда Мурасиге-Скуга; ОК — оксикоричные кислоты; ПСС — полусинтетическая среда; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ФБ — фосфатный буфер; ФК — феруловая кислота; ВТВ — bitoxybacillin; ISR — induced systemic resistance (индуцированная системная устойчивость); LB — среда Luria Bertani; PAD —phenolic acid decarboxylase; RGPB — plant growth-promoting bacteria (бактерии, стимулирующие рост растений); RAPD —random amplification of polymorphic DNA.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Определение «эндофиты»

Термин эндофит впервые был высказан как «entophytae» немецким ученым Генрихом Фридрихом Линком в 1809 году (Link, 1809) при описании паразитических грибов. Слово «эндофит» происходит от сочетания двух греческих слов – «endon» и «phyton», что буквально означает «внутри растений».

В настоящее время существует, по крайней мере, не менее десяти определений термина «эндофит», относящихся к микробам. Например, к эндофитам относят бактерии, которые можно выделить из растительных тканей после их поверхностной стерилизации, а затем посевом на подходящие среды (Verma et al., 2017). Так же их определяют как бактерии, которые колонизируют внутреннюю ткань растения, не вызывая внешних симптомов заболевания или отрицательного влияния на их хозяина (Holliday, 1989; Hallman, 1997).

Согласно Haroim с соавт. (2015), эндофиты определяются как «организмы, которые проводят, по крайней мере, часть своего жизненного цикла в пределах одного вида растений без вреда для растения-хозяина, и он не проявляет каких-либо явных симптомов». Важно учитывать природу и тип микроорганизма, определяя его как эндофит потому, что многие фитопатогены на определенном этапе своего жизненного цикла скрыты внутри тканей, а растения-хозяева не проявляют никаких визуальных симптомов. Таким образом, включение в терминологию уточнения «без вреда» или «отсутствие симптомов», позволяет провести различие между эндофитными и патогенными микробами (Schulz, 2006).

При анализе самого свойства эндофитности до сих пор остается дискуссионным вопрос о том, является ли это свойство специфичным, или к эндофитами можно отнести любые бактерии, попавшие внутрь растительных тканей из-за механических повреждений какого-либо органа. Так, например, некоторые авторы колонизацию растений эндофитными бактериями подразделяют на «облигатную», «факультативную» и «пассивную» в зависимости от того, требуется ли бактериям растительная ткань для жизни и воспроизводства

(Hardoim et al., 2008). Согласно цитируемым авторам, облигатные эндофитные бактерии выделяются из семян и не могут выживать в почве. Факультативные эндофиты широко распространены в почве и при подходящих условиях колонизируют растительные ткани. Согласно Comrant с соавт. (2010), большинство факультативных эндофитных бактерий остаются в покровных тканях, но некоторые также проникают в центральную флоэму и ксилему. Бактерии, лишенные способности колонизировать и инфицировать растений, могут проникать в ткани через раны и трещины на различных органах, и этот способ получил определение как пассивный способ колонизации (Liu et al, 2017). Но, если через повреждения во внутрь растений способны проникать клетки любых видов бактерий, встречающихся в фитоценозах, то всех ли можно назвать эндофитами, и как можно объяснить факт, что некоторые виды бактерий, например, *Lactobacillus* sp., редко выявляются внутри растительных тканей, несмотря на встречаемости в филлоплане растений (Pontonio et al., 2018) Вместе с тем, согласно Hyde и Soyton (2008), справедливо обсуждать эндофитность в аспекте эволюции взаимоотношений макро- и микроорганизма, т.е. специфичности взаимодействия между ними.

На наш взгляд, справедливо рассматривать эндофитов, как бактерий, проникающих во внутренние растительные ткани без повреждений, вызванных воздействием других факторов (поранения, повреждение насекомыми, естественные травмы, например, разрыв корней и т.п.) (Хайруллин, Сарварова, 2016).

Понимая, что эндофитами могут быть и грибы, в нашей работе эндофитами мы обозначаем бактерии.

1.2. Источники выделения эндофитов

Считается, что среди почти 300000 видов растений, существующих на Земле, каждое отдельное растение - хозяин эндофитов одного или нескольких видов (Santoyo et al., 2016). Согласно цитируемым авторам, в большинстве работ разнообразие эндофитов исследуется в тканях культивируемых растений -

сахарного тростника, кукурузы, риса, пшеницы, картофеля, сои и других (Santoyo et al., 2016). Так, например, в работе Waghunde с соавт. (2021) представлен список различных бактериальных эндофитов, выделенных из разных тканей злаковых растений: риса, пшеницы, кукурузы, ячменя, просо и овощных культур: красный перец, огурец, томат, тыква, капуста, салат, морковь, лук, свекла, редис, шпинат. Бактериальные эндофиты так же были обнаружены во многих растениях несельскохозяйственного значения: в корнях узколистного рогоза (*Typha angustifolia* L.) (Li et al., 2011); в тканях древесных (рябина, береза, туя, дуб, эвкалипт, орех, ель, сосна, тополь, ива; Izumi et al., 2011); в листьях коричника (Elmagzob et al., 2019).

Эндофитные бактерии могут быть изолированы из различных «сфер», включая каулоферу (стебель), филлоферу (поверхность листа), аносферу (цветы), сперматоферу (семена) и карпосферу (плоды) (Compant et al., 2010; 2011; Morales-Cedeno et al., 2020). Большинство эндофитов встречаются в корнях или листьях, некоторые также локализуются в семенах, что предполагает путь проникновения через пестик (Lopez et al., 2018). В работе Корни - один из растительных органов, наиболее часто заселяемых эндофитными бактериями. Выявлено, что количество эндофитов в корнях значительно больше, чем в других тканях одного и того же растения. Некоторые авторы считают, что эндофитное разнообразие в корнях превышает разнообразие в других органах растений (Orozco-Mosqueda and Santoyo, 2021).

Koiv с соавт. (2019) проанализированы различные корнеплоды, выращенные на одной территории: морковь, свекла, топинамбур, картофель и брюква. Авторы отдельно исследовали кожуру и мякоть. Эндофиты были обнаружены в кожуре всех овощных культур, в мякоти всех корнеплодов был обнаружен представитель *Pseudomonas* sp.

Еще одна зона растений, имеющая большое значение и не исследованная должным образом, — это филлофера. Согласно работе Massoni с соавт. (2020) предполагается, что микробиота на поверхности органов растений, таких как листья или цветы, может быть более консервативнее, чем считалось ранее.

Следовательно, ее адаптивная роль в филлосфере может быть более специфичной для растений (Crombie et al., 2018; Herpell et al., 2020).

В обзорной работе (Droby and Wisniewski, 2018), посвященной исследованиям эндофитов, населяющих карпосферу, представлены интересные взгляды на микробиом, связанные с фруктами, либо в виде эпифитов (на поверхности), либо в виде эндофитов, которые могут использоваться в качестве агентов биоконтроля после сбора урожая.

Новые данные демонстрируют также эффективную колонизацию семян инокулированными бактериями через цветы предыдущего поколения (Mitter et al., 2017). Эти бактерии представляют собой менее изученную часть микробиома растений (Lopez et al., 2018).

1.3. Видовое разнообразие эндофитов

Растения окружены таксономически разнообразными микроорганизмами. Первое место по численности занимают бактерии, за ними следуют грибы, оомицеты, водоросли, простейшие, нематоды и вирусы (Muller et al., 2016). Микробное разнообразие, присутствующее в корневой эндосфере, меньше, чем в ризосфере и в почве (Liu et al., 2017). Количество бактериальной популяции в эндосфере на грамм ткани также меньше по сравнению с количеством, присутствующем в ризосфере (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006).

Считается (Liu et al., 2017), что растения-хозяева строго отбирают конкретное сообщество микробов из почвы для колонизации в виде эндофитов. Протеобактерии (относительная численность ~ 50%) являются наиболее многочисленными, за ними следуют *Actinobacteria* (~ 10%), *Firmicutes* (~10%) и *Bacteroidetes* (~ 10%) (Liu et al., 2017). Среди трех классов протеобактерий γ -протеобактерии наиболее разнообразны и доминируют по сравнению с α - и β -протеобактериями. Среди филы актинобактерий наиболее многочисленными является *Streptomyces sp.* и *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Nocardia* и *Streptosporangium*. С другой стороны, представители *Chloroflexi*, *Armatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*

являются распространенными бактериями в агроценозах, но представляют собой небольшую часть колонизаторов эндосферы (Santoyo et al., 2016; Liu et al., 2017).

Большое количество эндофитных видов микроорганизмов, включая *Achromobacter*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Microbiospora*, *Micromonospora*, *Nocardioideis*, *Pantoea*, *Planomonospora*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* и *Thermomonospora* было выявлено в тканях разных видов растений (Rana et al., 2019; Yadav et al., 2017). Так, в тканях древесных (рябина, береза, туя, дуб, эвкалипт, орех, ель, сосна, тополь, ива) доминировали представители *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Xanthomonas* (Izumi et al., 2011); в листьях коричника - *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* и *Fusobacteria*) (Elmagzob et al., 2019). В корнях узколистного рогоза преимущественно выделяли представители *Rhodofera*, *Pelomonas*, *Uliginosibacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rhizobium*, *Sulfurospirillum* (Li et al., 2011).

В работе Коiv с соавт. в корнеплодах моркови, свеклы, брюквы, подземных побегах топинамбура и картофеля были обнаружены представители *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*, которые по численности были распределены достаточно равномерно (2019). Представители *Betaproteobacteria* были обнаружены в моркови и топинамбуре, *Firmicutes* в свекле, *Saccharibacteria* в картофеле. Из мякоти топинамбура так же была выделена бактерия *Listeria* sp. Представитель *Pseudomonas* sp. был обнаружен в мякоти всех корнеплодов.

Разнообразие и преобладание эндосферных микробов может зависеть от вида растений-хозяев (Hardoim et al., 2015). Наличие различных видов эндофитов, в основном, зависит от биотических и абиотических факторов окружающей среды растений. Один вид растения-хозяина включает несколько родов и видов эндофитов, но тип ткани растения или сезон изоляции могут определять качество и плотность эндофитной популяции (Muthukumar et al., 2017).

Santoyo с соавт. (2016) проанализировали разнообразие бактериальных эндофитов, способствующих росту растений, и предположили, что наиболее распространенными видами являются *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhanella*, *Rhodanobacter*, *Sphingomonas* и *Stenotrophomonas*. Согласно Wang с соавт. (2017), Niem с соавт. (2020) из всех видов эндофитных бактерий, наиболее чаще встречаются и лучше изучены представители *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp. В настоящее время множество эндофитов этих видов генотипировано (Flores et al., 2020; Chen et al., 2020; Kang et al., 2020).

Род *Bacillus* включает большую группу генетически разнообразных грамположительных спорообразующих бактерий, принадлежащих к типу *Firmicutes*, которые занимают разнообразные экологические ниши (Villarreal-Delgado et al., 2018). Представители этого рода были изолированы из самых разных сред, обычно они выделяются из почвы, воды, воздуха, и часто из растительных тканей (Mingmongkolchai and Panbangred, 2018). В настоящее время *Bacillus* является одним из родов бактерий с наиболее изученными видами, число которых насчитывает не менее 377 (Parte, 2018). Бациллы обладают прямыми и косвенными механизмами стимулирования роста растений и широко известны как РГРВ (Tiwari et al., 2019). Благодаря своему разнообразию представители *Bacillus* обладают значительным потенциалом для применения в агробιοтехнологиях (Shafi et al., 2017; Zeigler and Nicholson, 2017), различным свойствам, включая стимулирование роста (Tahir et al., 2017) и защиту растений (Adelskov and Patel, 2017), промышленное производство белка (Zhang et al., 2017) и пробиотиков (Kuebutornye et al., 2019).

Молекулярные механизмы, с помощью которых бактерии *Bacillus* проявляют эти полезные эффекты, полностью не изучены. На основе анализа научной литературы можно сделать вывод, что чаще всего эндофиты встречаются в корнях растений, а среди видов эндофитные представители наиболее часто выделяются бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

1.4. Пути колонизации растительных тканей эндофитами

Выше уже приводились сведения о том, что некоторые авторы колонизацию растений эндофитными бактериями подразделяют на «облигатную», «факультативную» и «пассивную» в зависимости от того, требуется ли бактериям растительная ткань для жизни и воспроизводства (Hardoim et al., 2008). В «противовес» факультативной и пассивной колонизации некоторые авторы считают, что этот процесс включает набор экологических и генетических факторов, которые позволяют бактериям проникать в эндосферу растений (Compant et al., 2010). Интересно, что некоторые бактерии способны жить в симбиозе с эндофитными грибами (Desiro et al., 2015; Glaeser et al., 2016) и, таким образом, совместная колонизация растений с грибами может быть еще одним способом заселения растительных тканей.

Процесс колонизации предполагает сложное общение между двумя партнерами. Считается, что главным образом, колонизация начинается с корней и требует распознавания эндофитными бактериями определенных соединений в корневых экссудатах (Khare et al., 2018). Растения производят эти корневые экссудаты, чтобы взаимодействовать с мутуалистическими бактериями для получения экологических преимуществ (Compant et al., 2005). В подтверждении нашего мнения о том, что эндофитность это специфичное свойство, замечено, что эндофитные бактерии колонизируют внутреннюю часть растения в результате последовательности событий, подобных колонизации ризосферы ризобактериями (Hallmann et al., 1997).

Основываясь на представлении о том, что эндофиты могут проникать в растительные ткани пассивным способом, например, через механическое повреждение, многие авторы указывают на то, что микроорганизмы почвы и ризосферы могут проникать в растение через корневые трещины, естественные травмы и разрушенные корневые волоски. Согласно этому представлению, некоторые обитатели почвы, такие как нематоды, почвенные насекомые и позвоночные, также могут вносить свой вклад в микробную инокуляцию. Точно так же технологические работы в растениеводстве, такие как междурядная

обработка растений, сбор урожая, могут вызывать трещины на корнях, листьях, плодах, что способствует проникновению микроорганизмов в растения (Oana-Alina, 2020; Palmieri et al., 2019). Эндифиты (истинные, на наш взгляд) бобовых растений - ризобии самостоятельно проникают в корневые волоски, вызывая скручивание, что приводит к образованию корневых клубеньков (Dinca, Dunea, 2017). Попав внутрь корней, эндифитные бактерии могут колонизировать прилегающие внутренние ткани растения.

Типичными «горячими» точками для бактериальной колонизации являются места прорастания боковых корней, внешние слои клеток, кора корня, флоэма и ксилема (Reinhold-Hurek and Hurek, 2006). Попав внутрь корней, эндифитные бактерии далее могут системно инфицировать прилегающие ткани растения (Afzal et al., 2019).

Кроме корневой системы эндифитные бактерии проникают в растения также через надземные части растений, включая стебли, листья, цветы. Входными «воротами» для эндифитов могут быть естественные отверстия, такие как устьица, чечевички, пыльцевая трубка. В некоторых случаях эндифиты могут передаваться вертикально, проникая в семена или горизонтально, через вегетативное размножение (Frank et al., 2017; Luo et al., 2019).

Паттерны бактериальной колонизации до сих пор в основном изучались на злаках (например, рисе) с использованием культивируемых модельных штаммов. Одним из наиболее популярных подходов визуализации колонизации бактерий в тканях растений является флуоресцентная гибридизация (FISH) с использованием генного репортера (например, *gfp* или *gus*). Показано (Compant et al., 2010), что появляющиеся боковые корни растений прорываются через эпидермис, кору, эндодерму, пояски каспари и перицикл, тем самым естественным образом образуя «дорогу» для бактерий. Оттуда бактерии могут далее проникать во флоэму и сосуды ксилемы, которые транспортируют фотосинтаты (флоэма), питательные вещества и воду (ксилему) Бактерии, колонизирующие проводящие ткани корня, могут в дальнейшем перемещаться к побегам и листьям за счет транспирации растений.

Что касается бактерий в филосфере, есть данные о том, что они могут проникать в филлосферу через естественные отверстия (например, устьица, гидатоды), раны и трещины, образованные ветром, атаками насекомых и патогенов. В листе бактерии могут колонизировать клетки верхнего эпидермиса, клетки палисадного мезофилла, сосуды ксилемы, а также пространство между клетками губчатого слоя мезофилла (Vorholt, 2012). Бактерии также обнаружены в репродуктивных органах растений, таких как цветы, плоды и семена, но в небольшом количестве (Compant et al., 2011; Truyens et al., 2015). В соответствии с этим Compant с соавт. (2011) визуализировал колонизацию *Pseudomonas* sp. и *Bacillus* sp. в виноградной лозе с помощью метода FISH и обнаружил, что эти бактерии колонизируют эпидермис и ксилему, межклеточные пространства клеток и вдоль клеточных стенок внутри семян. Другим примером является штамм *Streptomyces mutabilis* IA1, который колонизирует область внутри зерновки, вплоть до эндокарпового слоя семян пшеницы (Toumatia et al., 2016).

1.5. Механизмы проникновения эндофитов в растительные ткани

Подвижность, хемотаксис, выработка ферментов, разрушающих клеточную стенку, и образование липополисахаридов являются одними из основных факторов, способствующих заселению растений и жизни внутри них (Pigomyou et al., 2015). С позиции эндофитности, как специфического свойства микроорганизма, вероятно, что за время совместной эволюции с растениями эндофитные бактерии могли приобрести определенные свойства, которые позволяют им вторгаться внутрь растений и перемещаться в тканях. Важность этих свойств подтверждена сравнительной геномикой, метагеномикой и транскриптомным анализом в сочетании с мутационными исследованиями. Согласно цитируемым авторам, бактерии могут регулировать экспрессию генов при заражении и колонизации растений. Это продемонстрировано активностью генов, кодирующих белки, связанные с подвижностью, хемотаксисом и адгезией бактерий, которые индуцируются, например, у *Burkholderia kururiensis* M130 в присутствии экстрактов растений риса (Coutinho et al., 2015). Жгутики бактерий, которые часто

действуют как мощный микроб-ассоциированный молекулярный паттерн (ММП) для распознавания иммунной системой, также могут играть роль в проникновении в ткани, обеспечивая бактериальный хемотаксис и закрепление на поверхности растений (Buschart et al., 2012). Кроме того, адгезия к поверхности корня также может быть решающим фактором для заражения растений бактериями (Dorr et al., 1998).

Бактериальные ферменты, разрушающие клеточную стенку растений, также важны для проникания в растительные ткани. Гены, кодирующие ферменты, разрушающие растительные клеточные стенки, широко встречаются в геномах эндофитных бактерий (Straub et al., 2013). Например, гены целлюлаз, ксиланаз, целлюлозогидролаз, эндоглюканаз и целлюлозосвязывающих белков обнаружены в большом количестве копий в метагеноме эндофитных бактериальных сообществ корней риса (Sessitsch et al., 2012). Исследования *in vitro* подтвердили, что эндоглюканазы имеют решающее значение в колонизации рисовых корней для *Azoarcus* sp. (Reinhold-Hurek et al., 2006). Чтобы проникать внутрь симпласта и перемещаться, эндофитные бактерии также могут секретировать пектиназы для разрушения срединной стенки между растительными клетками. Так, было обнаружено, что пектиназа является важным детерминантом, модулирующим раннюю инфекцию PGPB *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 у риса, который первоначально сформировал симбиотические отношения с бобовым сорняком *Aeschynomene americana* (Piromyou et al., 2015). В дополнение к вышеупомянутым признакам Kost с соавт. (2014) обнаружили, что оксалотрофия - способность использовать оксалат в качестве источника углерода, необходима для успешной колонизации клетками *B. phytofirmans* PsJN растений люпина и кукурузы. Сообщалось, что оксалотрофия связана только с полезными для растений видами *B. phytofirmans*, в то время как фитопатогенные или условно-патогенные для человека виды рода *Burkholderia* не могут использовать оксалат (Kost et al., 2014). Это исследование определяет роль оксалата в отборе растений для получения полезных эндофитов, избегая при этом патогенных бактерий из сложных сообществ почвенных бактерий.

На основе приведенных выше фактов можно утверждать, что эндофитность является отдельным, особым свойством некоторых представителей различных видов бактерий, что еще раз подтверждает правомерность нашего предложения, что в определении «эндофит» следует указывать способность проникать в ткани растений не пассивным способом, а самостоятельно.

1.6. Биологическая активность эндофитов и механизмы ее проявления

В настоящее время микробиологические средства, применяемые в растениеводстве, довольно широко распространены в мире. Например, в Индии зарегистрировано более 970 микробиологических препаратов (Kumar et al., 2019), а в США 356 активных ингредиентов биопестицидов, включающих 57 видов и/или штаммов микроорганизмов или их продуктов, направленных только против размножения насекомых, клещей и нематод (Arthurs et al., 2019). В России зарегистрировано менее 20 биоинсектицидов и биофунгицидов (Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2020).

В состав действующих агентов биоконтроля вредителей и фитопатогенов кроме свободноживущих бактерий могут входить и эндофитные бактерии. Преимущество использования препаратов на основе эндофитов основано на том, что при обработке растений этими бактериями эти микроорганизмы в течение всей вегетации хозяина находятся в тесном контакте с ним, не элиминируясь, как химические вещества, а также способны избегать конкуренции с аборигенной микрофлорой за экологические ниши. Было показано, что эндофитные бактерии прямо или косвенно оказывают положительные эффекты на своих растительных хозяев. Они могут принести пользу растениям напрямую, помогая им получать питательные вещества из почвы (фосфатмобилизаторы) и улучшать рост за счет модуляции уровня фитогормонов и других рострегулирующих веществ, которые могут помочь растениям лучше расти в стрессовых условиях (Ma et al., 2016). Косвенно эндофитные бактерии способны улучшать рост растений, препятствуя развитию фитопатогенов, используя такие механизмы, как выработка

антибиотиков и литических ферментов, недоступность питательных веществ для патогенов и запуск защитных механизмов растений, тем самым защищая растения от атак патогенов. В связи с этим интерес к эндофитам неуклонно возрастает. При этом, кроме «классических» направлений поиска эндофитов с фунгицидными и инсектицидными свойствами для биологической защиты растений, все большее внимание уделяется поиску эндофитов с антивирусной активностью. Например, показано, что препарат бактерий *B. amyloliquefaciens* 5B6, изолированных из растений вишни, способен защищать растения табака *Nicotiana benthamiana* и перца от вируса огуречной мозаики (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Lee et al., 2016). Эффективными препаратами для защиты растений от вирусной инфекции могут быть средства на основе инсектицидных эндофитов, так как переносчиками вирусов растений являются насекомые. Кроме этого, индукция общей или системной устойчивости растений эндофитами также может служить основой защиты от различных видов фитопатогенов. Так, в работе (Valenzuela-Soto et al., 2010) показано, что обработка корней томата (*Solanum lycopersicum*) бактериями *B. subtilis* BsDN, выделенными из корней растений этого вида способствовала стимуляции роста и запуску индуцированной системной устойчивости (ISR) против насекомого – белокрылки.

Как уже отмечалось выше, чаще всего в растительных тканях встречаются представители рода *Bacillus*. Анализ патентной информации (Lu, 2015; Wang M., Zhang Q., 2017; Akira Kiso, Daiki Yuki, 2006) позволяет насчитать не менее 19 видов этой бактерии, которые способны служить основой не только фунгицидных или инсектицидных, но и вирицидных препаратов, включая следующие виды: *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. vallismortis*, *B. velezensis*. В Российской Федерации пока известен лишь один препарат на основе эндофитной бактерии *B. subtilis* 26Д – Фитоспорин-М производства ООО «БашИнком».

Использование биопрепаратов на основе эндофитных и других бактерий может быть потенциальной стратегией защиты растений в дополнение к химическим методам. В связи с этим представляет интерес биологическая активность эндофитов, способствующая применению их в растениеводстве.

Производство антибиотиков. Способность бактерий синтезировать различные противомикробные соединения широко изучается для подавления роста фитопатогенных организмов (Liu et al., 2017). *Pseudomonas* и *Bacillus* - основные роды бактерий, изученные на предмет их способности продуцировать антибиотики, такие как 2,4-диацетилфлороглюциновая кислота, феназин-1-карбоновая кислота, феназин-1-карбоксамид, пиолутеорин, пирролнитрин, оомицин А, вискозинамид, рамнолипиды, цепациамид А, экомицины, псевдомононовая кислота, азомицин и цепафунгины, сурфактины, итурины, фенгицины и другие липопептиды (Santoyo et al., 2019; Walia et al., 2021)

Бактерии рода *Pseudomonas* производят широкий спектр антибиотиков, которые способствуют подавлению фитопатогенов. Например, *P. fluorescens* продуцирует пиолутеорин и 2,4-диацетилфлороглюцин, подавляющие корневую гниль табака, вызванную *Thielaviopsis basicola*, а также болезнь пшеницы, вызываемую грибом *Gaeumannomyces graminis*. Пиолутеорин и пирролнитрин эффективно подавляют болезнь кресс-салата, вызываемую *Pythium ultimum* и *Rhizoctonia solani*, соответственно (Milner et al., 2019).

Широко исследуется также активность липопептидных антибиотиков, синтезируемых бациллами. Эти молекулы состоят из циклического пептида, связанного с цепью β -гидрокси или β -амино жирных кислот, которые классифицируются на 3 различных семейства (итурины, фенгицины и сурфактины) в зависимости от их аминокислотной последовательности и длины остатков цепи жирных кислот (Valenzuela-Ruiz et al., 2020). Липопептиды синтезируются мультиферментными комплексами, называемыми нерибосомальной пептидной синтетазой (NRPS), которые не зависят от матричной РНК (Valenzuela-Ruiz et al., 2019). Coutte с соавт. (2017) сообщают о 263 различных липопептидах, синтезируемых 11 родами микробов, среди

которых род *Bacillus* был наиболее распространенным продуцентом не менее 98 различных соединений, с помощью которых можно контролировать рост широкого спектра фитопатогенов (бактерий, грибов и оомицетов). Липопептиды способны непосредственно защищать растения от фитопатогенов, подавляя их рост, либо опосредованно, вызывая системную устойчивость (Hashem et al., 2019). Так, показано, что некоторые штаммы *Bacillus*, продуцирующие сурфактин, могут вызывать ISR к грибу *Botrytis cinerea* (Toral et al., 2018). Кроме того, недавно была показана афицидная активность сурфактина, продуцируемого *B. subtilis* (Khedher et al., 2017)

Фенолы - еще одна группа антибиотических веществ, через синтез которых бактерии способны контролировать численность фитопатогенов в фитоценозах. Например, Gao Zhenbeng с соавт. (2017) сообщали, что летучие органические соединения пиазин (2,5-диметил), бензотиазол, фенол (4-хлор-3-метил) и фенол-2,4-бис (1,1-диметилэтил), продуцируемые *Bacillus velezensis* ZSY-1 проявляют значительную противогрибковую активность в отношении *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Valsa mali*, *Monilinia fructicola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsicum* и *Colletotrichum lindemuthianum*.

Продукция литических ферментов. Эти ферменты участвуют в деградации клеточных стенок фитопатогенных микроорганизмов, являясь одним из наиболее известных участников механизмов биологического контроля, главным образом против грибковых патогенов (Villarreal-Delgado et al., 2018). Клеточная стенка грибов (включая патогены растений) состоит из гликопротеинов, полисахаридов и других компонентов, состав которых варьирует в зависимости от вида грибов (Bowman and Free, 2006). Эти полисахариды играют определяющую структурную роль в жесткости клеточной стенки, а литические ферменты бактерий способны разрушать их, вызывая их лизис и гибель клеток фитопатогенных грибов (Jadhav et al., 2017). К наиболее изученным литическим ферментам относятся хитиназы, целлюлазы, протеазы и β -1,3-глюканазы, которые модифицируют, перфорируют и / или разрушают клеточную стенку грибов (Mota et al., 2017). Например, штаммы *Pseudomonas*, выделенные из ризосферы нута, продуцируют хитиназы и

целлюлазы с антагонистической активностью против *Rhizoctonia solani* и *Pythium aphanidermatum* (Sindhu and Dadarwal, 2001). Таким образом, литические ферменты совместно с антибиотиками представляют собой высокоактивную систему биоконтроля микроорганизмов, в основном грибов, способных вызывать болезни растений.

Производство δ -эндотоксинов. δ -эндотоксины, продуцируемые *Bacillus thuringiensis* (Bt), представляют собой белки параспоральных телец, состоящие из полипептидных единиц разной молекулярной массы, от 27 до 140 кДа (Villarreal-Delgado et al., 2018). Bt-токсины образуются во время фазы споруляции. Белок Cry (кристаллический токсин) известен своим специфическим действием на организм-мишень, большинство из которых относится к отряду насекомых. Механизм действия белков Cry начинается после того, как они расщепляются с помощью протеаз, которые находятся в средней кишке хозяина, разрывающих цепи аминокислот в N-концевой области и на C-конце (в зависимости от природы белок Cry) и, таким образом, высвобождая активные и токсичные фрагменты, которые взаимодействуют с рецепторными белками, присутствующими в клетках кишечника насекомого, сигнализируя об образовании олигомерной структуры и, следовательно, литической поры, которая генерирует осмотический дисбаланс, а затем разрушая эпителий кишечника и, как следствие, вызывая гибель клеток (Ху et al., 2014). В настоящее время в сельском хозяйстве используются различные штаммы Bt, некоторые являются факультативными бактериальными эндофитами (Pohare et al., 2021). Согласно Palma (2017), синтез инсектотоксичных Bt-белков в рекомбинантных линиях на основе эндофитных липопептид-продуцирующих штаммов *B. subtilis* является одним из наиболее подходящих способов разработки современных экологически чистых средств биоконтроля для защиты растений

Производство сидерофоров. Сидерофоры - это вторичные метаболиты, которые действуют как секвестранты железа из-за их высокой константы диссоциации этим элементом (Hider and Kong, 2010). Согласно авторам, агенты биологического контроля, продуцирующие сидерофоры, могут использовать железо с помощью двух механизмов: 1) непосредственно через комплекс Fe^{3+} -

сидерофор через клеточную мембрану или 2) восстанавливаются внеклеточно до комплексов Fe^{2+} . Сидерофоры продуцируются в ответ на уменьшение доступности железа в окружающей среде. Это позволяет бактериям регулировать концентрацию ионов металла в среде обитания, в результате чего железо становится недоступным для фитопатогенных микроорганизмов, ограничивается их рост (Kannoji et al., 2019). В настоящее время сообщается о способности различных бактерий контролировать болезни растений посредством продукции сидерофоров, ограничивая рост и колонизацию железозависимых фитопатогенных микроорганизмов (Fgaier and Eberl, 2011). Yu с соавт. (2011) сообщили, что *B. subtilis* CAS15 за счет продукции сидерофоров противодействует росту 15 грибковых фитопатогенов, принадлежащих к роду *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pythium*, *Magnaporthe* и *Phytophthora*. Reinhold-Hurek и Hurek (1998) в своей работе подробно описали роль сидерофоров в растениях и показали, что эндофитные бактерии могут синтезировать сидерофоры, чтобы создать необходимую концентрацию железа во внутренней части корня растений, которая характеризовалась ограниченной биодоступностью этого элемента.

Обеспечение элементами минерального питания. Растворение фосфатов.

Эндофиты, наряду со свободноживущими бактериями различных видов, способны обеспечить доступность фосфора для растений благодаря способности растворять фосфаты металлов, используя такие механизмы, как подкисление, хелатирование, ионный обмен и продукция органических кислот (Nautiyal et al., 2000). Применение таких бактерий в качестве инокулянтов семян увеличивает поглощение фосфора растениями, тем самым увеличивая урожайность с.-х. культур (Walia et al., 2017). В научной литературе сообщается о фосфатмобилизирующей активности представителей рода *Bacillus*, например, Matos с соавт., (2017), а также других видов - *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* (Egamberdieva et al., 2017; Wu et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Фиксация азота. Азот имеет решающее значение для роста растений. Считается, что приблизительно до 50% поступления азота в растения в посевах,

обеспечивается почвенными микроорганизмами (Lehnert et al., 2018). Роль эндофитных бактерий в круговороте азота подтверждается данными о том, что фиксация N_2 эндофитными бактериями наблюдается у многих субальпийских видов хвойных (Moyes et al., 2016). Например, N-фиксирующий изолят *Raenibacillus polytuха* P2b-2R, выделенный из ткани сосны, был способен колонизировать ткани кукурузы и стимулировать рост растений (Puri et al., 2016). Согласно Liu с соавт. (2017), в какой степени бактериальные эндофиты вносят вклад в общий пул растительного азота, еще предстоит исследовать.

Регуляция уровня фитогормонов. Эндофиты способны регулировать в растениях концентрацию гормонов, таких как ауксины, цитокинины и этилен. Наиболее известным механизмом, который преимущественно используется для объяснения положительного воздействия RGPB на рост растений, является их способность продуцировать ауксин. Считается, что ауксин - индол-3-уксусная кислота (ИУК) - это мощная сигнальная молекула, необходимая для взаимодействия растений с микробами и непосредственного улучшения роста растений (Matsuda et al., 2018). Бактериальная ИУК может изменять пул ауксинов в растительных тканях до оптимального уровня и, следовательно, улучшать рост корней растений, особенно вторичных, тем самым увеличивая площадь их поверхности, что способствует улучшению минерального питания растений и, следовательно, приводит к лучшему росту и урожайности растений (Olanrewaju et al., 2017).

Еще один важный механизм, способствующий росту растений с помощью RGPB - это снижение уровня этилена в растениях, который является гормоном, вырабатываемым растительными клетками в определенных стрессовых условиях, таких как подтопление и окислительный стресс, засуха, засоление, инфекция, вызванная патогенами (Gamalero and Glick, 2020), и который ингибирует многие физиологические процессы у растений, в том числе рост и развитие. Регуляция уровня этилена бактериями обеспечивается продукцией ими фермента АСС-дезаминазы (1-аминоциклопропан-1-карбоксилат) – предшественника этилена (Orozco-Mosqueda and Santoyo, 2021). АСС-дезаминаза разлагает молекулу АСС

до α -кетобутирата и аммиака, и, следовательно, в условиях стресса или атаки фитопатогенов растения уменьшают продукцию этилена, что, в свою очередь, способствует росту растений (Santoyo et al., 2020). Инокуляция растений продуцентами АСС-дезаминазы может снижать уровень этилена в растениях и, следовательно, повышать устойчивость растений к стрессам. Создание трансгенных растений, сверхэкспрессирующих гены этого бактериального фермента представляет собой многообещающую стратегию преодоления стрессового этилена у растений в стрессовых условиях (Glick, 2014).

Индукция системного ответа (ISR) у растений. Системная устойчивость растений, инокулированных эндофитами, к действию различных абиотических и биотических стресс-факторов может быть вызвана бактериальными химическими сигналами (элиситорами), передача которых опосредована жасмоновой кислотой или этиленом (Kannoja et al., 2019). До сих пор описаны не все молекулярные механизмы, регулирующие взаимодействия растений и эндофитов, однако основные пути, с помощью которых эти бактериальные агенты регулируют ISR в растениях, были идентифицированы как фитогормоны, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), связанные с микробами молекулярные паттерны (MAMP), некоторые элиситоры, сидерофоры, фитазы, микроРНК и др. (Abdul Malik et al., 2020; Rodriguez et al., 2019). Индукция ISR бактериями была выявлена у различных культур (бобы, гвоздика, огурец, редис, табак, томаты, Kannoja et al., 2019). Например, развитие ISR было установлено в растениях табака, в которых белки, связанные с патогенезом, PR2 (кодирует β -1,3-глюканазу) и PR3 (кодирует хитиназу) активировались в ответ на летучие соединения, продуцируемые бактериями *Bacillus*, придавая устойчивость к *Rhizoctonia solani* и *Phytophthora nicotianae* (Kim et al., 2015). Решающую роль в индуцированной устойчивости растения к фитопатогенам играют также сами фитогормоны, продуцируемые бактериями, как важные сигнальные молекулы, как для локальных, так и для системных ответов (Pangesti et al., 2017; Rashid and Chung, 2017).

Продукция РНКаз и антивирусная активность. Вирусные заболевания наносят значительный ущерб растениеводству, а препараты, эффективно

подавляющие вирусные инфекции у растений, до сих пор отсутствуют. Например, растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) поражают более 40 видов вирусов, значительно уменьшая продуктивность и ухудшая качество клубней (Makarova et al., 2017). Наиболее распространенными вредоносными вирусами картофеля являются вирус скручивания листьев картофеля (PLRV), вирус картофеля Y (PVY), вирус картофеля A (PVA), вирус картофеля X (PVX), вирус картофеля S (PVS) и вирус картофеля M (PVM). Для освобождения семенного материала от вирусной инфекции используется культура верхушечных меристем, а преобладающим способом уменьшения степени распространения вирусных инфекций на посевах сельскохозяйственных культур является борьба с насекомыми-переносчиками.

Геномным материалом большинства вредоносных вирусов высших растений является РНК. Поэтому, одной из возможных мер борьбы с вирусами может быть использование бактериальных рибонуклеаз (РНКаза), которые могут расщеплять РНК в вирусном геноме (Sorokan et al., 2020). Как уже сообщалось выше, эндофиты, продуцирующие РНКазы, как основа противовирусных биопрепаратов, могут иметь преимущество перед бактериями, населяющими ризо-или филлосферу, поскольку эндофитные бактерии находятся внутри растений, непосредственно контактируя с растительными клетками.

Секреция РНКаз может быть одним из механизмов адаптации бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды, например, дефициту фосфора, так как РНКазы участвуют в мобилизации органических фосфатов, в связи с чем, а также с противовирусной активностью свойства *B. pumilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* продуцировать внеклеточные РНКазы (биназы, барназы и балифазы соответственно) активно исследуются (Ильинская и др., 2018). Установлено также, что в небольших концентрациях РНКазы способны стимулировать рост растений и устойчивость к широкому спектру стрессовых факторов, а высокие их уровни проявляют противовирусные свойства, разрушая вирусную РНК. Например, показана сильная положительная корреляция между активностью РНКазы у разных сортов картофеля и их устойчивостью к PVX,

PVY, PVM и PVS (Трифопова и др., 2018). Экспрессия гена РНКазы РАС1 *Schizosaccharomyces pombe* в растениях сои приводила к значительно более высокому уровню неинфицированных экземпляров штаммом вируса мозаики китайской сои (SMV) SC3 по сравнению с немодифицированными растениями (Yang et al., 2019). Более ранние работы различных исследователей показали, что противовирусной активностью обладают бактерии *Bacillus*. Применение препаратов на основе бактерий *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. и *Burkholderia* sp. приводило к снижению частоты вирусного скручивания листьев хлопчатника (Ramzan et al., 2016). Zehnder et al. (2000) сообщили, что обработка семян и орошение почвы растений томатов видами *Bacillus* индуцировало устойчивость к вирусу мозаики огурца. Инокуляция растений бактериями *Bacillus* запускало синтез связанных с патогенезом белков (PR), хитиназы, b-1,3-глюканазы, пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланинаммиаклиазы, фенольные соединения, тем самым обеспечивая устойчивость растений банана к вирусной инфекции (Harish et al., 2009). Li и Riu (2016) сообщили, что опрыскивание листьев препаратом клеток *B. amyloliquefaciens* активировало гены, связанные с патогенезом, тем самым обеспечивая устойчивость растений перца к вирусу мозаики огурца. Выявлен также потенциал действия бактерий *Bacillus* против вируса крапчатости томатов (Murphy et al., 2000), некроза подсолнечника (Srinivasan and Mathivanan, 2009), вируса мозаики огурца (Zehnder et al., 2000) и мозаики томатов (Husseini et al., 2016).

Таким образом, эндофитные бактерии могут действовать как агенты биорегулирования численности фитопатогенных микроорганизмов (Sawarkar et al., 2021), насекомых (Sorokan et al., 2020), нематод (Hallman et al., 1997; Moslehi et al., 2021), распространения вирусной инфекции и стимулировать рост растений, придавая им устойчивость к стрессам (Olanrewaju et al., 2017). Наряду с перечисленными выше свойствами, эндофиты способны к деградации ксенобиотиков, удалению загрязняющих почву соединений и фиторемедиации (He et al., 2020) или могут играть роль в улучшении плодородия почвы через растворение фосфатов и фиксацию азота (Mello et al., 2019).

1.7. Действие оксикоричных кислот на бактерии.

Если действие бактериальных метаболитов на растительные клетки или организм в целом детально исследуется, то в противоположность, действие растительных соединений на бактериальные клетки, особенно в аспекте взаимодействия растение-эндифит изучено недостаточно.

Так как во многих источниках эндифитность обсуждается в связи с механическими повреждениями у растений, особый интерес вызывает действие растительных соединений, образующихся при поранениях, повреждении насекомыми, обработке посевов машинами, сборе урожая.

Одними из таких растительных соединений являются оксикоричные кислоты (ОК), представляющие собой моноциклические фенилпропаноидные соединения со скелетом C_6-C_3 . Это гидроксильные производные коричной кислоты, включающие коричную кислоту, кумаровую кислоту, кофейную кислоту, феруловую кислоту (ФК) и их изомеры. ОК – основные предшественники биосинтеза лигнина, который является полимером, «цементирующим» раневую поверхность растительных тканей, и есть множество доказательств, что ОК участвуют во взаимодействии между фитопатогенами и растениями-хозяевами: многие растения могут выделять синтезированные *de novo* ОК в ризосферу в ответ на атаку фитопатогенов, инфицирующих корни (Lanoue et al., 2010; Wallis and Chen, 2012). ОК в целом являются противомикробными соединениями, поскольку они могут нарушать целостность мембран и разъединять градиент дыхательных протонов (Fitzgerald et al., 2004; Harris et al., 2010). Вместе с тем некоторые фитопатогены могут защищать себя от токсичности ОК, разрушая их, если они в небольшой концентрации, и использовать как единственного источника углерода. Сообщается, что этот процесс может способствовать развитию болезни у растений-хозяев (Lowe et al., 2015).

Бактерии используют системы секреции для взаимодействия с клетками-хозяевами и введения факторов вирулентности, так называемых эффекторов типа III (T3SS), в цитозоль хозяина, чтобы подавить врожденный иммунитет растений и вызвать заболевание (Cunnac et al., 2004; Angot et al., 2006; Jones and Dangl,

2006). Известно, что ОК способны играть важную роль во взаимодействии растений с бактериальными клетками с участием подобных эффекторов. В исследовании Zhang с соавт. (2017) обнаружено, что среди ОК только феруловая кислота (ФК) может существенно влиять на экспрессию T3SS у фитопатогенного штамма *R. solanacearum*. ФК представляет собой 3-метокси-4-гидроксикоричную кислоту, а радикал 3-метокси в коричной кислоте является ее основным отличием от других ОК.

Другие фенольные соединения растений и их производные были охарактеризованы как индукторы или как ингибиторы экспрессии T3SS у некоторых бактериальных патогенов. Например, ферулат и некоторые фенольные соединения могут вызывать экспрессию у агробактерий некоторых *vir*-генов, а флавоноиды могут индуцировать экспрессию у ризобий генов *nod* (Bhattacharya et al, 2010). Интересно, что некоторые такие индукторы при более высоких концентрациях активнее индуцируют экспрессию T3SS. Это согласуется с тем, что индукция экспрессии генов фитопатогена зависит от концентрации ФК (Zhang et al, 2017).

Например, при инфицировании обитающим в ксилеме грибовым патогеном сосудистого увядания *Fusarium oxysporum*, ФК и кумаровая кислота высвобождаются из сигнальных накапливающих фенолы клеток и накапливаются в ксилеме корней и стеблей томатов *Lycopersici sp.* (Mandal and Mitra, 2008). Несмотря на то, что концентрации ОК, необходимые для ингибирования роста бактерий *in vitro*, в 10-100 раз выше, чем измеренные в растении, концентрации ОК в ксилеме корней и стеблей могут быть локально высокими там, где они высвобождаются накапливающими клетками (Beckman, 2000; Alvarez et al., 2008; Wallis, Chen, 2012). Показано, что экзогенно добавленной ФК сложно увеличить экспрессию T3SS в растении до более высокого уровня, в сравнении с естественным процессом накопления ОК в растительных тканях (Zhang et al, 2017).

В настоящее время функциональная роль ФК, как одного из ключевого соединения в структуре клеточной стенки растений (De Oliveira et al, 2015),

довольно детально исследована. Хорошо известно, что эти соединения являются структурными компонентами лигнина – сложного полимера, входящего в состав клеточных стенок растений. Лигнин весьма трудно поддается деструкции ферментами микроорганизмов, вследствие чего его считают своеобразным защитным барьером растительной клетки на пути продвижения инфекционных структур фитопатогенов. Активный синтез лигнина наблюдается при поранении растительных тканей, а также атаке грибных и бактериальных фитопатогенов (Zhao et al, 2016). Кроме механической барьерной функции лигнин может играть роль защитного химического барьера, так как при его разрушении таким ферментами как, например, грибные лакказы (Johannes et al, 2000) могут высвобождаться олигомеры и мономеры ОК, которые в высоких концентрациях обладают бактериостатической активностью в отношении условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes* (Merkl et al, 2010).

Несомненно, мономерные формы ОК должны присутствовать не только при разрушении, но и при активизации синтеза лигнина, т.е. в ходе естественного физиологического процесса роста и старения клеток растений, а также при указанных выше действиях экзогенных факторов – поранениях, атаке фитопатогенных микроорганизмов. В связи с этим интересно поведение мутуалистических бактерий-эндофитов, населяющих внутренние ткани растений, при изменении концентрации ОК в растительных тканях. Однако таких данных мы не встречали в известной нам научной литературе.

Обзор научной литературы, посвященной исследованию эндофитности бактерий, позволяет заключить, что одним из основных свойств эндофитов большинство авторов считают способность не вызывать у растений симптомов болезни. В случае хозяйственного использования эндофитов предпочтение отдается способности их стимулировать рост, продуктивность и устойчивость сельскохозяйственных культур к неблагоприятным факторам среды. Дискуссионными в вопросе, связанном с эндофитностью, остаются пути

проникновения таких бактерий в растительные ткани. Одни авторы считают, что основным путем внедрения являются механические повреждения, другие связывают эндофитность со специфичностью взаимодействия бактериального и растительного геномов. Следует обратить внимание на то, что если действие бактериальных метаболитов на сельскохозяйственные растения довольно интенсивно исследуется, что объясняется использованием продуктов растениеводства в пищу и в других областях жизнедеятельности человека, то влияние растительных веществ на эндофитные бактерии остается малоизученным вопросом. Так как механические повреждения растений открывают путь в растительные ткани широкому кругу микроорганизмов, являясь также основным путем проникновения вирусных патогенов, представляет интерес влияние метаболитов растений, связанных с повреждением и восстановлением клеточных стенок растений – лигнификацией, на рост и размножение бактерий, особенно эндофитных.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили штаммы бактерий из коллекции ИБГ УФИЦ РАН: *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ 128), *B. subtilis* 11ВМ (ВНИИСХМ 519), *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689), *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066), *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-5351).

Растительные объекты, из которых выделяли бактерии: морковь (*Daucus carota* subsp. *sativus*), капуста (*Brassica oleracea* var. *acephala*), редис (*Raphanus sativus* var. *sativus*), огурец (*Cucumis sativus*), петрушка (*Petroselinum crispum*), укроп (*Anethum graveolens*), салат (*Lactuca sativa*), яблоня (*Malus domestica*), слива (*Prunus domestica*), чистотел (*Chelidonium majus*), щавель (*Rumex acetosa*), ревень (*Rheum officinale*), картофель (*Solanum tuberosum*), пшеница (*Triticum aestivum* L.).

В экспериментах по клонированию генов применялись штаммы компетентных клеток *E. coli* – NEB10. Для получения экспрессионных конструкций использовалась плазмида широкого круга хозяев pDG1662, предоставленная сотрудниками кафедры микробиологии Казанского Федерального университета (Казань, Россия) д.б.н. О.Н. Ильинской и М.Р.Шариповой, за что автор выражает им благодарность.

Фитопатогенные грибы *Fusarium sporotrichioides* Sherb., *Fusarium oxysporum* Schldt., *Fusarium avenaceum* Sacc., *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium solani* Mart., *Fusarium poae* Wollen., *Bipolaris sorokiniana* Shoem. (*Helminthosporium sativum* Pammel.), *Stagonospora nodorum* Berk., *Phytophthora infestans* Mont., *Alternaria alternata* Keissl., *Alternaria solani* Sorauer., *Alternaria brassicicola* Schwein., *Rhizopus oryzae* Went & Prins.Geerl. взяты из коллекции ИБГ УФИЦ РАН.

2.2. Среда и субстраты для культивирования

Для выращивания культур бактерий рода *Bacillus*, а также выделенных эндофитов использовали следующие среды:

LB: 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, 1,5 % бактериологический агар;

КГА: картофельный отвар (200 г картофеля на 1 л воды), 2% декстроза, 1,5 % бак. агар.

МПБ: мясной отвар (500 г мяса на 1 литр воды), 1% бактопептон, 5% NaCl.

ПСС: 0,03% K_2HPO_4 , 0,2% $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% $Na_3C_6H_5O_7$, 0,0005% $CuSO_4$, 0,0004 $ZnSO_4$, 0,0005% $FeSO_4$, 0,02% $CaCl_2$, 0,005% $MnSO_4$, 0,03% $MgSO_4$, 0,5% бактопептон, 0,5 % декстроза, 2% бак. агар.

Использование цитрата бактериями определяли на среде Козера: 0,5% NaCl, 0,02% $MgSO_4$, 0,1% $NH_4H_2PO_4$, 0,1% K_2HPO_4 , 0,2% $Na_3C_6H_5O_7$, 2% бак. агар.

Способность штаммов *B. subtilis* к мобилизации неорганических фосфатов проверяли на среде Муромцева: 1% глюкоза, 0,1% аспарагин, 0,02% K_2SO_4 , 0,02% $MgSO_4$, 0,002% кукурузный экстракт, 2% бак. агар, pH – 6,8. В качестве единственного источника фосфора в среду добавляли $Ca_3(PO_4)_2$ из расчета 5г/л.

Для выращивания культур бактерий *Lactobacillus plantarum* использовали модифицированные питательные среды MPC (среда J.C. De Man, M. Rogosa и E. Sharpe) и Рогоза (M. Rogosa), жидкие и плотные (содержащие 1,5% агара).

Состав среды MPC: 0,8% мясной экстракт, 0,4% дрожжевой экстракт, 0,2% $(NH_4)_3C_6H_5O_7$, 0,02% $MgSO_4$, 1% бактопептон, 0,5% CH_3COONa , 0,2% K_2HPO_4 , 0,1% твин-80, 0,005% $MnSO_4$.

Состав среды Рогоза: 1,5% CH_3COONa ; 1% декстроза, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% арабиноза, 0,1% сорбитана моноолеат, 0,012% $MnSO_4$, 1% бактотриптон, 0,6% KH_2PO_4 , 0,5% сахароза, 0,2% $(NH_4)_3C_6H_5O_7$, 0,057% $MgSO_4$, 0,003% $FeSO_4$.

Добавки асептически вносили в стерильную среду. В качестве селективных антибиотиков при трансформации использовали ампициллин 50 мкг/мл («Sigma», США) хлорамфеникол 5 мкг/мл («PanReas», Испания), спектиномицин 100 мкг/мл («Sigma», США).

Чистоту культур контролировали высевом на агаризованную среду LB.

2.3. Условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик

Культивирование в жидких средах проводили в колбах Эрленмейера (объемом 100-500 мл) в 20-100 мл среды при температурном режиме +27...+37 °С с аэрацией на термошейкере ES-20 («Biosan», Латвия) 140 об/мин. Концентрацию жизнеспособных спор и чистоту культур определяли методом десятичных разведений с последующим высевом на агаризованную среду LB как количество колониобразующих единиц в 1 мл культуры (КОЕ/мл). Культивирование бактерий на агаризованных средах в чашках Петри осуществляли в термостате при температуре +27...+37 °С.

2.4. Олигонуклеотидные праймеры, использованные при проведении ПЦР

Подбор праймеров проводился на основе нуклеотидных последовательностей гена с использованием программы Primer Select из пакета компьютерных программ Lasergene фирмы «DNASTAR, Inc.» (США). При выборе праймеров для клонирования полноразмерного гена учитывали температуру их отжига, отсутствие образования неспецифических продуктов амплификации, «шпилек» и «залипания» праймеров друг на друга.

Для обозначения использованных в работе олигонуклеотидных праймеров сохранена аббревиатура, данная каждому олигонуклеотиду их производителем («Синтол», Россия).

Генетический полиморфизм штаммов оценивали по результатам амплификации тотальной ДНК со случайным праймером:

5'-GGG-CGC-TG -3' (Lmbd, (Baumiev et al., 2011))

Родовую принадлежность изолятов идентифицировали с использованием специфичных праймеров:

5'-ACC-AGA-AAG-CCA-CGG-CTA-ACT-AC-3' (BacF)

5'-GGC-GGA-AAC-CCC-CTA-ACA-CT-3' (BacR)

5'-AAC-TAG-CCG-TTG-GGA-GCC-TTG-A-3' (PsF)

5'-CAG-TCA-TGA-ATC-ACA-CCG-TGG-3' (PsR)

5'-ATG-TCG-ATT-TGG-AGG-TTG-TGC-C-3' (EntF)

5'-GAC-GTA-CTT-TAT-GAG-GTC-CGC-TTG-C-3' (EntR)

Анализ наличия в геноме бактерии *B. subtilis* 26Д последовательности нуклеотидов, аналогичных гену PAD оценивали с праймерами:

5'-CGA-CTG-GCA-CGG-ATG-TTT -3' (PadCF)

5'- TTT-TTC-GCG-GGA-TTC-TTT-CA-3' (PadCR)

Ген *cry1Ia* был амплифицирован с геномной ДНК *B. thuringiensis* ВКПМ-5351 с использованием праймеров:

5'-ATT-TAT-AGG-TGT-TTG-AAG-TTA-TTT-C-3' (CryF),

5'-ATT-TCA-TCC-TAC-ATC-TAA-TCA-CTC-3' (CryR).

Наличие вставки целевого гена *cry1Ia* определяли с использованием праймеров:

5'-AGG-TAT-TGG-TAT-TGC-GGG-TAA-AA-3' (CrySF),

5'-TGT-AAA-ACT-TGG-ATG-CGG-ATG-TA-3' (CrySR).

Наличие вставки целевого гена *sfp* определяли с использованием праймеров:

5'-ATG-AAG-ATT-TAC-GGA-ATT-TAT-ATG-3' (sfp1F),

5'- GAT-TTG-TCC-AAC-TGA-TAC-TGC -3' (sfp1R).

2.5. Выделение эндофитов из растительных тканей

Растительные органы или их части (стебля, корнеплода, корня) промывали в проточной воде, взвешивали, после чего стерилизовали 80%-ным этанолом в течение 5 минут и 3%-ным раствором перекиси водорода в течение 15 минут, промывали трижды стерильным физраствором. Образцы в стерильных условиях растирали в фарфоровых ступках с добавлением 2 мл физ. раствора (0,9% NaCl). Затем были выполнены два последовательных 10-кратных разведения полученного гомогената. Аликвоты (100 мкл) распределяли по поверхности LB с помощью микробиологической петли до полного высыхания. Затем чашки Петри инкубировали при 27°C в термостате ТС-1/20 СПУ (Смоленский СКТБ СПУ,

Россия) в течение 24 ч. Подсчитывали КОЕ в каждой чашке во втором и третьем разведениях и пересчитывали их количество на 1 г сырой массы растений.

2.6. Окрашивание бактерий по Граму

Бактериальную культуру наносили тонким слоем на предметное стекло, подсушивали, затем в течении 1-2 минуты окрашивали генциановым фиолетовым. Краситель смывали и обрабатывали раствором Люголя 1-2 минуты до почернения, сливали раствор Люголя, затем обрабатывали 0,5-1 минуты 96%-ым спиртом. Окрашивали 1-2 минуты фуксином. Готовые препараты микроскопировали, оценивали форму, цвет, размеры клеток и спор с помощью микроскопа «Микмед-2» (АО ЛОМО, Россия) с 10-кратным увеличением объектива.

2.7. Молекулярно-генетическая оценка различий между штаммами эндофитов и их видовой принадлежности

Выделение тотальной ДНК бактерий. Часть биомассы из каждой чашки Петри переносили в отдельную пробирку «эппендорф» и добавляли лизирующий буфер состава: 1% тритона X100, 1% Tween 20, 1% смолы Chelex 100 («Bio-Rad», США), 0,005% крезолового красного, вода. Содержимое пробирок перемешивали и прогревали при температуре 96-98°C в течение 10 мин, после чего еще раз перемешивали и центрифугировали при 14500 об/мин, 3 мин. Для дальнейшей работы использовали супернатант.

RAPD-анализ и ПЦР. Генетический полиморфизм штаммов оценивали по результатам амплификации тотальной ДНК со случайным праймером Lmbd. ПЦР проводили в пластиковых пробирках в 25 мкл реакционной смеси: вода – 9 мкл, смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (0,5 мМ) – 1,5 мкл, праймер (1 мкМ) – 1,5 мкл, 10-кратный ФБ – 1,5 мкл, Taq ДНК-полимераза («Sibenzim», Россия) – 0,25 мкл, раствор выделенной ДНК – 2,5 мкл.

Амплификацию проводили в амплификаторе типа «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) при следующих условиях: 1) 95°C, 2 мин – первичная

денатурация ДНК; 2) 95°C, 20 сек – денатурация, 37°C, 20 сек – отжиг праймеров, 72°C, 1 мин – элонгация ДНК (всего 35 циклов); 3) 72°C, 2 мин – достройка продуктов амплификации. По завершении амплификации из реакционной смеси отбирали аликвоту объемом 10 мкл и анализировали в агарозном геле.

Аналитический гель-электрофорез. Анализ и визуализацию продуктов, полученных в результате RAPD и ПЦР, проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле (1г агарозы, 100 мл 1xTAE буфера) в камерах Wide Mini Sub Cell GT («Bio-Rad», США) при 25кВ в течение 20-25 мин. В ячейки вносили по 7 мкл амплификата, при нанесении исследуемых проб на гель, добавляли к ним по 2 мкл буфера для нанесения. В качестве маркеров использовали фрагменты ДНК фага λ после расщепления рестриктазами BglI. После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 5 мин. Флуоресценцию нуклеиновых кислот наблюдали и регистрировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм при помощи системы гель-документации Gel Doc XR («Bio-Rad», США).

2.8. Анализ антагонистической активности эндофитов

К фитопатогенным грибам. Тест-объекты фитопатогенных грибов выращивали на КГА при 27°C, после образования мицелия с помощью бактериологической иглы вырезали агаровые блоки размером 5×5 мм. В другой чашке Петри на поверхность КГА высевали культуру исследуемого штамма в виде двух перпендикулярных друг другу штрихов и в центр каждого из четырех секторов переносили агаровые блоки с тест-объектами. Чашки помещали в термостат при 27°C на 3 дня.

О наличии и степени антагонистической активности у испытуемого штамма судили по величине радиуса зоны роста тест-объекта в сторону штрихов штамма (R_0) и в сторону краев чашки (R_k).

Эндофитов друг к другу. В эксперимент включали эндофитные штаммы *B. subtilis*, отличающиеся степенью проявления антагонизма по отношению к фитопатогенным грибам: высокоантагонистичные штаммы 11РН и 49РН, 26Д с

антагонизмом средней степени (11ВМ) и слабоантагонистичный штамм 161РН (Егоршина, 2012). В качестве тест-объектов брали 12 изолятов из различных растений, определенных, как минимум, до рода. Исследуемые штаммы *B. subtilis* выращивали на среде LB при 37°C в виде параллельных штрихов, через 24 ч к выросшим колониям высевали культуры тест объектов в виде перпендикулярных штрихов к линиям штаммов *B. subtilis*. Чашки помещали в термостат при 27°C на 3 дня. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемого штамма судили по отсутствию роста тест объекта на границе с испытуемым штаммом.

2.9. Изучение влияния антибиотиков на концентрацию клеток бактерий в растениях петрушки

Срезанные растения петрушки помещали в стакан с дистиллированной водой с добавлением бактериальной культуры в концентрации 1×10^3 КОЕ/мл. и добавлением антибиотика гентамицина сульфата в концентрации 20 мг/мл. Через 12 часов растения промывали в проточной воде, после чего стерилизовали и выделяли изоляты, как описано в разделе 2.5.

2.10. Изучение влияния механических повреждений на проникновение эндофитов в растения

На стерильных растениях картофеля. Для анализа использовали стерильные микрорастения картофеля (сорт Удача) в пробирках, выросшие в течение 25 дней при 16-часовом освещении («Osram» Лампы 36W / 77, Германия) в климатической камере KS200 (СПУ, Россия) на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС). На листья нижнего яруса микрорастений наносили 10 мкл суспензий бактерий двух штаммов, из которых один является эндофитным (*B. subtilis* 26Д), другой – неэндофитным (*B. thuringiensis* ВКПМ В-5689). В параллельном эксперименте часть листа искусственно повреждали нажимом пинцета, затем наносили

культуры бактерий. Через 72 ч растения поверхностно стерилизовали и выделяли изоляты, как описано в разделе 2.5.

После этого исходные бактерии сравнивались с выделенными с помощью RAPD-PCR.

На срезанных растениях укропа. Часть срезанных листьев примерно одной фазы развития и разного возраста, растущих на одном и том же участке, помещали в стакан с водопроводной водой так, что, примерно, 5-6 см черешка были полностью погружены в воду, в которую могли смываться эпифитные бактерии. Через 24 ч листья поверхностно стерилизовали и выделяли изоляты, как описано в разделе 2.5.

На проростках редиса. Семена редиса высевали в открытом грунте и в лаборатории (закрытый грунт) на одном и том же образце почвы. Через 7 дней кусочки тканей листьев (1 г) растений, полученных в обоих вариантах посева, поверхностно стерилизовали и выделяли изоляты, как описано в разделе 2.5.

2.11. Выделение молочнокислых бактерий из растительных тканей.

Поиск молочнокислых бактерий в растениях щавеля, ревеня и капусты проводили, как описано в разделе 2.5. Так же производили смывы с поверхности указанных растений без стерилизации и последующим высевом на специфичные среды для молочнокислых бактерий МРС и Рогоза, состав которых указан в разделе 2.2.

2.12. Выявление эндофитности штаммов бактерий

На стерильных растениях картофеля. Исследуемый штамм выращивали в течение 3 суток на жидкой среде LB. Пробирочные растения картофеля размером 5-6 см обрабатывали суспензией исследуемого штамма путем нанесения 5 мкл на стебель растения. На контрольные растения наносили по 5 мкл стерильной дистиллированной воды. Контрольные и обработанные препаратом растения картофеля оставляли для культивирования в климатостате на 7-10 сут, а затем

подвергали стерилизации и выделяли бактериальные клетки как указано в разделе 2.5.

Проростки редиса и пшеницы. В пластиковые стаканы с почвой высевали семена редиса (сорт Ранний) и пшеницы (сорт Салават Юлаев). Семисуточные проростки растений, а также почву под ними опрыскивали препаратом бактерий выделенных нами эпифитных молочнокислых бактерий *L. plantarum* 3L в концентрации 10^9 КОЕ/мл до появления микрокапель (примерно 1 мкл) на поверхности листьев, почву взрыхляли и накрывали растения на 24 ч пластиковым стаканом для создания влажной камеры.

Через 8 дней кусочки тканей листьев (1 г) поверхностно стерилизовали, как описано в разделе 2.5 и растирали по поверхности агаризованной среды Рогоза. Для оценки наличия бактерий в филлосфере кусочки тканей листьев (1 г) промывали встряхиванием в 2 мл физраствора и аликвоты анализировали, как описано выше.

*Коинокуляция *B. subtilis* 26Д и *L. plantarum* 3L стерильных растений картофеля.* Количество клеток эндофитов подсчетом КОЕ в тканях растений через 7 дней после инокуляции стерильных растений картофеля (сорт Удача) микрокапель суспензии клеток (10^5), как отдельно, так и в совместной инокуляции. В варианте использования неэндофитного штамма листья одних микрорастений повреждали стерильным пинцетом, других – не повреждали. Для оценки КОЕ образцы каждого экспериментального растения подвергали поверхностной стерилизации как описано в разделе 2.5 и выделяли изоляты из 100 мг тканей.

Коинокуляция бацилл и энтеробактерий на стерильных растениях картофеля. На основания стеблей трех стерильных микрорастений картофеля в каждом варианте, не касаясь агара, на расстоянии 5-10 мм от его поверхности микрокапель нанесли по 10^5 клеток бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 49PH. Через 7 дней в одном из вариантов выше места нанесения бацилл нанесли микрокапли, содержащие 10^5 клеток *Variovorax* sp. Ч4 и *Pantoea* sp. M23. Через 7 дней отобрали черенки стеблей выше на 2 см от места нанесения клеток

Variovorax sp. Ч4 и *Pantoea* sp и ниже на 2 см от вершины. Далее стерилизовали и выделяли изоляты, как описано в разделе 2.5.

Варианты эксперимента:

1. Нанесены клетки только *B. subtilis* 26Д.
2. Нанесены клетки только *B. subtilis* 49РН.
3. Нанесены клетки *B. subtilis* 26Д, затем через 7 дней *Variovorax* sp. Ч4.
4. Нанесены клетки *B. subtilis* 26Д, затем через 7 дней *Pantoea* sp. M23.
5. Нанесены клетки *B. subtilis* 49РН, затем через 7 дней *Variovorax* sp. Ч4.
6. Нанесены клетки *B. subtilis* 49РН, затем через 7 дней *Pantoea* sp. M23.

Для оценки эндофитности выделенных из различных тканей бактериальных штаммов (35 образцов) так же использовались пробирочные растения картофеля без повреждений.

2.13. Изучение влияния способности штаммов *Bacillus spp.* защищать проростки растений от фитопатогенных грибов.

Листья семидневных проростков исследуемых растений, предварительно инокулированных суспензией бактерий (в контроле обработанные водой), помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). Листья заражали опрыскиванием 4 мкл суспензии спор гриба (10^5 спор/мл). Развитие симптомов на листьях оценивали на седьмой день после заражения путем измерения площади поражения на листьях и фиксации изображений с помощью камеры SP-800UZ Image («Olympus», Индонезия). Признаки септориоза (на листьях пшеницы) или фитофтороза (на листьях картофеля) и степень развития болезни оценивали по площади поражения листовой пластинки. Для измерения площади производилось фотографирование листьев и анализ изображений с помощью программы ImageJ («NIH», США). Для анализа были отобраны десять растений из каждой группы вариантов, и три листа с одного растения были собраны в указанный момент времени для каждой биологической повторности.

2.14. Определение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств бактерий

Для определения физиолого-биохимических особенностей бактериальных клеток были выбраны признаки, которые в соответствии с определителем бактерий Берджи, важны также для выяснения систематического положения бактерий.

Для характеристики культурально-морфологических особенностей штамма колонии выращивали на среде LB. Для этого бактерии предварительно высевали в пробирки с жидкой средой LB на 1 сутки, далее суточную культуру последовательно разводили в 10 раз, содержимое последней (седьмой) пробирки рассеивали на чашки Петри с LB и помещали в термостат при 37°C. Образовавшиеся колонии описывали через 1,5-2 суток.

Для определения способности к росту при различных температурах, исследуемые микроорганизмы пересеивали с жидкой среды LB на твердую и помещали в термостат при 50°C и 60°C или в холодильник при 4°C и выдерживали до 7 суток, после чего регистрировали наличие роста.

Для роста при повышенной концентрации HCl использовали среду LB с соответствующей концентрацией соли при 37°C в течение 24 ч.

Способность выделенных штаммов расти в анаэробных условиях определяли с помощью посева в толщу среды LB. Для этого её расплавляли в пробирках на водяной бане, остужали до 45°C, инокулировали клетками бактерий и быстро перемешивали. Через 24-48 часов регистрировали наличие или отсутствие роста в толще среды по помутнению в сравнении с контрольной пробиркой с незараженной LB средой.

Реакция Фогес-Проскауэра выявлялась при выращивании микроорганизмов на среде состава: 1% глюкоза, 0,5% пептон, 0,1% K₂HPO₄. Среду разливали в пробирки по 8 мл, засеивали клетками исследуемых штаммов и культивировали 7 суток при 37°C. Затем в культуру добавляли 4 мл 10% раствора КОН и энергично встряхивали на воздухе. Об образовании бактериями ацетилметилкарбинола судили по появлению через 18-24 часа интенсивного красного окрашивания.

Наличие протеолитической активности определяли по способности разлагать казеин на среде состава: 2% казеин, 4% бак. агар, ФБ рН 7,4, в течение 24 часов при 37°C. Наличие протеазной активности оценивали по зоне просветления вокруг колоний через 2 суток.

Способность разжижать желатин оценивали на мясо - пептонном желатине (МПЖ). Для этого к МПБ добавляли 10% желатина, затем нагревали смесь на водяной бане до его полного растворения и разливали в пробирки по 8 мл. Посев проводили уколом. Разжижение желатина отмечали через 7 суток роста при комнатной температуре.

Амилолитическую активность бактерий определяли на среде LB с добавлением 1% крахмала. Микроорганизмы высевали на среду штрихом и инкубировали 24 ч при 37°C. На следующие сутки чашки заливали раствором Люголя на 5 минут. О наличии амилолитической активности судили по отсутствию синего окрашивания вокруг колонии микроорганизмов.

Для выявления активности каталазы бактерии сеяли штрихом в чашки Петри на LB и инкубировали в течение суток при 37°C. На следующие сутки культуру заливали раствором 10%-ной перекиси водорода. При наличии каталазы наблюдалась характерная реакция «вскипания».

Липолитическую активность определяли на среде следующего состава: твин-80 - 1%, 10% CaCl₂ - 0,1%, бак. агар - 4%, ФБ рН 7,4. Среду засеивали штрихом и выдерживали в течение суток при 37°C. О наличии липазной активности судили по образованию вокруг штриха непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот.

Лецитиназную активность бактерий определяли на LB с добавлением яичного желтка. К 400 мл стерильного LB добавляли 1 яичный желток, хорошо перемешивали и разливали в пробирки по 5 мл, после чего помещали их на сутки в термостат при 37°C. Затем пробирки инокулировали клетками штаммов и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. О наличии лецитиназной активности судили по появлению беловатой мути и/или хлопьев.

Для определения способности выделенных микроорганизмов утилизировать

углеводы использовали среду Гисса (ОАО «Биомед», Россия) с различными сахарами - глюкозой, лактозой, сахарозой или маннитом. Пробирки со средой засеивали уколом и помещали в термостат на 2 суток при 37°C. Об утилизации микроорганизмами данного углевода с образованием кислоты свидетельствовало изменение окраски среды с зеленой на желтую.

Для оценки способности утилизировать мочевины к 100 мл стерильного LB добавляли 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6%-ного спиртового раствора крезолового красного. Полученную среду разливали в пробирки, заражали клетками бактерий и инкубировали при 37°C в течение 5 суток. О способности бактерий использовать мочевины судили по покраснению среды.

Использование цитрата изучаемыми штаммами выявлялось на среде Козера, состав которой описан в разделе 2.2. Среду засеивали клетками микроорганизмов и через сутки регистрировали рост или его отсутствие.

Для анализа выделения бактериями аммиака, сероводорода, индола под пробки пробирок с LB помещали, соответственно, отрезки красной лакмусовой бумаги, фильтровальной бумаги, пропитанной 20% раствором уксуснокислого свинца или насыщенным раствором щавелевой кислоты. Инкубацию проводили 7 суток. По изменению цвета бумаги (посинение лакмуса, почернение бумаги с уксуснокислым свинцом, сиреневое или малиновое окрашивание отрезков, пропитанных щавелевой кислотой) судили о выделении соответствующих соединений.

Для выявления фосфат-мобилизующей активности использовали среду Муромцева, состав которой описан в разделе 2.2. Предварительно выращенные на твердой среде LB колонии бактерий резали на цилиндрические блоки и переносили их на чашки со средой Муромцева. Через 7-10 дней оценивали наличие прозрачных зон (гало) (Сэги, 1983) и измеряли их площадь (без вычета диаметра самого блока).

Культурально-биохимические признаки бактерий приведены в табл. 1.

Таблица 1 - Культуральные и биохимические свойства штаммов

Свойства	26Д	26Д CryChS	<i>Bacillus sp. Ts2</i>	<i>Bacillus sp. St17</i>
Морфология клеток	палочки	палочки	палочки	палочки
Окраска по Граму	+	+	+	+
Спорообразование	+	+	+	+
Рост при температуре				
4°C	-	-	-	-
50°C	+	+	+	+
60°C	-	-	-	-
Рост на средах:				
КГА	+	+	+	+
LB	+	+	+	+
2,5% NaCl	+	+	+	+
6,5% NaCl	+	+	+	+
Рост в анаэробных условиях	-	-	-	-
Активность ферментов:				
Амилаза	+	-	+	+
Протеаза	+	+	+	+
Желатиназа	+	-	+	+
Липаза	+	+	+	-
Каталаза	+	+	+	+
РНКаза	+	+	+	+
Утилизация углеводов:				
глюкоза	+	+	+	+
сахароза	+	+	+	+
маннит	+	+	+	+
лактоза	-	-	-	+
Утилизация мочевины	-	-	+	-
Реакция Фогес-Проскауэра	+	+	+	+
Выделение NH ₃	-	-	-	-
Выделение индола	-	-	-	-
Выделение H ₂ S	-	-	-	-

2.15. Определение рибонуклеазной активности

Рибонуклеазную активность на твердой питательной среде измеряли по методу, описанному Ноле с соавт. (2004). Изучаемые штаммы выращивались на среде LB с добавлением коммерческой дрожжевой РНК («Sigma», США).

Активность РНКазы определяли по формированию зоны гало вокруг бактериальной колонии. Рибонуклеазную активность в жидкой бактериальной культуре измеряли по методу, описанному Маргулис с соавт. (2012). Реакцию проводили в кварцевых кюветах, куда вносили 1,98 мл раствора РНК в 0,05 М трисНСl буфере рН 8,5 (50 мкг/мл), затем добавляли 20 мкл супернатанта культуральной жидкости.

Контролем служил раствор, где вместо образца добавляли трисНСl буфер. Измеряли светопоглощение реакционной смеси по сравнению с контрольным раствором при длине волны 260 нм на спектрофотометре Unico-2800. Активность рибонуклеазы выражали по изменению поглощения при длине волны 260 нм, и определяли разницу в A_{260} между 61 мин и 1 мин, в пересчете на 1 мг белка.

Количественную оценку активности внеклеточных РНКаз в жидкой культуральной среде проводили по модифицированной методике Sokurenko с соавт. (2016). Рост культуры измеряли спектрофотометрически при 590 нм и выражали в единицах оптической плотности (OD_{590}). Когда плотность бактерий достигала 10% клеток / мл, культуры центрифугировали 15 мин при 8.000 об. на центрифуге 5415R («Eppendorf», Германия). Листья картофеля гомогенизировали в стерильных пакетах в 1 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,5) с использованием блендера BagMixer 400W («Interscience», Франция) и инкубировали в течение 60 мин при 4°C. Гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об. на центрифуге 5415R. Для измерения рН использовали рН-метр HI 83141 («Hanna Instruments», Румыния). 20 мкл гомогенатов добавляли к 1,98 мл 50 мкг / мл раствора дрожжевой РНК torula в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 5,5) («Sigma», США) и выдерживали при 25°C в течение 1 ч и поглощение измеряли при 260 нм относительно контроля (без экстракта листьев или бактериальной среды) при 260 нм на спектрофотометре LLG-uniSPEC 2 («LLG», Германия). За единицу

нуклеазной активности принимали количество фермента, вызывающее увеличение адсорбции на 1,0 оптическую единицу при 260 нм в течение 1 ч при 25 ° С (Pinskaya et al. 1996). Активность РНКазы выражали в единицах / мин×мл среды (активность внеклеточной *Bacillus* РНКазы).

2.16. Изучение антивирусной активности бактерий рода *Bacillus* на растениях картофеля

Отбор растительного материала проводили на посадках картофеля раннеспелого сорта Удача Бирской опытной станции Башкирского НИИ сельского хозяйства - обособленного структурного подразделения УФИЦ РАН (БИИИСХ УФИЦ РАН) и посадках картофеля среднераннего сорта Невский Центральной экспериментальной базы Татарского ПИИ сельского хозяйства Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН» (ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН). Подготовка почвы и технология выращивания картофеля - общепринятая для регионов (Замалиева и др., 2007). Площадь делянок 50 м², размещение систематизированное, повторность трёхкратная. Сроки обработки: 1) полные всходы - до бутонизации; 2) бутонизация-цветение. Варианты обработок в условиях ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН: 1) Контроль - вода 200 л/га; 2) *B. subtilis* 26Д (сухой препарат) - 3 кг/га в 200 л воды; 3) МИКС КС (в 1 г сухой крахмально-сахарозной смеси 0,5 млрд. жизнеспособных спор и клеток бактерий *B. subtilis* 26Д, 0,25 млрд. *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и 0,25 млрд. - *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066) - 1 кг/га в 200 л воды. Варианты обработок в условиях БНИИСХ УФИЦ РАН: контроль - вода, 200 л/га; обработка бактериями *B. subtilis* (26Д,11ВМ) *B. thuringiensis* (ВКПМ В-5689, В-6066, В-5351), *Bacillus* sp. (TS2, STL7), *Enterobacter* sp. ВС-8 и препаратом ВТВ – 2 л/га препарата (титр клеток 1 млрд/мл) в 200 л воды.

Оценку распространения тлей и поражение растений вирусами в поле проводили согласно Воловик с соавт. (1995).

Оценку наличия вирусной инфекции Y (YBK), S (SBK) и M(MBK) в растениях картофеля проводили с использованием набора экспресс-тестов для

иммунохроматографии (ФИЦ Биотехнологии, Россия). Растения гомогенизировали в фарфоровых ступках при комнатной температуре. Тест-полоску погружали в анализируемую пробу на 2 мин в вертикальном положении, а затем извлекали и помещали на горизонтальную поверхность. Качественный результат ИХА оценивали визуально через 10 мин.

2.17. Изучение влияния оксикоричных кислот и сиринговой кислоты на рост бактерий рода *Bacillus*

В экспериментах использовали оксикоричные кислоты компании «Sigma-Aldrich», США. В контрольных вариантах бактерии выращивали на плотной агаровой среде LB содержащей 0,7% и 1.5% агара, в зависимости от целей эксперимента и жидкой среде. Для инокуляции использовали жидкие 24-часовые культуры. Перед экспериментом кислоты в асептических условиях растворяли в стерильных пробирках в 96%-ном этаноле, выдерживали 60 мин в темноте и затем вносили в теплый не застывший агар или в жидкую среду, которую после этого перемешивали для равномерного распределения кислоты. При этом объем вносимого спирта был одинаков во всех вариантах эксперимента.

Исследование действия кислот на плотных средах проводили двумя методами. При использовании первого из них на каждую чашку Петри с определенной концентрацией кислот наносили по 5 мкл суспензии 24-часовой бактериальной культуры в 6 повторах. Чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Далее оценивали диаметр бактериальных колоний, измеряя два перпендикулярных друг к другу диаметра. Затем из 12 замеров выводили средний диаметр в мм. При втором методе колонии на чашках фотографировали и измеряли с помощью программы ImageJ.

Для оценки влияния кислот на рост бактерий в жидких средах в каждую колбу с определенной её концентрацией добавляли по 100 мкл суспензии 24-часовой бактериальной культуры. Колбы помещали в термостатируемый шейкер и инкубировали 24 ч при температуре 37°C. Концентрацию клеток определяли по оптической плотности суспензии на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec Plus

при длине волны 600 нм. Параллельно для оценки стерильности растворов кислот использовали соответствующие питательные среды, в которые не вносились бактериальные культуры.

Оценку подвижности бактерий проводили на полутвердой агаризованной среде (0,5% агара) с содержанием 5 mM KCl (Fall et al., 2006) и с добавлением ФК в концентрации 10 мкг/л и 100 мкг/л. Эксперимент производили в двух вариантах постановки. В одном из вариантов суспензию клеток одинакового объема и плотности наносили на полутвердую среду. В другом варианте один диск фильтровальной бумаги смачивали физиологическим раствором (контроль), другой - раствором ФК. Диски помещали на полутвердую среду и на равном расстоянии между ними наносили суспензию клеток бактерий.

Способность бактерий *B. subtilis* 26Д продуцировать ферменты деструкции ФК оценивали спектрофотометрически по методу, предложенному Degrassi с соавт. (1995). Культуру клеток *B. subtilis* 26Д получали, выращивая 12 ч на среде LB с ФК в концентрации 100 мкг/л при 37°C. Затем клетки отделяли центрифугированием при 5000 об/мин и промывали трижды раствором 70мМ ФБ в объеме, меньшем в 5 раз, чем исходный объем культуры. Клетки ресуспендировали в ФБ до половины исходного объема культуры. Суспензию клеток делили на 2 части. Одну часть (контроль) – прогревали при 100°C на кипящей водяной бане 5 мин., вторую использовали для оценки наличия ферментов, разрушающих ФК. К 10 мл каждой из суспензий добавляли 2 мг ФК, растворенной в 100 мкл 96%-ного этанола (конечная концентрация 200 мкг/мл). Реакционную смесь выдерживали при температуре 30°C на качалке. Через 120 мин отбирали 1 мл проб, отделяли клетки центрифугированием. 200 мкл супернатанта вносили в 2,8 мл ФБ и оценивали спектр поглощения от 250 нм до 400 нм на спектрофотометре UNICO 2000.

Наличие хемотаксиса определяли по методу Namouche с соавт. (2010). Для этого в чашку Петри сначала заливали питательную среду LB без ФК, формируя скошенную поверхность наклоном чашки. После отвердения первой среды, чашку ставили горизонтально и наливали питательную среду с содержанием кислоты в

концентрации 10/100/1000 мкг/л, формируя горизонтальную поверхность, под которой оставалась скошенная среда, концентрация ФК в конечной среде менялась от 0 до 10/100/1000 мкг/л. Далее оставляли чашку для застывания агара в перевернутом виде. После застывания в центр чашки Петри на поверхность наносили суспензию клеток бактерий, затем бактерии культивировали при 37°C 24 ч и визуально оценивали характер роста колонии. При наличии хемтотаксиса форма колонии должна быть вытянутой в сторону увеличения концентрации испытуемого вещества.

2.18. Получение рекомбинантных штаммов эндофитных микроорганизмов

1. Конструирование плазмиды, содержащей ген *CryIIA*

*Аmplификация полноразмерного гена *CryIIA*.* ПЦР проводили в пластиковых пробирках в 25 мкл реакционной смеси: содержащей: 2,5 мкл буфера, 2 мкл раствора геномной ДНК *B. subtilis*, по 1 мкл раствора праймеров, по 2,5 мкл раствора dNTP, 15,5 мкл воды, 1 мкл LR Plus полимеразы (Sileks, Россия).

Условия амплификации: начальная денатурация – 94°C, 2 мин; 25 циклов амплификации: 1) денатурация – 94°C, 30 сек; 2) отжиг – 46°C, 30 сек; 3) элонгация – 72°C, 4 мин; достраивание цепей ДНК – 72°C в течение 5 мин. Размер полученного фрагмента 2478 п.н.

После проведения ПЦР к реакционной смеси добавляли 96% этилового спирта в объеме, равном трехкратному объему смеси, выдерживали при комнатной температуре в течение 15 минут и центрифугировали в течение 5 минут при 13000 об/мин на микроцентрифуге. Затем спирт удаляли, осадок ДНК растворяли в 20 мкл MilliQ-воды.

Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами. Расщепление плазмиды pDG1662 рестрикционной эндонуклеазой EcoR1 (New England BioLab) проводили в 15 мкл реакционной смеси, включающей 7 мкл плазмиды, выделенной из *E. coli*, 1,5 мкл буфера, 1 мкл рестриктазы, 5,5 мкл воды. Время рестрикции составляло 3 часа. Затем ДНК осаждали в 96% этиловом спирте,

осадок растворяли в 10 мкл воды. После этого проводили расщепление эндонуклеазой Sph1 (New England BioLab), в таком же соотношении компонентов реакционной смеси. После этого ДНК снова осаждали и растворяли в 10 мкл воды.

Элюирование фрагмента плазмиды из агарозного геля. Плазмиду после обработки рестриктазами вносили в 1,5% агарозный гель и приводили электрофорез, после чего вырезали фрагмент геля, содержащий участок плазмиды размером около 5400 п.н. Затем проводили элюирование плазмиды из геля при помощи набора фирмы ДИАЭМ.

Обработка линейаризованной плазмиды Pfu-полимеразой. Обработку Pfu-полимеразой проводили в течение часа при температуре 37°C. В реакционную смесь вносили 5 мкл плазмиды после рестрикции эндонуклеазами, 1,5 мкл буфера, 1,5 мкл dNTP, 6 мкл воды, 1 мкл Pfu-полимеразы. Затем смесь инкубировали 10 минут при 75°C для инактивации фермента, ДНК осаждали в 96% этиловом спирте, осадок растворяли в 10 мкл воды.

Лигирование. В реакционную смесь вносили 10 мкл амплификата C_{ry} гена, 5 мкл линейаризованной плазмиды, 1 мкл полиэтиленгликоля, 2 мкл буфера, 1 мкл воды, 1 мкл лигазы. Аккуратно перемешивали и выдерживали 18 ч при комнатной температуре.

2. Трансформация клеток *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* готовили как предложено Hanahan (1983). 1 мл ночной культуры определенного штамма *E. coli* штамма вносили в колбу на 500 мл со 100 мл среды LB (для штамма XL1-Blue содержащей 12.5 мкг/мл тетрациклина) и наращивали клетки до D₅₅₀=0.3 при 37°C, при интенсивной аэрации на орбитальном встряхивателе. Затем собирали клетки центрифугированием в стерильных центрифужных стаканах в центрифуге Eppendorf 5804R при 3000 об/мин, 10 мин. Удаляли супернатант и осторожно суспендировали клетки в 25 мл холодного (4°C) буфера I (10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 30 mM ацетат калия, pH 5,8). Повторно проводили центрифугирование при 2500 об/мин, 10 мин. Удаляли супернатант как можно

более полно и также мягко суспендировали клетки в 5 мл холодного (4 °С) буфера II (75 мМ CaCl₂, 10 мМ KCl, 15%-ный глицерин, 10 мМ MOPS, pH 6,5). Оба буфера стерилизовали автоклавированием. Расфасовывали клеточную суспензию по 200 мкл в предварительно охлажденные стерильные полипропиленовые микропробирки и замораживали при -70°С.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* рекомбинантной ДНК проводили по методу Cohen (1972). К 200 мкл только что размороженной на льду суспензии компетентных клеток, приготовленных и хранящихся как описано в предыдущем разделе, добавляли 10 мкл лигазной смеси и инкубировали 20 мин. на льду. Подвергнув клетки тепловому шоку при 42°С в течение 2 мин инкубировали их еще 1 час при 37°С, предварительно разбавив в 10 раз средой LB. После инкубации суспензию клеток кратковременно осаждали в микроцентрифуге и осадок суспендировали в 100 мкл среды LB. Затем эту суспензию равномерно распределяли стерильным стеклянным шпателем по поверхности 1.5%-ного агара, приготовленного на LB-среде с селективным антибиотиком. Чашки помещали в термостат (37°С) на 24 час.

Анализ трансформированных бактериальных клонов проводили следующим образом: отдельные колонии пересаживали на агаризованную среду LB с ампициллином (50 мкг/мл) и инкубировали сутки в термостате при 37°С.

Затем из них выделяли ДНК, и проводили ПЦР с праймерами CrySR и CrySR при следующих условиях: начальная денатурация – 94°С, 2 мин; 25 циклов амплификации: 1) денатурация - 94°С, 30 сек; 2) отжиг – 53°С, 30 сек; 3) элонгация – 72°С, 1 мин; достраивание цепей ДНК – 72°С в течение 5 мин. Размер полученного фрагмента составлял 744 п.н. По завершении амплификации из реакционной смеси отбирали аликвоту объемом 10 мкл и анализировали в 1% агарозном геле как указано в разделе 2.7.

Клон, содержащий вставку, пересаживали на агаризованную среду LB с ампициллином для выделения плазмиды.

3. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*

Выделение проводили с помощью набора фирмы Fermentas. Для этого к раствору для ресуспендирования бактериальных клеток добавляли рибонуклеазу А и перемешивали. Ресуспендировали 5 мг клеточной культуры в 250 мкл этого раствора, переносили суспензию в пробирку для микроцентрифугирования. Добавляли к клеточной суспензии 250 мкл раствора для щелочного лизиса клеток и перемешивали, переворачивая пробирку 4-6 раз. Добавляли к клеточному лизату 350 мкл раствора для нейтрализации, перемешивали, переворачивая пробирку 4-6 раз. Центрифугировали смесь 5 мин для осаждения клеточного дебриса и хромосомной ДНК. Наносили полученный раствор на мембрану спин-колонки GeneJET. Центрифугировали 1 мин. Удаляли прошедший через мембрану раствор из пробирки и помещали спин-колонку в ту же пробирку. Переносили микроколонку в чистую пробирку на 1,5 мл. Наносили 50 мкл буфера для элюирования плазмидной ДНК в центр мембраны. Выдерживали 2 мин и центрифугировали 2 мин, затем удаляли спин-колонку.

4. Трансформация клеток *B. subtilis*

Приготовление компетентных клеток и трансформация B. subtilis. Штамм-реципиент выращивали в течение ночи при 37°C на шейкере при 170 об/мин на жидкой LB-среде. 150 мкл ночной культуры вносили в 10 мл среды А, измеряли концентрацию на спектрофотометре. Затем инкубировали на шейкере при 37°C, 170 об/мин, каждые 15 минут измеряя количество бактериальных клеток на спектрофотометре до OD 0,6-0,9. После этого инкубировали еще 90 мин. Затем переносили 50 мкл культуры в 450 мкл заранее подогретой среды В. Инкубировали на шейкере 90 мин. После этого к бактериальной суспензии добавляли 20 мкг плазмидной ДНК и продолжали инкубировать на шейкере 45 мин. Затем отцентрифугировали культуру в эппендорфе при 3000 об/мин, 5 мин. Сливали надосадочную жидкость, оставляли 100 мкл, ресуспендировали бактерии. Рассеивали бактерии на агаризованной LB-среде с добавлением 1% крахмала. Через 24 часа чашки Петри с колониями обрабатывали парами йода в течение 1-2 мин и фотографировали камерой стабилизации изображения SP-

800UZ (“Olympus”, Индонезия). Целевые клоны без амилазной активности обнаруживали путем наблюдения отсутствия ореолов вокруг колоний.

Анализ трансформированных бактериальных клонов. Полученные колонии пересаживали на агаризованную среду LB и инкубировали сутки в термостате при 37°C. Затем из них выделяли ДНК, проводили ПЦР с праймерами CrySR и CrySR и гель-электрофорез, как описано в разделе 2.7.

5. Проверка экспрессии гена CryIIA

Выделение РНК из культуры штаммов B. subtilis и B. thuringiensis. Использовался метод с модификациями для бактерий. В 10 мл жидкой LB-среды вносили 150 мкл ночной культуры бактерий и выращивали в течение 16 ч на шейкере при 37°C и 170 об/мин. Затем культуру центрифугировали в течение 10 мин. при 5000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли и осадок ресуспендировали в 1 мл Trizol. Добавляли 0,5 мл хлороформа, встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в новый эппендорф, добавляли равный объем хлороформа, встряхивали в течение 2 минут, снова центрифугировали 10 мин. при 13000 об/мин. Повторяли данную операцию до исчезновения интерфазы. Затем отбирали водно-солевую фазу, добавляли 1,5 мл изопропанола и выдерживали при -20°C 1 час. Центрифугировали 10 мин. при 13000 об/мин и температуре 4°C. Надосадочную жидкость удаляли, осадок промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в 10 мкл воды. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре и затем доводили водой до 1 мкг/мкл.

Обработка ДНК-азой. В реакционную смесь вносили 1 мкл буфера для ДНК-азы, 1 мкг РНК, 1 мкл ДНК-азы, 7 мкл воды. Смесь инкубировали в течение 15 минут при 37°C, затем добавляли 2,5 мкл 25мМ ЭДТА и инкубировали 10 мин при 75°C. Затем смесь помещали на лед.

Синтез кДНК и проведение ОТ-ПЦР. В реакционную смесь вносили 10 мкг общей РНК после обработки ДНК-азой, 1мкл M-MuLV обратной транскриптазы, 9 мкл 1хбуфера для обратной транскрипции, 32 mM MgCl₂, 1 мкл

олигонуклеотидных праймеров, по 5мкл 1.25 mM dNTP. Отжиг олигонуклеотидных праймеров на матрице РНК проводили в течение 5 мин при 65°C, построение кДНК по матрице РНК в течение часа при 37°C. ОТ-ПЦР и гель-электрофорез проводили, как указано в разделе 2.7.

6. Проверка эндофитности рекомбинантного штамма

Эндофитность полученного рекомбинантного штамма проверяли на стерильных растениях картофеля, как описано в разделе 2.12.

7. Проверка инсектицидной активности рекомбинантного штамма

Пробирочные растения картофеля обрабатывали суспензией *B. subtilis* 26Д, рекомбинантного штамма и штамма *B. thuringiensis* как указано в п 2.5.8. После этого их помещали в чашки Петри и подсаживали к ним личинки III возраста колорадского жука (1 личинка на 1 растение). Для определения прямого инсектицидного эффекта стерильные пробирочные растения картофеля обмакивали в суспензию бактерий и после этого таким же образом подсаживали к ним личинки. Смертность личинок определяли спустя 7 дней.

Для определения инсектицидной активности в отношении злаковой тли *Schizaphis graminum* листья 7-суточных растений пшеницы срезали и ставили в суспензию с 4 мл воды и 1 мл культуры бактерий. На них помещали насекомых (по 10 шт. на лист). В качестве контроля использовали воду со средой LB. Через 5 дней подсчитывали количество умерших насекомых.

8. Проверка фунгистатической активности рекомбинантного штамма

Фунгистатическую активность рекомбинантного штамма к фитопатогену *Phytophthora infestans* и *Stagonospora nodorum* проверяли как описано в разделе 2.8.

2.19. Статистическая обработка

Статистическая обработка включала определение средних арифметических, их стандартные ошибки, коэффициенты вариации и корреляции. Достоверность различий ($p \leq 0,05$) оценивали по t –критерию Стьюдента с помощью программы Microsoft Excel. Биохимические анализы выполнены в 3-х биологических и 3-х аналитических повторах.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выделение эндофитов из растений разных видов, оценка влияния механических повреждений и межмикробных взаимоотношений на численность эндофитных бактерий в растительных тканях

Возможность встретить внутри растительных тканей бактерии, непатогенные для растений, в настоящее время не вызывает сомнений ни у ботаников и физиологов растений, ни у микробиологов. В значительной части работ, посвященных выделению эндофитов, растительными объектами являются сельскохозяйственные культуры, имеющие экономическое значение, такие, как кукуруза, рис, картофель, хлопчатник, пшеница и другие.

Считается, что главным входом для эндофитных бактерий являются раны, особенно корней (корневых волосков), которые естественно возникают в результате роста растения (Verma et al., 2017). В научной литературе имеется достаточно сведений о том, что обширно колонизируется эндофитами зона появления вторичных корней (места ветвления корня) (Reinhold- Hurek and Hurek, 1998; Ibanez et al., 2017; Kumar et al., 2020). Из-за поранений эпидермы бактерии, колонизирующие кору, распространяются через нее в сосудистую ткань (Latha et al., 2019; Afzal et al., 2019). Поэтому можно предположить, что чаще всего эндофиты должны выделяться из корней и корнеплодов растений, так как существует большая вероятность механического повреждения и контактов этих органов с микроорганизмами почвы - естественной средой обитания бактерий и грибов. Однако, в этом аспекте, возникает вопрос – все ли выделяемые из внутренних поверхностно стерилизованных растительных тканей бактерии можно отнести к эндофитам.

Объектами наших исследований были овощные (морковь, капуста, редис, огурец, петрушка, укроп, салат), плодовые (яблоня, слива), а также дикорастущие (чистотел) культуры. Три вида растений – огурец, чистотел (рис. 1), слива были выбраны, исходя из физиологической особенности выделять, практически сразу после поранения, экссудат, закупоривающий поврежденный участок. Поэтому в тканях этих видов растений, а также близких родственных видов или аналогично

выделяющих вещества, закупоривающие сосуды, можно ожидать меньшую плотность эндофитов в сравнении с другими видами растений.

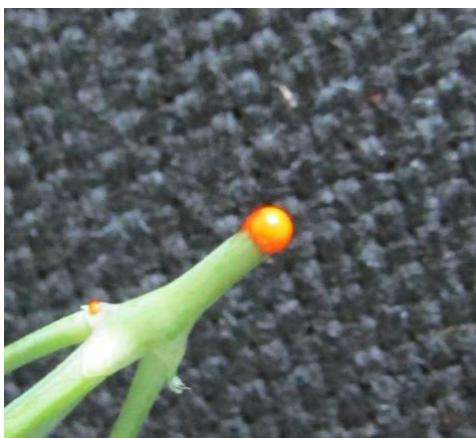


Рисунок 1 – Выделение сока из мест поранений растений чистотела

Анализ распространенности эндофитов в листьях растений выявил, что наиболее заселенными являются листовые ткани яровой пшеницы (частота выделения из образцов - 77%) и капусты (60%) (табл. 2). Листья двух видов пряных зонтичных растений – укропа и петрушки, а также представителя крестоцветных – редиса, сложноцветных – салата, тыквенных – огурца, были в меньшей степени заселены эндофитами, со средней частотой встречаемости 18%. Эндофитные бактерии не выделялись из листьев и листовых черешков чистотела даже при отборе этих органов у стареющих растений в конце вегетации, так как вероятность внедрения микроорганизмов в растительные ткани всегда выше в завершении сезонного роста.

Высокую частоту выделения эндофитов из тканей листьев пшеницы и капусты можно объяснить наличием у растений механических повреждений вредными насекомыми. Для подтверждения этого были проведены эксперименты, результаты которых приведены далее. Полученные данные позволяют также подтвердить наше предположение о том, что из тканей растений, способных выделять при поранении экссудат, закупоривающий повреждения, выделяется меньше эндофитов в сравнении с другими видами растений. Так, эндофиты были выделены лишь из 4 образцов плодов огурца, а из тканей чистотела нам не удалось выделить бактерии.

Таблица 2 – Частота встречаемости эндофитов в листьях растений

Растение	Всего образцов, ед.	Выделено изолятов эндофитов, ед.	Частота выделения, %
Пшеница	43	33	77
Капуста	32	19	60
Редис	40	8	20
Салат	35	7	20
Петрушка	55	10	18
Укроп	63	11	17
Огурец	30	4	13
Чистотел	12	0	0
Среднее			28

Большинство исследований показало, что патогенные для животных и человека бактерии преимущественно вторгаются в корневую ткань растений, а не в листву (Orozco-Mosqueda and Santoyo, 2021). Анализ частоты выделения эндофитов из корней и корнеплодов овощных культур также подтвердил эти данные (табл. 3).

Таблица 3 – Частота встречаемости эндофитов в корнях и корнеплодах растений

Растение	Всего образцов, ед.	Выделено изолятов, ед.	Частота встречаемости, %
Петрушка (корни)	27	17	63
Укроп (корни)	71	65	92
Морковь (корнеплоды)	44	37	84
Редис (корнеплоды)	33	27	82
Среднее			80

Наибольшее число образцов корней, из которых выделялись эндофитные бактерии, было отобраны от растений укропа. Примерно равным было количество образцов корнеплодов моркови и редиса, из которых выделялись эндофиты. Наименьшее количество образцов, содержащих эндофитов, было характерно для корней петрушки.

3.2. Характеристика эндофитных штаммов бактерий

Оценка распространения эндофитов в плодах растений еще раз подтверждает гипотезу о том, что в органах растений, выделяющих экссудаты, способные закупоривать поврежденные участки, частота встречаемости эндофитов может быть меньше в сравнении с растениями других видов (табл. 3). Так, хорошо известно, что при срезе плодов огурца или уколе сливы выделяется густая жидкость. Показано, что в таком экссудате, например, огурца содержатся антибактериальные агенты, такие как, хитиназа и хитин-связывающий белок лектин (Nareddy et al., 2017), обладающий фунгистатическими свойствами (Dang, Van Damme, 2016).

Анализ частоты выделения эндофитов (табл. 4) свидетельствует о том, что, действительно, число образцов плодов сливы и огурца, из которых были выделены эндофиты, было почти на порядок меньше, чем образцов яблок.

Таблица 4 – Частота встречаемости эндофитов в плодах растений

Плоды	Всего образцов, ед.	Выделено изолятов, ед.	Частота встречаемости, %
Яблоко	40	24	60
Огурец	20	2	10
Слива	22	2	9

Для дальнейших исследований свойств изолятов и видовой идентификации отдельных штаммов использовали RAPD-анализ ДНК бактерий, выделенных из единичных колоний, позволивший определить с использованием случайных

праймеров Lmbd наличие генетических различий между исследуемыми эндофитными изолятами.

Всего было выделено 110 штаммов (табл. 5). Наибольшим разнообразием штаммов характеризовались эндофиты, выделенные из растений сливы, моркови, огурца и салата.

Разнообразие штаммов в тканях огурца, сливы и салат можно объяснить описанной выше физиологической особенностью этих растений – закупоривать образующиеся раны, что способствует минимальной вероятности проникновения бактерий в ткани, меньшему количеству выделяемых изолятов, что повышает вероятность встретить разные штаммы и/или виды бактерий среди минимального числа эндофитов. Высокое разнообразие штаммов из корнеплодов моркови объясняется, вероятно, высокой вероятностью повреждения тканей в почве и, таким образом, большей вероятностью попутного проникновения «неэндофитных» бактерий.

Таблица 5 – Количество изолятов, отличающихся по RAPD-анализу

Растение	Всего взято в анализ	Количество различающихся изолятов	
		Абсолютное значение	Доля, %
Петрушка	27	4	14,8
Укроп	76	27	35,5
Морковь	37	26	70,2
Огурец	6	4	66,7
Редис	35	8	22,8
Салат	7	4	57,4
Капуста	19	7	36,8
Яблоня	24	9	37,5
Слива	2	2	100,0
Пшеница	33	19	57,5
Всего	266	110	41,3

Идентификация выделенных штаммов по культурально-морфологическим признакам позволила выявить большую частоту встречаемости представителей рода *Bacillus* (табл. 6). Псевдомонады встречались с меньшей частотой в сравнении с бациллами. Выделены и идентифицированы также редко встречающиеся виды *Pantoea sp.*, *Variovorax sp.*, *Microbacterium testaceum*.

Таблица 6 – Встречаемость представителей семейств, родов, видов бактерий

Семейство, род, вид		Количество изолятов	Растения, орган
Род <i>Bacillus</i>		34	
	<i>B. subtilis</i>	7	корни и листья петрушки, корни и листья укропа, листья и плоды огурца, корнеплоды моркови и редиса, листья капусты, плоды яблони
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3	листья укропа, листья пшеницы
	<i>Bacillus sp.</i>	24	листья укропа, пшеницы, салата, капусты, плоды яблони и сливы корнеплоды моркови
Род <i>Pseudomonas</i>		7	
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1	корнеплоды моркови
	<i>Pseudomonas sp.</i>	6	листья укропа, пшеницы, корнеплоды моркови, листья салата, капусты, плоды огурца корнеплоды моркови
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>		47	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	корнеплоды моркови
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	корнеплоды моркови
	<i>Pantoea sp.</i>	1	корнеплоды моркови
	<i>Enterobacter sp.</i>	42	корни и листья петрушки, листья укропа, пшеницы, корнеплоды моркови, листья салата, капусты, плоды яблони, сливы, огурца
<i>Variovorax sp.</i>		1	листья укропа
<i>Microbacterium testaceum</i>		1	плоды огурца
Не определены		20	корни и листья петрушки, корни и листья укропа, листья капусты, плоды яблони.

Полученные данные согласуются с результатами других исследователей. Например, Jia с соавт. (2019) в плодах огурца обнаружили эндофиты родов *Bacillus*, *Lysobacter*, *Microbacterium*. Janisiewicz с соавт. (2013) из сливы выделили представителей рода *Pseudomonas*, *Microbacterium* и *Clavibacter*. Comby с соавт. (2017) выделили из растений пшеницы бактериальных эндофитов, принадлежавших 9 родам, в том числе *Pseudomonas* и *Bacillus*. Abdelrazek (2019) показал, что большинство изолятов из корнеплодов моркови относилось к родам *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Xanthomonas*. Из капусты Тус с соавт. (2019) выделил 11 изолятов разных видов, в том числе *Pseudomonas* и *Pantoea*.

Kouassi с соавт. (2019) изучали факторы риска загрязнения листьев салата патогенными бактериями, основу выделенных штаммов составляли эндофиты семейства *Enterobacteriaceae*.

Как уже упоминалось выше, попутному проникновению в растительные ткани могут способствовать механические повреждения, в т.ч. вредными насекомыми, которые могут способствовать внедрению в растения представителей собственной кишечной микрофлоры. Логично полагать, что в органах зрелых растений плотность популяции эндофитов может быть больше, чем молодых растений.

Влияние повреждений насекомыми на плотность популяции эндофитов в тканях растений демонстрирует эксперимент, где растения редиса выращивались в открытом грунте и в лаборатории (закрытый грунт) на одном и том же образце почвы. В открытом грунте наблюдали повреждения растений вредными насекомыми.

Установлено, что в листьях редиса, выращенного в открытом грунте, количество эндофитов в 1 г ткани было в 24 раза больше, чем в листьях редиса, растущего в лабораторных условиях (табл. 7). Этот факт мы связываем с повреждением растительных тканей насекомыми и проникновением различных микроорганизмов в местах поранений.

Таблица 7 – Влияние повреждений насекомыми на проникновение эндофитов в растения редиса

Условия выращивания	КОЕ/г ткани
Открытый грунт	2400±180
Закрытый грунт	100±42

Для оценки влияния механических повреждений на проникновение не эндофитных штаммов бактерий был проведен также еще один эксперимент. На листья стерильных микрорастений картофеля наносили суспензии бактерий двух штаммов, из которых один является эндофитным (*B. subtilis* 26Д), другой – неэндофитным (*B. thuringiensis* ВКПМ В-5689). Не эндофитность последнего штамма была установлена ранее сотрудниками лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. В варианте использования неэндофитного штамма листья одних микрорастений повреждали, сжимая их стерильным пинцетом, листья других растений – не повреждали. Выявлено, что без повреждений неэндофитный штамм не обнаруживался в тканях стерильных растений, тогда как при нанесении эндофита *B. subtilis* 26Д без повреждений бактерии этого штамма обнаруживались в растительных тканях после поверхностной стерилизации (табл. 8).

По мере роста и развития растений возрастает вероятность повреждения его органов различными вредителями, а также физическими факторами (заморозки, град, междурядная обработка почвы, опрыскивание посевов), что увеличивает возможность проникновения в растительные ткани различных микроорганизмов.

Таблица 8 – Влияние механического повреждения на проникновение неэндофитного штамма бактерий в микрорастения картофеля

Вариант	КОЕ/г ткани
<i>B. subtilis</i> 26Д - без повреждения	50±10
<i>B. thuringiensis</i> ВКПМ В-5689 - без повреждения	0
<i>B. thuringiensis</i> ВКПМ В-5689 - повреждение	36±12

В эксперименте, в котором анализировали плотность популяции эндофитов в листьях молодых и стареющих растений, мы выявили, что в листьях зрелых растений плотность популяции бактерий была примерно в 10 раз больше, чем в листьях молодых растений, а при наличии открытых сосудов через них током воды (межклеточного сока) внутрь органа устремлялось еще большее количество бактерий, вероятно, находившихся на поверхности органа (табл. 9).

Таблица 9 – Влияние возраста растений и механического повреждения на проникновение клеток бактерий в листья укропа

Образец*	КОЕ/г ткани
Молодые растения	40±26
Зрелые растения	300±38
Растения в стакане с водопроводной водой	20000±640

Для подтверждения неспособности неэндофитных штаммов бактерий проникать в ткани растений был поставлен эксперимент на проростках редиса и пшеницы. В качестве неэндофитного штамма бактерий мы выбрали выделенный с поверхности листьев капусты штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 3L. Видовая идентификация штамма была проведена секвенированием фрагмента 16s рРНК.

Лактобациллы не выявлялись во внутренних тканях растений через 8 суток после нанесения (табл.10). При этом они сохраняли жизнеспособность в почве и на поверхности листьев. Таким образом, несмотря на сохранение жизнеспособности лактобацилл в почве и на поверхности листьев, они не были выявлены из внутренних тканей растений и, поэтому, относятся к эпифитной микрофлоре.

Подтверждением того, что эндофитность является особенным свойством бактерий, а значительная часть микроорганизмов, выделяемых из внутренних поверхностно стерилизованных тканей, может проникать внутрь растений через

механические повреждения, демонстрируют результаты эксперимента, представленные в табл.11. Срезанные растения петрушки помещали в стакан с дистиллированной водой, с добавлением бактериальной культуры и добавлением антибиотика гентамицин сульфата.

Полученные результаты свидетельствуют о движении тока воды по сосудистой системе листа, так как в контрольном варианте концентрация клеток эндофитов уменьшалась в 3 раза.

Таблица 10 – Выделение лактобацилл на среде Рогозы после обработки растений и почвы бактерией *L. plantarum* 3L

Объект исследования	КОЕ×10 ³ /г сырой массы
Редис, поверхность листьев	32±9
Редис, внутренние ткани	0
Пшеница, поверхность листьев	18±3
Пшеница, внутренние ткани	0
Почва через 1 сутки после инокуляции	62±15
Почва через 8 суток после инокуляции	40±12
Редис, поверхность листьев без обработки	0
Пшеница, внутренние ткани без обработки	0
Почва через 1 сутки без обработки	0
Почва через 8 суток без обработки	0

Интересно, что при добавлении бактерий *B. subtilis* 26Д в среду инкубации листьев с антибиотиком количество эндофитов, выделенных из отрезков черешков, было больше, чем в контрольном варианте. Этот факт можно было объяснить тем, что бактерии *B. subtilis* 26Д быстро достигали верхней части листа, каким-либо образом ускоряя ток воды по сосудам листьев, либо способствовали продвижению аборигенных эндофитных бактерий.

Таблица 11 – Концентрация бактерий в черешках срезанных листьях петрушки при выдерживании их в воде (КОЕ/г)

Часть черешка листа	Контроль	Контроль + антибиотик	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 26Д + антибиотик
Верхняя	30±2	10±2	38±15	16±6
Средняя	340±30	160±20	850±90	275±31
Нижняя	6000±520	1000±430	4000±200	2300±110

Поиск в научной литературе ответа на этот вопрос позволил найти сообщения о том, что совместная инокуляция растений определенным видом или штаммом бактерий может облегчать проникновение другого вида или штамма бактерий в растительные ткани. Например, Wells и Butterfield (2011) приводят результаты эксперимента, в котором нанесение на ткани моркови, картофеля или перца бактерий *Pseudomonas viridiflava* совместно с бактериями *Salmonella typhimurium* или бактерий *Erwinia carotovora* с *S. typhimurium* приводило к трехкратному увеличению численности сальмонеллы тканях растений в сравнении с моноинокуляцией тканей только сальмонеллой. Не исключено, что в нашем эксперименте бактерии *B. subtilis* 26Д способствовали проникновению лактобацилл в ткани картофеля.

Для выявления влияния коинокуляции растений эндофитным штаммом *B. subtilis* 26Д на проникновение в растительные ткани неэндофитного штамма, в качестве которого мы выбрали неэндофит *L. plantarum* 3L был поставлен эксперимент, в котором на листья стерильных микрорастений картофеля наносили суспензии, содержащие клетки и того и другого вида бактерий. В варианте использования неэндофитного штамма листья одних микрорастений повреждали стерильным пинцетом, других – не повреждали. Выявлено, что без повреждений неэндофитный штамм не обнаруживался в тканях стерильных растений, тогда как при нанесении эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д без

повреждений бактерии обнаруживались в растительных тканях после поверхностной стерилизации (табл. 12).

Этим экспериментом еще раз было подтверждено, что лактобациллы *L. plantarum* 3L не являются эндофитами. Однако при совместной инокуляции растений эндофитом и неэндофитом клетки лактобацилл были обнаружены в тканях картофеля. Таким образом, мы получили интересный результат, подтверждающий данные цитируемых выше авторов о том, что одни виды (штаммы) бактерий могут способствовать проникновению в растительные ткани микроорганизмов других видов.

Таблица 12 – Влияние совместной с лактобациллами инокуляции микрорастений картофеля эндофитным штаммом *B. subtilis* 26Д на проникновение бактерий в растительные ткани

№ п/п	Вариант	КОЕ/г ткани
1	<i>B. subtilis</i> 26Д - без повреждения	50±10
4	<i>L. plantarum</i> 3L	0
3	<i>L. plantarum</i> 3L – повреждение	0
4	<i>L. plantarum</i> 3L* + <i>B. subtilis</i> 26Д** - без повреждения	7±1*, 42±4**
5	Контроль (без внесения бактерий)	0

Известно, что в растениеводстве используются микробиологические препараты, содержащие в своем составе несколько различных видов или штаммов микроорганизмов, как, например, препарат «Восток-ЭМ1». В связи с этим возникает вопрос, как могут взаимодействовать между собой эндофитные бактерии *in vitro* и проявляется ли, например, антагонизм *in vitro* одних эндофитов по отношению к другим таким же подавлением размножения определенных видов бактерий внутри растительных тканей.

Для попытки ответа на этот вопрос предварительно, нанося на стерильные микрорастения картофеля культуры 35 выделенных бактерий, мы оценили наличие у них свойства эндофитности (табл. 13).

Таблица 13 – Оценка эндофитности выделенных штаммов бактерий

№ п/п	Вид	Штамм	Эндофитность*
1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	ч'2	+
2	<i>Variovorax sp.</i>	ч'4	+
3	<i>B. amyloliquefaciens</i>	ч3	+
4	<i>Pseudomonas sp.</i>	ч8	+
5	<i>Enterobacter sp.</i>	к'3	-
6	<i>Enterobacter sp.</i>	к3	+
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	м13	+
8	<i>Pseudomonas</i>	м15	+
9	<i>E. cloacae</i>	м18	+
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	м19	+
11	<i>Ent. aerogenes</i>	м5	+
12	<i>Pseudomonas sp.</i>	м7	+
13	<i>Bacillus subtilis</i>	м8	+
14	<i>Pseudomonas sp.</i>	м17	+
15	<i>Ps. oryzihabitans</i>	м20	+
16	<i>Pantoea sp.</i>	м23	+
17	<i>Pseudomonas sp.</i>	м25	+
18	<i>Pseudomonas sp.</i>	м26	+
19	Не определен	м27	-
20	<i>Pseudomonas sp.</i>	м28	+
21	<i>Bacillus subtilis</i>	п2	+
22	<i>Enterobacter sp.</i>	п4	+
23	<i>Pseudomonas sp.</i>	п7	+
24	<i>Bacillus subtilis</i>	п20	+
25	Не определен	п21	+
26	<i>Enterobacter sp.</i>	п23	-
27	Не определен	п24	+
28	<i>Enterobacter sp.</i>	к'12	+
29	Не определен	к11	+
30	<i>Enterobacter sp.</i>	к12	+
31	<i>Enterobacter sp.</i>	с'6	+
32	<i>Bacillus subtilis</i>	пс4	+
33	<i>Microbacterium</i>	пл1	+
34	<i>B. subtilis</i>	ч6	+
35	<i>B. phosphaticus</i>	о4	+

* + способен проникать в ткани без повреждения

- не способен проникать в ткани без повреждения

Как видно из таблицы, 94,3% выделенных нами штаммов оказались способными без повреждений проникать в растительные ткани. Затем, из этих эндофитов были выбраны бактерии, колонии которых хорошо отличались при росте на агаровых средах (табл. 14), по отношению к которым оценивали антагонизм бактерий *B. subtilis* 26Д, 11РН, 49РН, 161РН, 11ВМ с различной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам: штаммы 11РН и 49РН характеризовались как высокоантагонистичные, 26Д с антагонизмом средней степени (11ВМ) и слабоантагонистичный штамм 161РН (Егоршина, 2012).

Таблица 14 – Антагонизм некоторых штаммов бацилл по отношению к различным эндофитам (мм)

№	Тест-объекты	Бактерии - антагонисты			
		26Д	11РН	161РН	49РН
1	<i>B. subtilis</i> 26Д		1±0,11	-*	3±0,36
2	<i>B. subtilis</i> 11РН	-	-	-	1±0,09
3	<i>B. subtilis</i> 49РН	-	-	-	
4	<i>B. subtilis</i> 161РН	-	1±0,13		2±0,17
5	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	-	-	-	1±0,1
6	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ч'2	-	-	1±0,11	-
7	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ч3	-	-	1±0,16	-
8	<i>Bacillus phosphaticus</i> О4	-	2±0,23	-	3±0,41
9	<i>Bacillus sp.</i> М8	-	1±0,15	-	-
10	<i>Variovorax sp.</i> Ч'4	-	8±0,46	-	9±0,61
11	<i>Enterobacter aerogenes</i> М5	-	4±0,53	-	5±
12	<i>Enterobacter cloacae</i> М13	-	-	-	2±0,21
13	<i>Pantoea sp.</i> М23	-	5±0,62	1±0,1	6±0,7
14	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> М20	-	4±0,5	3±0,4	4±0,44
15	<i>Pseudomonas sp.</i> Ч8	-	3±0,38	-	1±0,13
16	<i>Pseudomonas sp.</i> М15	-	2±0,26	-	2±0,17
17	<i>Microbacterium</i> ПЛ1	-	1±0,16	1±0,11	2±0,19

* - антагонизм не проявляется

Установлено, что из четырех штаммов *B. subtilis* 11PH, 11BM, 49PH, 161PH антагонизм к наибольшему числу видов и штаммов бактерий проявил штамм 49PH, который сильнее чем штамм 11PH подавлял рост колоний двух эндофитных штаммов *Variovorax sp.* Ч'4 и *Pantoea sp.* M23. Штамм 26Д не проявил антагонизм ни к одному из испытанных штаммов эндофитов. На основании этих данных был проведен эксперимент, схема постановки которого описана в разделе 2.12.

Результаты анализа плотности популяции клеток эндофитных штаммов *Pantoea sp.* M23 и *Variovorax sp.* Ч'4 приведены в табл. 15.

Таблица 15 – Влияние совместной инокуляции эндофитами микрорастений картофеля на количество клеток бактерий внутри стеблей (КОЕ/г)

Вариант инокуляции микрорастений картофеля	Антагонизм <i>in vitro</i> (размер зоны подавления роста, мм)		<i>B. subtilis</i>		<i>Pantoea sp.</i> M23	<i>Variovorax sp.</i> Ч'4
	к тест-штаммам*	к бациллам**	26Д	49PH		
<i>B. subtilis</i> 26Д	-	-	2120 ±220			
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Pantoea sp.</i> M23	0	0	3080 ±370		2440 ±280	
<i>B. subtilis</i> 26Д + <i>Variovorax sp.</i> Ч'4	0	0	2600 ±160			100 ±9
<i>B. subtilis</i> 49PH	-	-		2260±700		
<i>B. subtilis</i> 49PH + <i>Pantoea sp.</i> M23	6	0		240 ±30	2880 ±110	
<i>B. subtilis</i> 49PH + <i>Variovorax sp.</i> Ч'4	9	0		1580 ±171		1200 ±182

Примечание

* - антагонизм бактерий *B. subtilis* к *Pantoea sp.* M23 или *Variovorax sp.* Ч'4, соответственно;

** - антагонизм бактерий *Pantoea sp.* M23 или *Variovorax sp.* Ч'4 к бактериям *B. subtilis*, соответственно.

Проведенный анализ показал, что при инокуляции растений бактериями *B. subtilis* 26Д, не проявляющими *in vitro* антагонизм к указанным эндофитам, и *B. subtilis* 49PH, подавляющим рост колоний этих эндофитов *in vitro*, количество клеток *Pantoea* sp. M23 в тканях стебля картофеля остается, примерно, равным.

Таким образом, нами показано, что антагонистический характер одного из эндофитных штаммов бактерий *in vitro* по отношению к другому, *in vivo* может не только не проявляться аналогичным образом, но и приводить к уменьшению численности клеток самого антагониста.

3.3. Влияние оксикоричных кислот на рост колоний эндофитных штаммов бактерий

На основании результатов, изложенных в предыдущем разделе рукописи диссертации, можно сделать вывод, что эндофитность – особое свойство отдельных штаммов бактерий проникать в ткани растения-хозяина независимо от повреждений, при этом такие эндофиты, как, например, бактерия *B. subtilis* 26Д могут способствовать проникновению и неэндофитных бактерий. В то же время, оправдано полагать, что механические повреждения создают своеобразные ворота внутрь растительного организма не только для неэндофитов, но и для истинных эндофитов.

Хорошо известно, что одной из универсальных защитных реакций растений в ответ на механические повреждения, а также атаку фитопатогенов является синтез лигнина в растительных тканях из мономерных фенольных соединений, создающий своеобразную защитную стену и барьер на пути распространения инфекции. Основными фенольными соединениями, входящими в состав лигнина, укрепляющего клеточные стенки растений, являются оксикоричные кислоты, а ключевым соединением - феруловая кислота (ФК) (De Oliveira et al., 2015).

Известно, что фенольные соединения, вовлекающиеся в лигнификацию, способны подавлять рост фитопатогенных грибов (Patzke et al., 2018). В этой связи возникает вопрос, как влияют такие соединения на самих эндофитов, так как по аналогии с действием на фитопатогенные микроорганизмы, эти вещества

могут подавлять рост и размножение не только фитопатогенных, но и мутуалистических эндофитных бактерий. Например, Merkl с соавт. (2010) наблюдали подавление роста бактерий *Escherichia coli* DMF 7503, *Bacillus cereus* DMF 2001, *Listeria monocytogenes* DMF 5776 под действием ФК. Такой эффект Borges с соавт. (2013) объясняют влиянием ОК на физико-химические свойства внешних структур бактериальных клеток, поверхностный заряд, целостность бактериальной цитоплазматической мембраны. Вместе с тем у представителей *B. subtilis* обнаружена способность использовать ФК в качестве единственного источника углерода (Gurujeyalakshmi et al., 1987).

В связи с этим очередной задачей работы являлось исследование влияния ФК, кумаровой и сиригновой кислот в концентрациях, близких к характерным для содержания в ризосфере растений, на рост колоний на плотных средах и размножение в жидких двух эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ.

Известно, что ФК, как и другие ОК, находится в растительных тканях в связанной форме в структуре лигнина (De Oliveira et al., 2015). Однако, по данным Wu с соавторами (Wu et al., 2000), она может выделяться в окружающую корни среду в виде цис-формы, в среднем, в концентрации 2,3 мкг/л, в транс-форме - 10,2 мкг/л. На основании этих данных в исследования включали два порядка концентрации кислот – 10 и 100 мкг/л, а в некоторых экспериментах и заведомо большую - порядка 1000 мкг/л.

На плотных агаризованных средах (1,5% агара) колонии бактерий *B. subtilis* 26Д лучше росли в размерах на богатой питательной среде LB, и ожидаемо хуже на обедненной белками минерализованной среде ПСС (рис. 2а). В присутствии ФК рост колоний бактерий подавлялся на всех изученных средах, достоверно при концентрации ФК 100 мкг/л, наличие которой приводило к минимальному размеру колоний.

При культивировании микроорганизмов в жидкой питательной среде выявлен обратный эффект действия ФК на размножение бактерий (рис. 2б).

Например, при концентрации ФК 100 мкг/л к 48 ч роста культуры наблюдалось шестикратное увеличение плотности клеток в сравнении с контрольной средой.

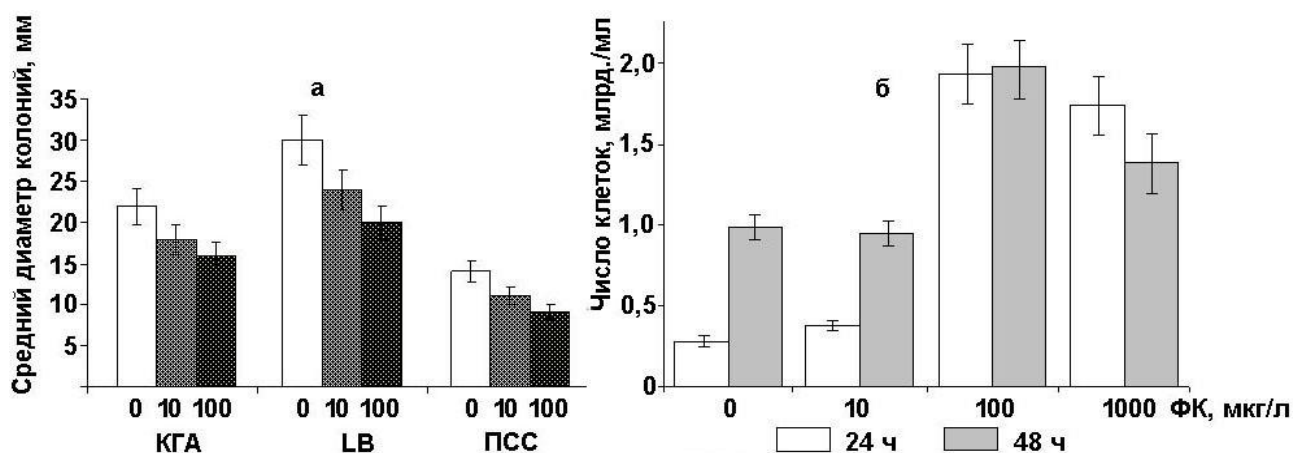


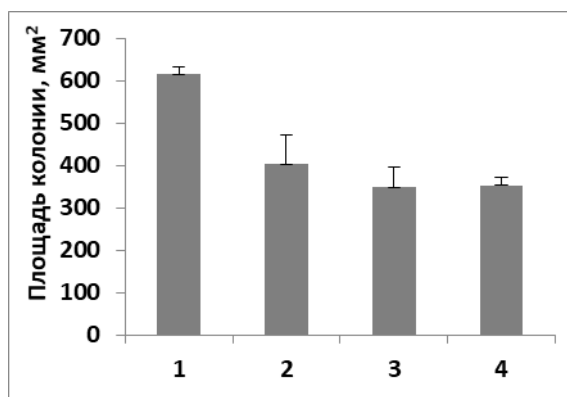
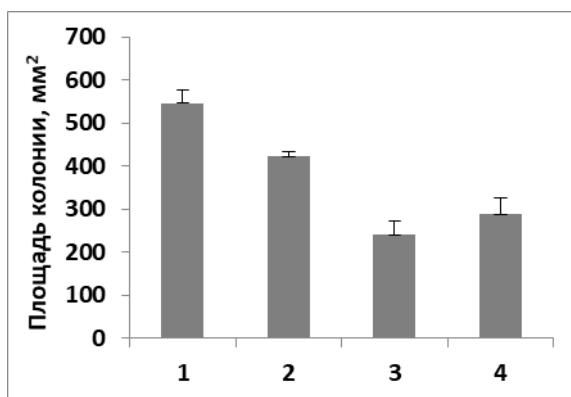
Рисунок 2 – Влияние феруловой кислоты на рост колоний *B. subtilis* 26Д на плотных средах (а) и на размножение клеток (б) в жидкой среде LB.

Аналогичный эффект наблюдался при внесении кумаровой кислоты в питательные среды (рис. 3) и в случае действия их в среде на другой штамм бактерий – *B. subtilis* 11ВМ (рис 4.).

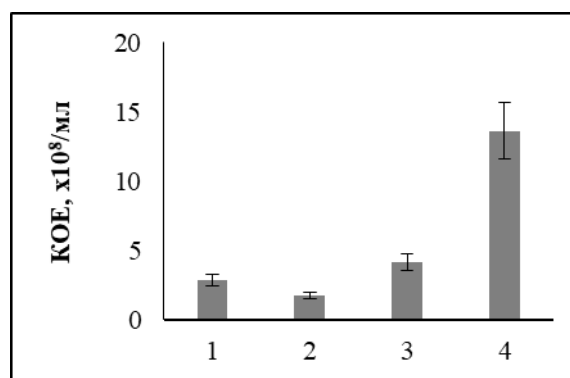
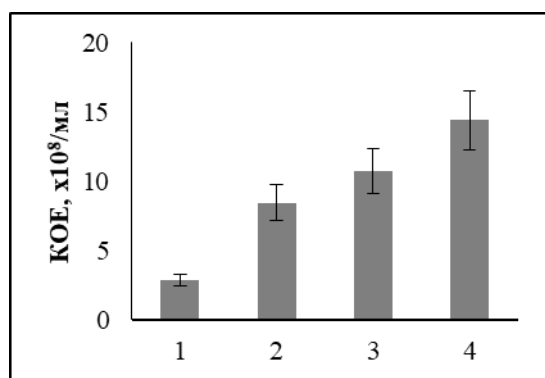
Ингибирование роста колоний бактерий на плотной среде могло быть связано с описанным ранее Borges с соавт. (2013) непосредственным влиянием ФК не только на физико-химические свойства бактериальных клеток, поверхностный заряд и целостность бактериальной цитоплазматической мембраны, но и на подвижность клеток бактерий. Известно, что бактерии используют различные двигательные механизмы для колонизации окружающей среды, такие как жгутико-зависимое плавание и роение, а также жгутико-независимое скольжение. R. Harshey (2003) указывает, что скользящая подвижность является пассивным способом перемещения бактериальных клеток для распространения по поверхностям.

Наличие в агаризованном субстрате сириговой кислоты также приводило к торможению роста колоний бактерий (рис. 3А). В жидкой среде стимуляция размножения клеток на 24 ч наблюдалась при внесении этого соединения с концентрацией в 100 раз больше, чем феруловой или кумаровой (рис. 3Б).

А



Б



Кумаровая кислота

Сиринговая кислота

Рисунок 3 – Размер колоний бактерий *B. subtilis* 26Д (А) на 1,5% агаризованной среде LB и титр клеток в жидкой культуре LB через 24 ч размножения (Б) при введении в среды кумаровой или сиринговой кислот. Цифрами обозначены концентрации кислот: 1 – контроль, без кислот; 2 – 10 мкг/л; 3 – 100 мкг/л; 4 – 1000 мкг/л.

Из этих механизмов подвижности наименее исследованы механизмы скольжения клеток, когда экспансивная сила пролиферации движет их к периферии клеточной массы на среде с поверхностью, уменьшающей трение между клетками и субстратом (Henrichsen et al., 1972).

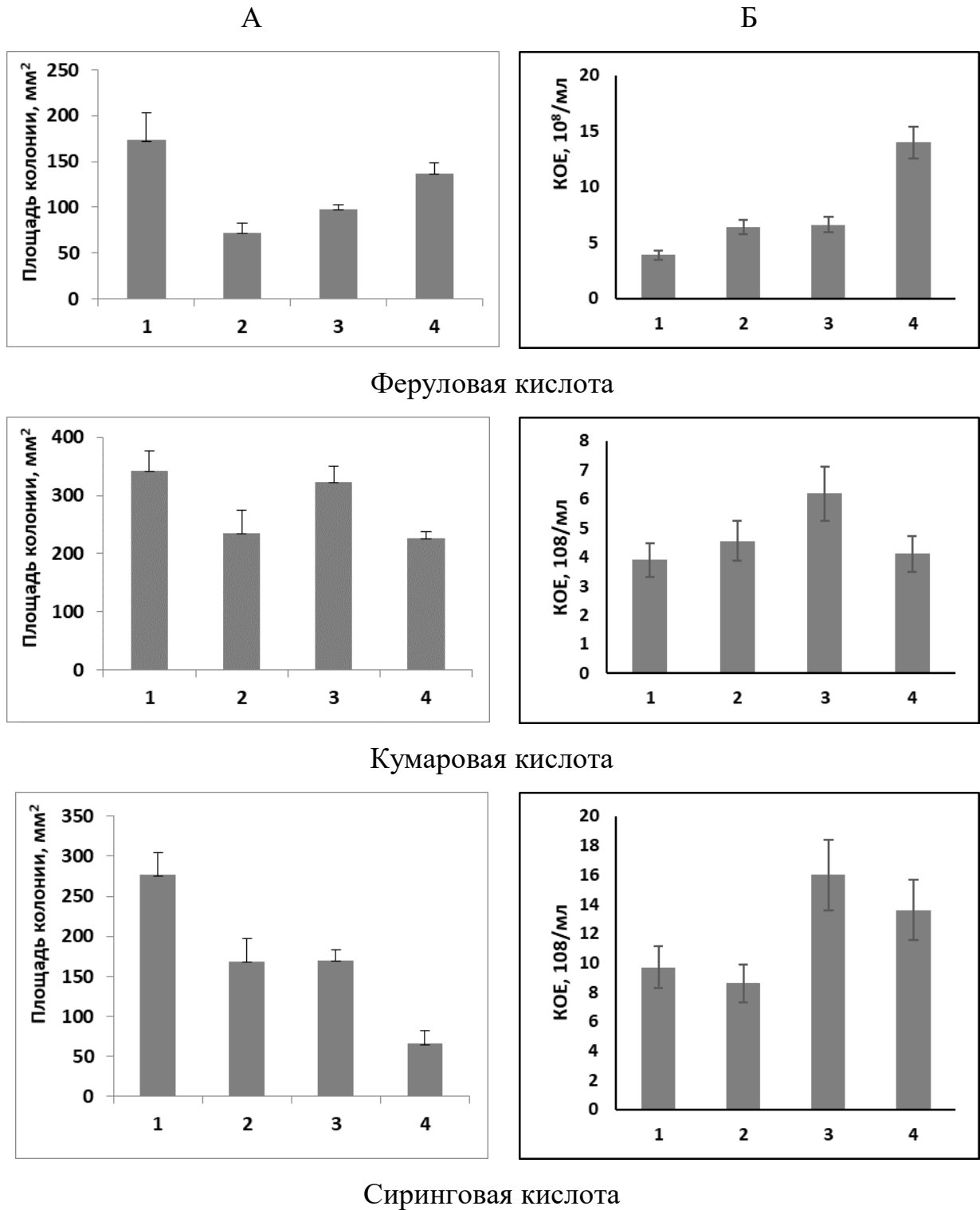


Рисунок 4 – Размер колоний бактерий *B. subtilis* 11 VM (А) на 1,5% агаризованной среде LB и титр клеток в жидкой культуре LB через 24 ч размножения (Б) при введении в среды феруловой, или кумаровой, или сиринговой кислот. Цифрами обозначены концентрации кислот: 1 – контроль, без кислот; 2 – 10 мкг/л; 3 – 100 мкг/л; 4 – 1000 мкг/л.

Для исследования возможности распространения бактерий по поверхности твердой среды по типу скольжения и, одновременно, распространению, возможно, благодаря хемотаксису, использовали полутвердую среду LB (0,7% агара) с градиентом ФК, сформированном как описано в разделе 2.17. Выявлено, что на такой среде, содержащей ФК, размеры колоний бактерий многократно увеличивались (рис. 5). При этом не выявлен преимущественный рост колоний в сторону увеличения концентрации ФК – колонии формировались правильной круглой формы. На среде LB без ФК клетки формировали типичные для штамма *B. subtilis* 26Д сухие, морщинистые колонии с четко очерченными фестончатыми краями. На среде с ФК колонии «расплывались», края были нечеткими, лучистыми, были, примерно, от полутора до двух раз больше в диаметре в сравнении с колонией на контрольной среде без ФК.

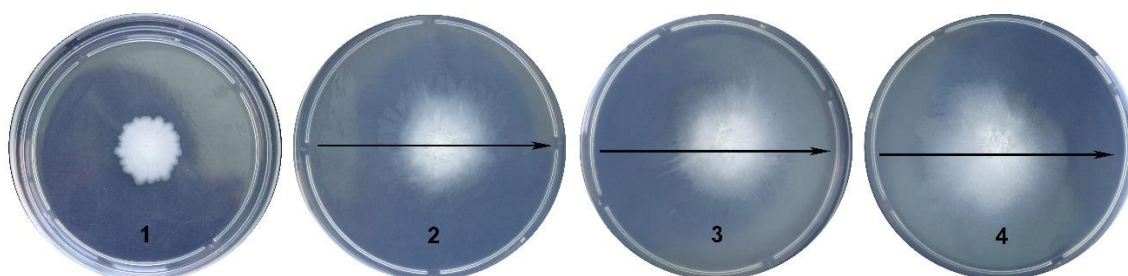


Рисунок 5 – Форма колоний бактерий на полутвердой среде с градиентом концентрации ФК. Стрелкой указано направление увеличения концентрации соединения в среде: слева направо 0-10 мкг/л, 0-100 мкг/л и 0-1000 мкг/л.

В такой же постановке эксперимента на среде LB с 0,7% агарозой оценивали влияние присутствия кумаровой кислоты на подвижность бактерий *B. subtilis* 11ВМ (табл. 16). Выявлен аналогичный действию на штамм *B. subtilis* 26Д эффект активации распространения колоний бактерий и штамма *B. subtilis* 11ВМ.

Таблица 16 – Диаметр колоний бактерий *B. subtilis* 11ВМ на агаризованной (0,7%) среде LB, мм

Концентрация кумаровой кислоты, мкг/л	Диаметр колоний, мм
Контроль	132
10	598
100	756
1000	528

Известно, что некоторые штаммы *B. subtilis* способны к деструкции ОК благодаря наличию гена, кодирующего синтез декарбоксилазы фенольных кислот (PAD) (Cavin et al., 1998), транскрипционно регулируемой кумаровой, феруловой или кофейной кислотами (Tran et al., 2008).

На основе этих данных методом ПЦР мы провели анализ наличия в геноме бактерии *B. subtilis* 26Д последовательности нуклеотидов, аналогичных гену PAD. Установлено, что геном этой бактерии содержит последовательность, аналогичную гену, кодирующему декарбоксилазу фенольных кислот (рис. 6).

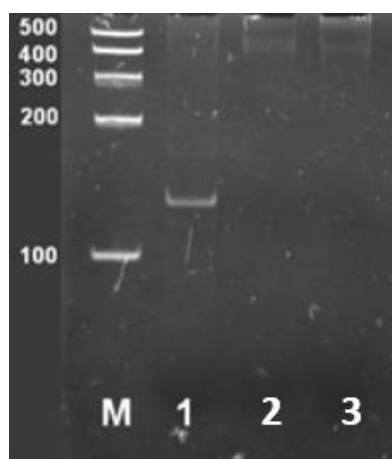


Рисунок 6 – Результат ПЦР штамма *B. subtilis* 26Д. М – маркер молекулярной массы («Sibenzim», Россия), 1 - ДНК *B. subtilis* 26Д, 2 - ДНК *B. subtilis* 11ВМ; 3 - отрицательный контроль.

На основании этих данных была проведена оценка наличия в среде фермента,

способного использовать ФК в качестве субстрата. Для этого в постановке эксперимента, описанного в разделе 2.17., оценивали изменение спектра поглощения ФК в среде с живыми и инактивированными клетками бактерий. Спектры поглощения растворов ФК с живыми клетками бактерий в начале реакции (линия 1), а также в суспензии инактивированных клеток бацилл после инкубации (линия 2) совпадали (рис. 7).

Уменьшение показателя оптической плотности раствора ФК в суспензиях клеток можно объяснить частичной адсорбцией вещества на стенках клеток. Инкубация кислоты с живыми клетками меняла спектр поглощения ФК, что согласуется с данными других авторов (Degrassi et al., 1995), объясняющих этот эффект деструкцией вещества. Спектр поглощения ФК при инкубировании в среде с инактивированными клетками не изменялся. Таким образом, установлено, что клетки этой эндофитной бактерии способны метаболизировать ФК.

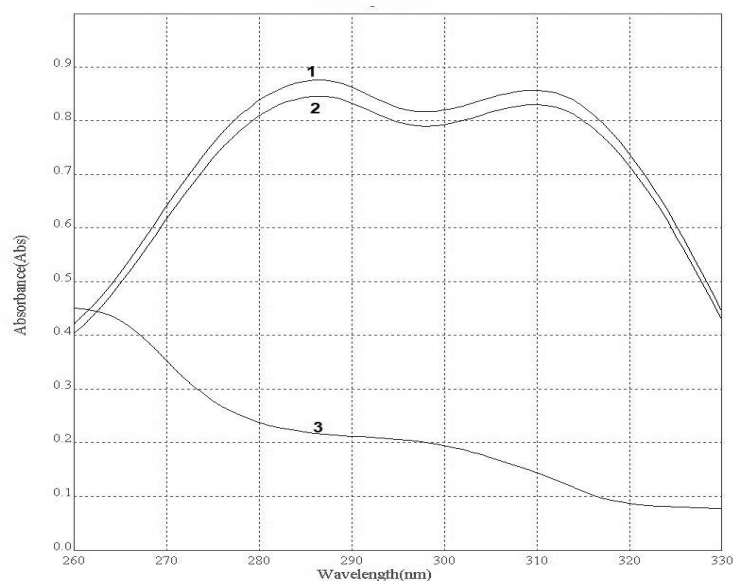


Рисунок 7 – Изменение спектра поглощения феруловой кислоты в среде с клетками *B. subtilis* 26Д. 1 – спектр поглощения раствора ФК в среде с живыми клетками в начале реакции; 2 – спектр поглощения раствора ФК после инкубации 120 мин в среде с инактивированными клетками; 3 - спектр поглощения раствора ФК через 120 мин инкубации в среде с живыми клетками.

Итак, нами впервые выявлено, что при наличии в среде оксикоричных кислот – феруловой и кумаровой, в концентрациях, характерных для секреции корнями растений при увеличении влажности твердой среды рост и скорость распространения колоний бактерий *B. subtilis* по поверхности может возрастать. Впервые установлена способность бактерий штамма 26Д *B. subtilis* к деструкции феруловой кислоты.

3.4. Выявление активности РНКаз у эндофитных штаммов бактерий и способности эндофитов защищать растения картофеля от вирусных инфекций

Механические повреждения растительных тканей, возникающие вследствие различных факторов - поедания растений насекомыми, градобития, заморозков, действия машин при агротехнических мероприятиях (окучивание, химическая прополка) и др., создают своеобразные «ворота» не только грибной и бактериальной, но и вирусной инфекции. Вирусы наносят существенный ущерб урожаю сельскохозяйственных культур и качеству продукции растениеводства. Хорошо известно, что бактериальные препараты используются в практике защиты растений от грибных и/или бактериальных болезней, тогда как противовирусных биопрепаратов для защиты растений пока нет. Геном большинства растительных вирусов представляет собой РНК (Roossinsk, 2017). В то же время многие виды бактерий способны синтезировать ферменты РНК-азы, разрушающие РНК (Bechhofer et al., 2019). Сочетание свойств эндофитности у определенных штаммов бактерий со способностью продуцировать экзонуклеазы (РНКазы) может существенно влиять на размножение вирусных частиц в растительных тканях. Например, индийскими учеными выявлено, что эндофитный штамм бактерии *B. licheniformis* (СоЕН6) эффективно подавлял у растений томата развитие симптомов, вызванных поражением вирусом стрика (Vinodkumar et al., 2018.).

До наших работ системных исследований наличия РНКазной активности у эндофитов мы не встречали в литературе, в связи с чем была поставлена задача

оценки наличия и сравнительного уровня активности экзоРНКаЗ в культурах эндофитов.

В связи с этим двумя методами, описанными в разделе 2.15., мы анализировали активность РНКаз у 175 эндофитных штаммов бактерий, выделенных из разных видов растений. Активность РНКаз в жидкой среде анализировали совместно с к.б.н. Черепановой Е.А.

Все бактерии, отнесенные нами к роду *Bacillus*, продуцировали фермент, способных к деградации РНК на твердых средах (табл. 17). У бактерий *Pseudomonas* sp. такая активность проявлялась у 85% образцов, у *Enterobacter* sp. – у 64%. 32 неидентифицированных штамма также были способны секретировать РНКазы в окружающую среду. Зона вокруг колонии бактерии, в которой разрушалась дрожжевая РНК (зона гало), была больше у всех представителей рода *Bacillus* – в среднем 5,71 мм. Размер зоны гало у представителей *Pseudomonas* и *Enterobacter* был примерно одинаковый и составлял 1,84 и 1,74 мм, соответственно.

Таблица 17 – Активность РНКаз на твердой среде

Виды бактерий	Количество штаммов	Средний размер зоны гало, мм	Число штаммов, проявивших активность, %
<i>Bacillus</i> , в т.ч.:	49	5,71	100
<i>B. subtilis</i>	20	4,85	100
<i>B. thuringiensis</i>	3	3,67	100
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3	8,50	100
<i>Bacillus</i> sp.	23	5,85	100
<i>Enterobacter</i> sp.	81	1,74	64
<i>Pseudomonas</i> sp.	13	1,84	85
Не идентифицированы	32	3,96	100
Всего	175	4,51	82

Анализ связи между активностью РНКаз в твердой среде и в жидкой культуре (табл. 18) выявил слабую положительную корреляцию между этими показателями (коэффициент корреляции $r=0,50$).

Таблица 18 – Активность РНКаз в твердой среде и в жидкой культуре

Вид	Штамм	Активность РНКаз		Титр клеток, КОЕ×10 ³ /г сырой массы
		оптическая плотность/(мин×мл)	зона гало, мм	
<i>B. subtilis</i>	TS2	6,45±1,03	3,0	120,0±14,2
	STL7	5,87±0,96	6,5	3,5±0,1
	26Д	3,97±0,77	4,5	350,0±15,6
	11ВМ	3,04±0,55	7,0	90,0± 2,3
<i>B. thuringiensis</i>	ВКПМ-6066	6,02±0,86	4,0	90,0±13,4
	ВКПМ-5351	1,32±0,08	2,0	70,0±12,3
	ВКПМ-5689	2,64±0,04	5,0	3,0±0,11
<i>Enterobacter sp.</i>	BC-8	0	0	0,01±0,001

Среди штаммов, проявляющих высокую активность РНКаз на твердых средах в виде зон гало встречались также штаммы, характеризующиеся одновременно и высокой антагонистической активностью к фитопатогенным грибам (табл. 19), что позволяет сделать вывод о проявлении комплексной биологической активности – потенциальной антивирусной и фунгицидной.

Таблица 19 – Антагонистическая активность некоторых штаммов (% от контроля)

Номер штамма	Вид	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. solani</i>	<i>A. solani</i>	<i>Ph. infestans</i>	РНК-аза, мм
2п5	<i>Bacillus sp.</i>	45,5	69,2	20,0	50,0	7
1п4	<i>Bacillus sp.</i>	25,0	30,0	33,3	50,0	8
3сх4	Не идентифицирован	72,7	69,2	50,0	57,1	9
3сх5	<i>Bacillus sp.</i>	84,6	84,6	63,6	50,0	7
3сх7	Не идентифицирован	84,6	76,9	62,5	50,0	7

В полевых экспериментах совместно с сотрудниками лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН и Татарского НИИСХ Казанского ФИЦ показано, что обработка растений картофеля

препаратом, содержащим клетки *B. subtilis* 26Д - основу биофунгицида Фитоспорин-М,, привела к уменьшению поражения растений вирусом М, а при обработке смесью штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. ssp. thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и *B. thuringiensis ssp. kurstaki* (ВКПМ В-6066), статистически достоверно уменьшилось распространение YBK и SBK на 57% и 44%, соответственно по сравнению с контролем (табл. 20).

Таблица 20 – Поражение растений картофеля сорта Невский вирусами (%)

Вариант	Вирус картофеля		
	YBK	SBK	MBK
Контроль	50,4±4,3	33,6±4,0	5,8±2,0
<i>B. subtilis</i> 26Д	47,9±5,9	43,7±5,9	1,4±1,4
МИКС	21,7±5,0*	18,8±4,7*	5,8±2,8

*Различия с контрольными растениями статистически значимы ($p < 0,05$)

Сходным образом обработка растений картофеля уменьшала степень распространения вирусов при проведении полевых экспериментов на опытном поле Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства – обособленного структурного подразделения УФИЦ РАН. Так, если на контрольных делянках было поражено 60% растений, то при обработке препаратом бактерий *B. subtilis* 26Д выявлено 18% больных растений, при применении препарат бактерий *B. thuringiensis* В-5689 - 33%.

Таким образом, наличие антивирусной активности препарата, содержащего три штамма бактерий (табл. 20), из которых два вида относятся к инсектотоксичным, могло проявиться как благодаря подавлению распространённости насекомых переносчиков вирусов и, как следствие, уменьшению ими повреждения, так и наличием активности РНКаз, способных разрушать РНК вирусных частиц. При этом штаммы *B. thuringiensis* существенно отличались между собой по активности фермента. Наибольшей активностью характеризовался штамм ВКПМ-6066, наименьшей - ВКПМ-5351. Выделенный из листьев картофеля, поврежденных колорадским жуком, штамм *Enterobacter sp.*

BC-8 не проявлял активности РНКазы. Максимальная активность отмечалась в культуральной жидкости изолята *Bacillus* sp. STL7 (табл. 18).

В полевых экспериментах также выявлено, что обработка растений картофеля препаратами эндофитов, продуцирующих РНКазы более высокой активности в сравнении с другими штаммами эффективнее защищали растения от вирусов (рис. 8, данные получены совместно с соавторами статьи Sorokan, 2020).

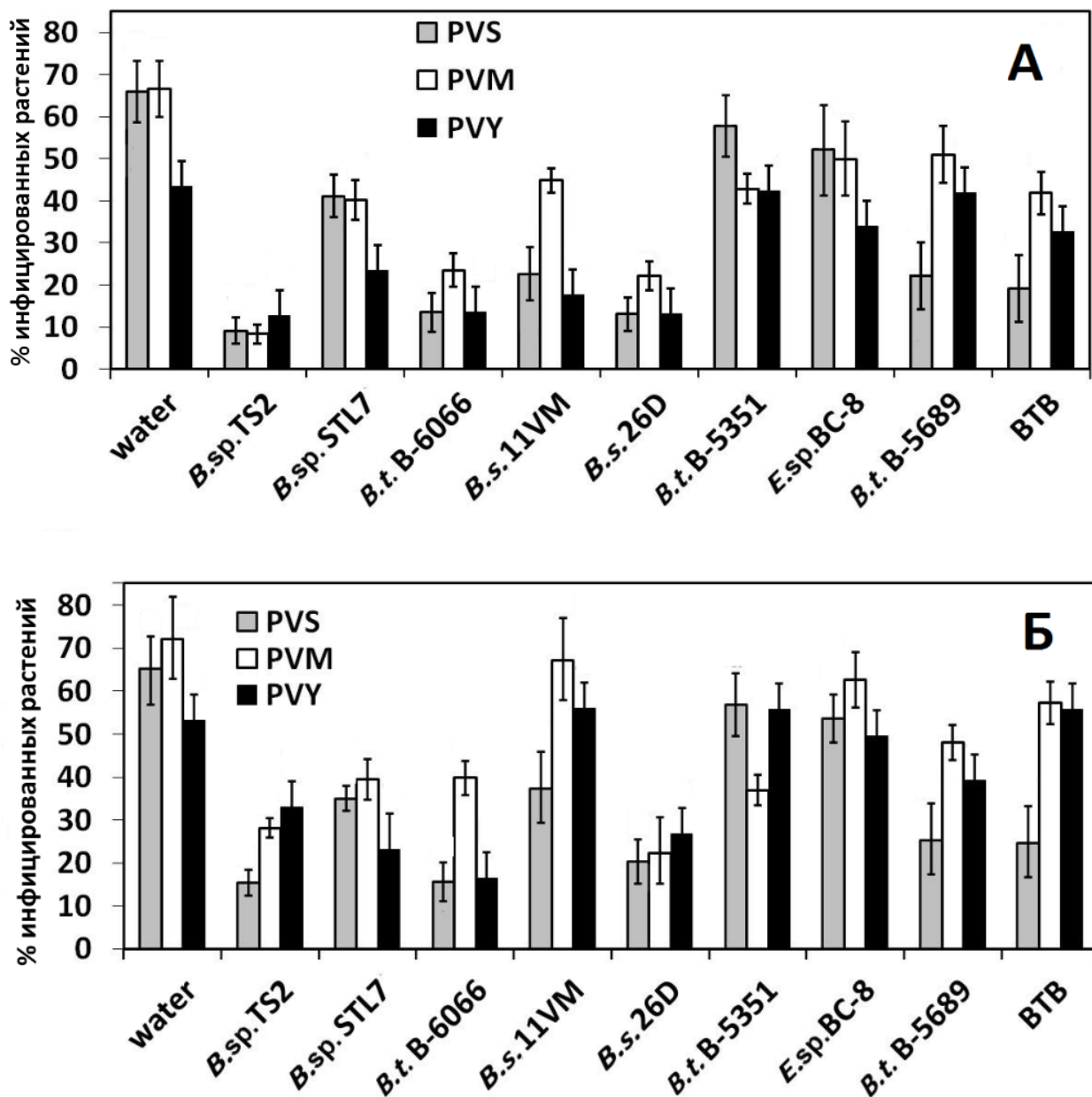


Рисунок 8 – Количество инфицированных вирусами растений после обработки посадок картофеля бактериальными препаратами: А - на 17-й день после обработки, Б - на 29-й день после обработки.

Наименьший процент инфицированных растений был выявлен при обработке картофеля бактериями *Bacillus* sp. TS2, STL7, *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* ВКПМ 6066.

Достоверно высокий коэффициент корреляции между титром клеток бактерий в тканях растений картофеля и распространенностью вирусов выявлен при инфицировании вирусом S (PVS) ($r=-0,865972$), а между активностью бактериальной РНКазы и распространением вирусной инфекции при поражении растений вирусом Y (PVY, при первой фиксации растительного материала через 17 дней после обработки $r=-0,76322$, через 29 дней $r=-0,5734$), а также смешанной инфекцией вирусами M и Y (PVM+PVY (первая фиксация $r=-0,8675$), и PVY + PVS (первая фиксация $r=-0,6543$).

Анализ способности эндофитов к деструкции РНК показал, что высокая активность этого фермента характерна для представителей рода *Bacillus*, тогда как многие представители *Enterobacter* не проявляют такой активности в постановке экспериментов на твердых агаризованных средах. Выявлена достоверная положительная связь между высокой активностью РНКаз у эндофитов и устойчивостью картофеля к вирусу Y, а также смешанным инфекциям с вирусами S и M.

3.5. Создание рекомбинантного штамма *B. subtilis* 26ДCryChS и оценка его свойств

В нашей работе одним из основных объектов исследований был эндофитный штамм *B. subtilis* 26Д – основа коммерческого биофунгицида Фитоспорин-М, применяющегося в России на посевах сельскохозяйственных культур на протяжении нескольких десятилетий. Известно, что эта бактерия характеризуется антагонистической активностью к фитопатогенным грибам, и, как показано нами, способностью продуцировать РНКазы. Очевидно, что в совокупности со свойством штамма индуцировать устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды (Курамшина и др., 2017, Пусенкова и др., 2020), эти качества

эндофита позволяют использовать для защиты растений как основы указанного препарата. Предварительная оценка в лабораторных условиях выявила, что обработка растений бактериями *B. subtilis* 26Д увеличивает смертность насекомых, но, как было установлено, это происходит вследствие изменения под влиянием бактерии микробиоценоза в кишечнике насекомых (Sorokan et al., 2016), тогда как прямого инсектотоксичного действия данный штамм не проявляет. При наличии инсектицидных свойств этот эндофит мог бы быть одной из основ универсального препарата для комплексной защиты растений от вредных организмов. Так как штамм является эндофитным, т.е. проникает в растения без механических повреждений, и безопасным согласно паспорту, возникло предположение о возможности трансформации его геном, кодирующим синтез инсектотоксичного белка, например, семейства Cry с целью получения штамма, проявляющего комплекс хозяйственно-полезных свойств. На этом основании нами была предпринята попытка трансформации этого штамма путем введения в геном бактерии указанного выше инсектотоксичного гена совместно с к.б.н. Благовой Д.К.

Для трансформации *B. subtilis* была использована интегративная плазмиды pDG1662 (рис.9).

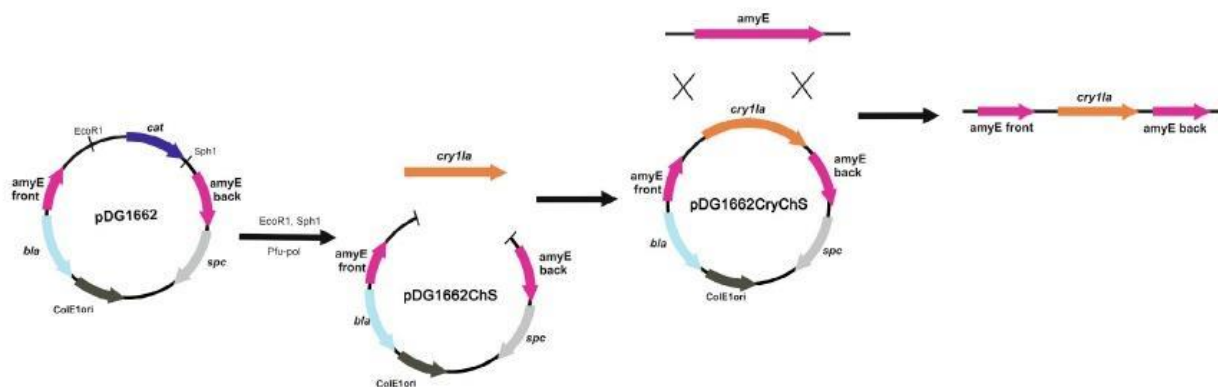


Рисунок 9 – Конструирование интегративной плазмиды pDG1662CryChS. AmyE' front, amyE back - фрагменты гена α-амилазы *B. subtilis* 168, *cat* - ген хлорамфениколацетилтрансферазы, *bla*- ген бета-лактамазы; *spc* - ген спектиномицина в аденилтрансферазе; *EcoRI*, *SphI* - сайты рестрикции, *Btcrylla* - кодирует белок Crylla, *ColE1ori* - сайт репликации у *E. coli*.

В данном векторе часть его, включающая полилинкерный сайт и ген хлорамфеникол - ацетилтрансферазы, ограничена фрагментами гена амилазы. В ходе гомологичной рекомбинации должно происходить встраивание кодирующей последовательности в бактериальную хромосому. Метод трансформации обеспечивает стабильное сохранение целевого гена.

В результате были получены линии с частотой трансформации 200 КОЕ/мкг плазмидной ДНК. Как в донорном штамме бактерий *B. thuringiensis* В-5351, так и в отобранной линии *B. subtilis* 26ДCryChS наблюдался сравнимый уровень транскрипции гена *BtcryIIa*. Для проверки экспрессии данного гена в рекомбинантном штамме использовалась ОТ-ПЦР (рис. 10).

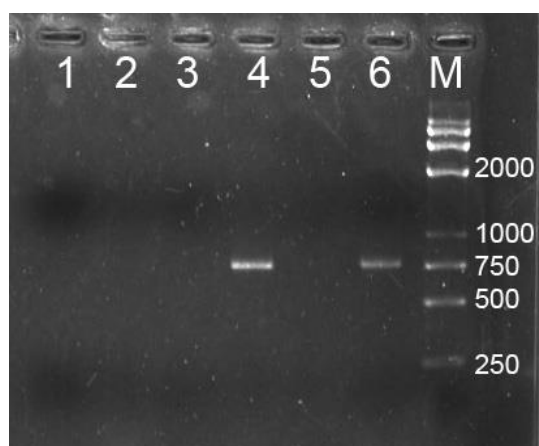


Рисунок 10 – Результат ОТ-ПЦР рекомбинантного штамма *B. subtilis* 26ДCryChS. Дорожки: 1 - РНК *B. subtilis* 26Д; 2 - к-ДНК *B. subtilis* 26Д; 3 - РНК *B. thuringiensis* ВПКМ-5351; 4 - к-ДНК *B. thuringiensis* ВПКМ-5351; 5 - РНК *B. subtilis* 26ДCryChS; 6 - к-ДНК *B. subtilis* 26ДCryChS; М – маркер молекулярной массы («Sibenzim», Россия).

Как видно на рис. 10, рекомбинантный штамм 26ДCryChS содержал кДНК, аналогичную по размерам ДНК, кодирующую белок Cry у штамма *B. thuringiensis* ВПКМ-5351.

Наличие генов устойчивости к антибиотикам, которые не присутствуют в

естественных условиях в природных штаммах *B. thuringiensis*, но требуются для отбора рекомбинантов, считается проблемой с точки зрения экологической безопасности трансформированных штаммов. В связи с этим ген *cat*, который определяет устойчивость трансформированных линий к хлорамфениколу, был удален перед трансформацией с использованием эндонуклеаз *EcoR1* и *SphI*.

Таким образом, селективным свойством трансформированных бактерий является только утрата способности гидролизировать крахмал.

Трансформированные линии выявляли на среде LB, содержащей 1% крахмала после воздействия паров йода. Колонии исходного штамма *B. subtilis* 26Д (амилаза +) показали появление светлых ореолов вокруг колоний, в то время как подвергшиеся модификации клетки его не образовывали, то есть не имели искомой активности (рис. 11).

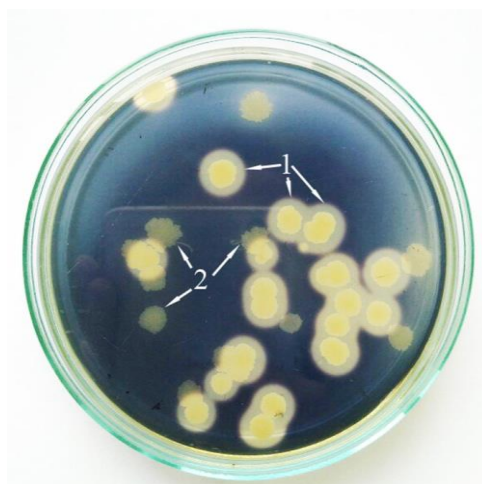


Рисунок 11 – Селекция рекомбинированных интегративной плазмидой pDG1662CryChS клеток *B. subtilis* 26Д на среде LB, содержащей 1% крахмала, под действием паров йода: 1 – линии исходного штамма *B. subtilis* 26Д, не подвергшиеся рекомбинантной трансформации; 2 – рекомбинированные линии *B. subtilis* 26Д.

Активности амилазы и светлого ореола вокруг колоний рекомбинантных линий не наблюдалось (рис. 12).

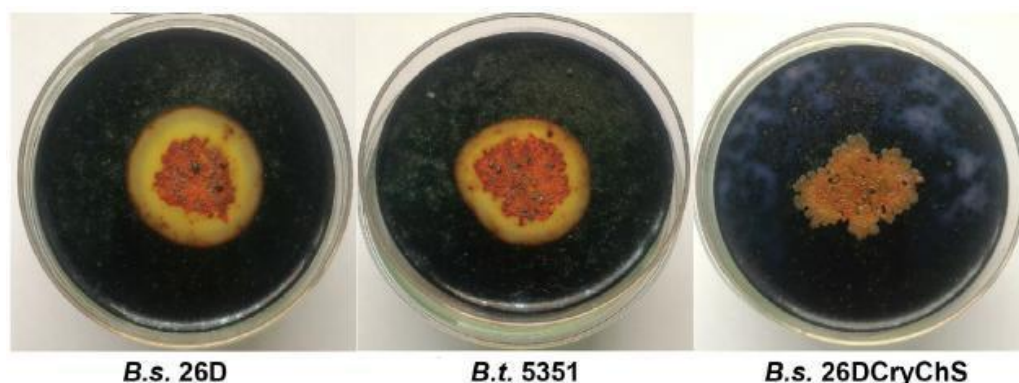


Рисунок 12 – Колонии *Bacillus spp.* на среде LB, содержащей 1% крахмала, под действием паров йода.

Таким образом, с использованием плазмиды pDG1662CryChS нами созданы целевые линии *B. subtilis* 26DCryChS в дальнейшем оцененные по ряду производственно-значимых признаков (табл. 21).

Рекомбинантная линия *B. subtilis* 26DCryChS не отличалась по культурально-морфологическим признакам от исходного штамма *B. subtilis* 26Д. Содержание клеток линии *B. subtilis* 26DCryChS во внутренних тканях листьев пшеницы составляло $5,1 \times 10^5$ КОЕ / г, что не меньше количества штамма *B. subtilis* 26Д (4×10^5 КОЕ/г). Количество *B. thuringiensis* В-5351 клеток составляло около 700 КОЕ/г. И штамм *B. subtilis* 26Д, и линия *B. subtilis* 26DCryChS обладали фунгистатическими свойствами в отношении *S. nodorum*. Донор штамма Vtcrylla – штамм *B. thuringiensis* В-5351 не подавлял рост *S. nodorum*. Обработка семян пшеницы бактериями штамма 26DCryChS стимулировала рост проростков; сохранилась также фосфатмобилизирующая активность клеток (табл.21).

Антагонистическая активность *in vitro* против фитопатогена *Ph. infestans*, вызывающего фитофтороз картофеля, была на 20% больше, площадь поражения листьев пшеницы фитопатогеном *S. nodorum* была на 30% меньше, чем у исходного штамма *B. subtilis* 26Д.

Таблица 21 – Биологическая активность штаммов *Bacillus* spp.

Контроль	<i>B. subtilis</i> 26Д (128 ВНИИСХМ)	<i>B. subtilis</i> 26ДCryChS (RCAM04928)	<i>B. thuringiensis</i> (B-5351, ВКПМ)
Количество клеток бактерий, выделенных из поверхностно стерилизованных проростков пшеницы (в 1 г сырой массы), выращенных из обработанных бактериями семян			
0 (не обработаны)	4×10^5	5×10^5	7×10^2
Стимуляция роста проростков пшеницы (сырая масса по отношению к контрольным растениям, %), выращенных из семян, обработанных бактериями			
-	+25%	+32%	+6%
Диаметр зоны гало (мм) в агаризованной среде, содержащей нерастворимые фосфаты ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)			
-	6,6	6,7	2,0
Смертность личинок III возраста колорадского жука <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (%) через 7 суток после кормления обработанными листьями картофеля			
15 (естественная)	46	80	77
Смертность личинок III возраста колорадского жука <i>L. decemlineata</i> (%) через 7 суток после кормления листьями, предварительно инокулированных растений картофеля			
19 (естественная)	30	62	26
Смертность тлей <i>Schizaphis graminum</i> (%) через 5 суток после кормления обработанными листьями пшеницы			
5 (естественная)	29	58	61
Площадь поражения фитопатогеном <i>Stagonospora nodorum</i> листьев пшеницы (мм^2), выращенных из семян, обработанных бактериями			
45 (не обработаны)	15	10	30
Диаметр зоны подавления роста фитопатогена <i>Phytophthora infestans</i> (мм) на питательном агаре (антагонистическая активность)			
-	10	12	4
Активность РНКаз, оптическая плотность/(мин×мл)			
-	$3,97 \pm 0,77$	$4,30 \pm$	$1,32 \pm 0,08$
Активность РНКаз, размер зоны гало мм			
-	4,5	3,5	2,0

Хорошо известно, что фунгицидные и фунгистатические свойства многих штаммов бактерий *B. subtilis* проявляются благодаря микробному синтезу антибиотиков группы сурфактинов. Проведенные нами дополнительные исследования свойств бактерий, указанных в таблице, выявили, что вновь

созданный штамм продуцировал сурфактина на 20% больше, чем бактерии *B. subtilis* 26Д, чем можно объяснить более высокую антагонистическую активность клеток *B. subtilis* 26ДCryChS по отношению к *Ph. infestans* и защитную при заражении растений фитопатогеном *S. nodorum*.

Новым свойством для модифицированного потомства бактерии *B. subtilis* 26ДCryChS является высокая инсектицидная активность, существенно (примерно, в 2 раза) превышающая таковую по сравнению с исходным штаммом *B. subtilis* 26Д, сопоставимая, для сравнения, по значению с инсектицидными свойствами *B. thuringiensis* В-5351 по смертности тлей (61% и 58%, соответственно, табл. 21, данные получены совместно с соавторами статьи Maksimov, 2020) и превышающая значения у штамма *B. thuringiensis* В-5351 по смертности личинок колорадского жука в тесте с предварительной обработкой целых растений препаратами (26% и 62%, соответственно, табл. 21, данные получены совместно с соавторами статьи Sorokan, 2020).

По данным научно-технической и патентной литературы модифицированный штамм ранее не был известен, что, в совокупности, позволило депонировать его в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (ВКСМ) под номером РСАМ04928 и далее запатентовать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди различных направлений исследования свойств эндофитных бактерий до сих пор дискуссионными остаются вопросы определения какие бактерии можно отнести к эндофитам (Hardoim et al., 2015). Существует несколько точек зрения в отношении термина «эндофит», позволяющие насчитать не менее десяти определений (Holliday, 1989; Hallman, 1997; Gaiero et al., 2013). Результаты наших исследований подтверждают мнение многих авторов, цитируемых в указанных выше работах, что значительное число видов и штаммов бактерий могут проникать в растительные ткани через механические повреждения, возникающие при поедании растений насекомыми, при обработке почвы и/или посевов сельскохозяйственными машинами и действии других факторов.

Антропогенные или природные (насекомые, град) механические повреждения растений в наших экспериментах увеличивали концентрацию микробных клеток в растительных тканях, что было ожидаемо. Так, при механических повреждениях способны проникать изученные нами молочнокислые бактерии *L. plantarum* 3L, а также бактерии *B. thuringiensis* ВКПМ В-5689. Выделение экссудата из тканей таких растений как огурец, чистотел, слива, очевидно, приводит к закупорке ран и, как следствие, перекрывает доступ микроорганизмам во внутренние ткани, чем можно объяснить небольшую частоту выделения в наших экспериментах бактерий из образцов указанных видов растений.

Согласно Hyde и Soyton (2008) справедливо обсуждать эндофитность в аспекте эволюции взаимоотношений макро- и микроорганизма. Обсуждая генетический аспект эндофитности и вопросы выделения из растительных тканей некультивируемых форм бактерий, отдельные исследователи рассматривают эндофитов как набор микробных геномов, локализованных внутри органов растений («... microbial genomes located inside plant organs») (Bulgarelli et al., 2013). Интересным в аспекте обсуждения свойств эндофитности является, на наш взгляд, способность бактерий проникать в растительные ткани через устьица с помощью жгутиков. Так было показано, что мутация в генах флагеллинов *flaA*

(*Listeria monocytogenes*) или *flaC* (*Escherichia coli* O157:H7) у патогенных для человека бактерий приводит к потере имевшейся у них способности проникать внутрь растений (Gorski, Duhe, Flaherty, 2009; Xicohtencatl-Cortes et al., 2009).

Нами получены новые данные о том, что совместная инокуляция растений эндофитной бактерией *B. subtilis* 26Д и не эндофитной лактобациллой *L. plantarum* 3L может способствовать проникновению клеток последней в ткани растений без механических повреждений. Эти результаты согласуются с результатами работы Wells и Butterfield (2011), в которой нанесение на ткани моркови, картофеля или перца бактерий *Pseudomonas viridiflava* совместно с бактериями *Salmonella typhimurium* или бактерий *Erwinia carotovora* с *S. typhimurium* приводило к трехкратному увеличению численности сальмонеллы тканях растений в сравнении с моноинокуляцией тканей только сальмонеллой.

Исходя из полученных нами результатов, а также на основе анализа имевшейся в нашем распоряжении научной литературы можно расширить определение эндофитных бактерий, как бактерий, способных жить внутри растений, не нанося им вреда, проникая во внутренние растительные ткани без повреждений, вызванных воздействием других факторов, а также и без помощи других микроорганизмов.

Свойство «проникать без повреждений» предполагает способность бактерий внедряться в ткани без механических повреждений, например, через устьица, или, используя собственные ферментные системы, разрушающие покровные ткани органов растений, свойство «жить» – отсекает переход от способности размножаться вне растений к некультивируемой форме существования внутри растений и обусловленную этим бессимптомность (или не нанося вреда). Дополнительное определение «без помощи других микроорганизмов» не позволяет отнести к эндофитами бактерий, которые могут проникать в растительные ткани без повреждений, но совместно с другими видами или штаммами микроорганизмов.

В аспекте взаимоотношений эндофитов с другими микроорганизмами особый интерес у многих исследователей вызывает способность эндофитных

бактерий подавлять рост и/или размножение других микробов или микроскопических грибов, или проявлять антагонизм. Такое свойство оценивается *in vitro*, и, как правило подразумевает, что антагонизм проявляется также *in vivo*, чем можно объяснить способность препаратов на основе антагонистических бактерий служить в качестве средств защиты растений от фитопатогенной микрофлоры.

Продолжение исследований взаимоотношений эндофитных бактерий не только с неэндофитными, но и различных эндофитных штаммов друг с другом позволило нам выявить, что в случае взаимодействия двух, а возможно и нескольких эндофитных штаммов бактерий между собой, антагонизм одного штамма по отношению к другому, проявляющийся *in vitro* не всегда аналогичным образом проявляется *in vivo*. Например, эндофит *B. subtilis* 49PH подавлял *in vitro* рост колоний другого эндофита *Pantoea sp.* M23. Однако при последовательной совместной инокуляции стерильных растений картофеля вначале антагонистом *B. subtilis* 49PH, а затем *Pantoea sp.* M23 в растительных тканях уменьшалось количество клеток самого антагониста. В случае же прединокуляции растений эндофитом *B. subtilis* 26Д и последующей инокуляции клетками *Pantoea sp.* M23, рост колоний которого не подавлялся указанной бациллой, плотность клеток *Pantoea sp.* M23 в тканях картофеля уменьшалась.

Очевидно, что количественное соотношение клеток различных эндофитных бактерий внутри растений может определяться не только проявлением или не проявлением *in vitro* антагонизма между ними, но и видом растительной ткани, органом растения, его возрастом или возрастом цельного растения и другими факторами. Поэтому характер взаимоотношений эндофитов между собой *in vitro* не всегда может совпадать с таковым внутри растительных тканей.

Известно, что механические повреждения растительных тканей, как правило, сопровождаются затем синтезом защитного барьера в виде полимера лигнина, в состав которого входят оксикоричные кислоты, а основной из них является феруловая кислота. Не исключено также, что деструкция растительных тканей сопровождается выделением в окружающую среду также и мономеров лигнина в

виде указанных фенольных кислот. Фенольные кислоты, в частности феруловая, способны подавлять рост и размножение различных микроорганизмов. Эти данные некоторыми исследователями были получены при действии на бактерии довольно высоких концентраций кислот (Pacheco-Ordaz et al., 2018). В нашей работе изучено действие оксикоричных кислот в концентрациях в 1000 раз меньших, чем в цитируемых выше работах, совпадающих с концентрацией этих соединений, выделяющихся в окружающую среду самими растениями (1-10 мкг/л). Установлено, что при росте колоний эндофитных бактерий на средах с концентрацией агара 1,5% и содержащих феруловую и кумаровую кислоты в указанных концентрациях происходит подавление, а при уменьшении концентрации агара до 0,7% эти соединения стимулируют рост колоний. Впервые у штамма *B. subtilis* 26Д выявлена способность метаболизировать феруловую кислоту, что объясняет стимуляцию размножения клеток этой бактерии в жидких средах в присутствии этого вещества.

Полученные результаты позволяют нам выдвинуть предположение о существовании своеобразного механизма движения клеток эндофитов вслед за растущими и развивающимися органами растений. Постепенная лигнификация растительных клеточных стенок с участием ФК создает определенную концентрацию этого соединения, что может активизировать движение бактерий по развивающимся сосудам не только благодаря току межклеточной жидкости при транспирации, но и присутствию соединений, например, ФК, усиливающих распространение эндофитов. Старение растений, сопровождающееся, как правило, уменьшением содержания влаги, способно автоматически затормаживать распространение эндофитов. Можно полагать, что таким образом формируется система автоконтроля распространения эндофитов в растительных тканях.

Выделение ФК корнями растений (Wu et al., 2000) при достаточном количестве влаги в ризосфере может способствовать увеличению ареала распространения представителей *Bacillus*, и являться одним из первых механизмов, способствующих проникновению эндофитов в ткани растений.

Способность клеток эндофитов утилизировать ФК, уменьшая ее концентрацию в растительных тканях может, с одной стороны, служить своеобразным сигналом для растения-хозяина фактором «омоложения» и стимуляции роста, что совпадает с рост-стимулирующей активностью, например, штамма бактерии *B. subtilis* 26Д. С другой стороны, высокая концентрация клеток эндофита в растительных тканях может привести к падению уровня ФК и недостаточной лигнификации тканей в виде барьера на пути патогенов. Однако наличие антагонистической активности у эндофитов способно заместить слабеющий защитный механизм лигнификации на защиту эндофитами с помощью их антибиотических компонентов. Таким образом, растение вместе с эндофитом представляет собой тонко и самостоятельно настроенную систему, контролирующую физиологическое развитие хозяина в благоприятной для него среде, а также строящую многоуровневую защиту при атаке фитопатогенов.

С одной стороны, в настоящее время эндофитные микроорганизмы рассматривают с позиции восполнения у растений недостающих свойств. С другой стороны, современные молекулярно-генетические технологии позволяют и микроорганизмам придать желаемые хозяйственно-полезные свойства. Изученный нами эндофит *B. subtilis* 26Д характеризуется рядом полезных свойств – антагонизмом к фитопатогенам, рост-стимулирующей активностью, способностью мобилизовать фосфаты, продуцировать РНКазы и проявлять в определенной степени антивирусный эффект по отношению к растениям. Сказанное выше в совокупности с приданием растениям необходимых свойств без модификации их генома позволило выдвинуть предположение о возможности получения нового эндофитного штамма на основе *B. subtilis* 26Д, который бы защищал растения и от насекомых. Для этого необходимо введение в геном бациллы гена инсектотоксина, в качестве которого мы выбрали ген *cryIIa* (Zeigler, 1999). Ранее, некоторыми исследователями были получены трансформанты бацилл с генами *cry* на основе бактерий *B. cereus* (Mahaffee, Moar, Klopper, 1994) и *B. megaterium* (Bora et al., 1994). *Cry*-генами были трансформированы также бактерии *Azospirillum spp.*, *R. leguminosarum*, *P. cepacia* и *P. fluorescens*

(Obukowicz et al., 1986; Skot et al., 1990; Stock et al., 1990; Udayasurian et al., 1995). Основываясь на этих данных, мы получили новый штамм *B. subtilis* 26DCryChS, который содержит ген инсектотоксина без селективного гена устойчивости к антибиотику, что, на наш взгляд, делает этот штамм потенциально безопасным для применения на практике. Новый штамм обладает такими же свойствами, как и дикий, при этом дополнительно характеризуется инсектицидностью.

Таким образом, эндофитные бактерии можно рассматривать в качестве своеобразных векторов переноса в растения недостающих у макроорганизма свойств, что позволяет утверждать о дальнейшей перспективности изучения таких микроорганизмов с целью практического использования их как основы новых экологически безопасных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Из поверхностно стерилизованных тканей различных органов разных видов растений выделено 110 штаммов бактерий, идентифицирован род у 73 штаммов, установлен вид у 17 микроорганизмов. Показано, что частота выявления эндофитов в тканях растений, выделяющих экссудат, закупоривающий раны при повреждениях, меньше, чем у растительных культур других видов.

2. Впервые показано, что совместная инокуляции растений эндофитной бактерией *B. subtilis* 26Д и способствует проникновению в растительные ткани клеток неэндофитной бактерии *Lactobacillus plantarum* 3L. На основе полученных данных предложено уточнение эндофитных бактерий, как микроорганизмов, способных самостоятельно проникать в растительные ткани.

3. Впервые установлено, что феруловая, кумаровая и сиринговая кислоты влияют на скорость распространения колоний эндофитных бактерий *B. subtilis* на поверхности агаризованных питательных сред, увеличивая ее на полутвердых средах (0,7% агара).

4. У эндофитной бактерии *B. subtilis* 26Д – основы биофунгицида Фитоспорин-М, впервые выявлена способность к деструкции феруловой кислоты.

5. Показана способность эндофитных бактерий, продуцирующих РНКазы, защищать растения картофеля от вирусных инфекций. Выявлено наличие достоверной обратной корреляции между плотностью в тканях картофеля клеток эндофитных бактерий *B. subtilis* 26Д, новых штаммов *Bacillus sp.* TS2, STL7, а также *B. thuringiensis* ВКПМ6066 и степенью распространения вирусной инфекции, вызванной вирусами S и Y.

6. Создан рекомбинантный штамм бактерии *B. subtilis* 26ДCryChS, несущий ген инсектотоксина и обладающий комплексной биологической активностью по отношению к растениям. На примере бактерии *B. subtilis* 26Д показана возможность использования эндофитов в качестве векторов для придания растениям устойчивости к вредным насекомым.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воловик, А.С. Методика исследований по защите картофеля от болезней, вредителей, сорняков и иммунитету / А.С. Воловик, Л.Н. Трофимец, А.Б. Долягин, В.М. Глез // Россельхозакадемия. – 1995. – С.106.
2. Егоршина, А.А. Биологическая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных в качестве основываемых препаратов для растениеводства. Дисс. канд. биол. наук / ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН – 2012. – С.95.
3. Замалиева, Ф.Ф. Оздоровленный семенной картофель/ Ф.Ф. Замалиева, З.З. Салихова, З.А. Сташевски, Г.Ф. Сафиуллина, Р.Р. Назмиева // Рекомендации по выращиванию (измененные и дополненные). - Фолиант. 2007.
4. Курамшина, З.М. Влияние эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* на окислительный стресс растений, вызванный тяжелыми металлами / З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Роль активных форм кислорода в жизни растений. – 2017. – С. 147-150.
5. Маргулис, А.Б. Гомосеринлактон как регулятор индуцибельных и конститутивных ферментов микроорганизмов / А.Б. Маргулис, О.В. Сиадат, Е.В. Никитина, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Вестник Казанского технологического университета. –2012. –Т.15. – № 17. – С. 173-176.
6. Пусенкова, Л.И. Эффективность инокуляции семян яровой пшеницы эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д / Л.И. Пусенкова, С.Р. Гарипова, О.В.Ласточкина, Р.А. Юлдашев // Проблемы агрохимии и экологии. – 2020. – №. 3. – С. 56-64.
7. Трифонова, Е.А. Рибонуклеазная активность как потенциальный новый маркер устойчивости к фитопатогенам у картофеля / Е.А. Трифонова, С. М. Ибрагимова, О.А. Волкова, В.К. Шумный, А.В. Кочетов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 22. – №. 8. – С. 987-991.

8. Abbey, L. Biopesticides and biofertilizers: types, production, benefits, and utilization / L. Abbey, J. Abbey, A. Leke-Aladekoba, E.M. A. Iheshiulo, M. Ijenyo // *Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels.* – 2019. – P. 479-500.
9. Abdul Malik, N. A. Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity / N. A. Abdul Malik, I. S. Kumar, K. Nadarajah // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – V. 21. – №. 3. – P. 963.
10. Abdelrazek, S. Carrot endophytes: Diversity, ecology and function. Doctoral dissertation. – Purdue University Graduate School. – 2019.
11. Adelskov J. Erratum to: A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies *stecoris* strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor / J. Adelskov, B.K.C. Patel // *Biotech.* – 2017. – V. 6. – №. 1. – P. 96.
12. Afzal, I. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants / I. Afzal, Z.K. Shinwari, S. Sikandar, S. Shahzad // *Microbiological Research.* – 2019. – V. 221. – P. 36-49.
13. Akira Kiso, Daiki Yuki. Method of controlling plant disease damage by using *Bacillus* and controlling agent. Patent Patent no. JP 2006176533A. Published 2006.07.06.
14. Aman, R. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants / R. Aman, Z. Ali, H. Butt, A. Mahas, F. Aljedaani, M.Z. Khan, M. Mahfouz // *Genome Biology.* – 2018. – V. 19. – №. 1. – P. 1-9.
15. Anaya, P. Oligomerization is a key step for *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa insecticidal activity but not for toxicity against red blood cells / P. Anaya, J. Onofre, M. C. Torres-Quintero, J. Sanchez, S.S. Gill, A. Bravo, M. Soberon // *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* – 2020. – V. 119. – P. 103-317.
16. Baymiev, A. K. Genetic diversity and phylogeny of root nodule bacteria entering into symbiosis with bitter peavine *Lathyrus vernus* (L.) Bernh / A. K. Baymiev, K. G. Ptitsyn, D. K., Blagova, A. A. Muldashev, A. K. Baymiev // *Microbiology.* – 2011. – V. 80. – №. 1. – P. 96-100.

17. Berg, G. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi / G. Berg, A. Krechel, M. Ditz, R.A. Sikora, A. Ulrich, J. Hallmann // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2005. – V. 51. – №. 2. – P. 215-229.
18. Biswas, S. Study on the activity and diversity of bacteria in a new gangetic alluvial soil (Eutrocept) under rice-wheat-jute cropping system / S. Biswas, D.K. Kundu, S.P. Mazumdar, A.R. Saha, B. Majumdar, A.K. Ghorai, A.K. Saxena // *Journal of Environmental Biology*. – 2018. – V. 39. – №. 3. – P. 379-386.
19. Blake, C. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis* / C. Blake, M.N. Christensen, A.T. Kovacs // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2021. – V. 34. – №. 1. – P. 15-25.
20. Borges, A. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria / A. Borges, C. Ferreira, M.J. Saavedra, M. Simoes // *Microbial Drug Resistance*. – 2013. – V. 19. – №. 4. – P. 256-265.
21. Bosamia, T.C. Genomic insights of plant endophyte interaction: prospective and impact on plant fitness / T.C. Bosamia, K.M. Barbadikar, A. Modi // *Microbial Endophytes*. – 2020. – P.227-249.
22. Bowman, S. M. The structure and synthesis of the fungal cell wall / S.M. Bowman, S.J. Free // *Bioessays*. – 2006. – V. 28. – №. 8. – P. 799-808.
23. Brito, P.H. Genetic competence drives genome diversity in *Bacillus subtilis* / P.H. Brito, B. Chevreux, C.R. Serra, G. Schyns, A.O. Henriques // *Genome biology and evolution*. – 2018. – V. 10. – №. 1. – P. 108-124.
24. Bulgarelli, D. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants / D. Bulgarelli, K. Schlaeppi, S. Spaepen, E.V. Van Themaat, P. Schulze-Lefert // *Annual Review of Plant Biology*. – V.64 – 2013. – P.807-838.
25. Cavin, J. F. Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis* / J.F. Cavin, V. Dartois, C. Divies // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – V. 64. – №. 4. – P. 1466-1471.

26. Chen, C. Complete genome sequence of *Bacillus* sp. strain WR11, an endophyte isolated from wheat root providing genomic insights into its plant growth-promoting effects / C. Chen, Z. Yue, C. Chu, K. Ma, L. Li, Z. Sun // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2020. – V. 33. – №. 7. – P. 876-879.
27. Comby, M. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different in vitro tests / M. Comby, M. Gacoin, M. Robineau, F. Rabenoelina, S. Ptas, J. Dupont, F. Baillieul // *Microbiological Research*. – 2017. – V. 202. – P. 11-20.
28. Compant, S. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN / S. Compant, B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clement, E.A. Barka // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – №. 4. – P. 1685-1693.
29. Compant, S. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization / S. Compant, C. Clement, A. Sessitsch // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2010. – V. 42. – №. 5. – P. 669-678.
30. Compant, S. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization / S. Compant, B. Mitter, J. G. Colli-Mull, H. Gangl, A. Sessitsch // *Microbial Ecology*. – 2011. – V. 62. – №. 1. – P. 188-197.
31. Cohen, I. Meta-analysis of drought and heat stress combination impact on crop yield and yield components / I. Cohen, S.I. Zandalinas, C. Huck, F.B. Fritschi, R. Mittler // *Physiologia Plantarum*. – 2021. – V. 171. – №. 1. – P. 66-76.
32. Coutte, F. Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges / F. Coutte, D. Lecouturier, K. Dimitrov, J. S. Guez, F. Delvigne, P. Dhulster, P. Jacques // *Biotechnology Journal*. – 2017. – V. 12. – №. 7. – P. 160-170.
33. Crombie, A. T. Poplar phyllosphere harbors disparate isoprene-degrading bacteria / A.T. Crombie, N.L. Larke-Mejia, H. Emery, R. Dawson, J. Pratscher, G.P.

Murphy, J.C. Murrell // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – V. 115. – №. 51. – P. 13081-13086.

34. Damalas, C.A. Current status and recent developments in biopesticide use / C. . Damalas, S. D. Koutroubas // Agriculture. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P.13-19.

35. Dang L. Genome-wide identification and domain organization of lectin domains in cucumber / L. Dang, E.J.M. Van Damme // Plant Physiology and Biochemistry. – 2016. – V. 108. – P. 165-176.

36. Dargiri, A.S. The effect of bacterial endophyte (*Exigubacterium aurantiacum*) isolated from *Salsola imbricata* on growth characteristics of tomato seedlings under salinity stress / A.S. Dargiri, D. Samsampour, M. Askari Seyahooei, A. Bagheri // Journal of Horticultural Science. – 2021. – V. 35. – №. 1. – P. 153-167.

37. Daulagala, P. Chitinolytic Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents for Phytopathogenic Fungi and Nematode Pests: A Review / P. Daulagala //Asian Journal of Research in Botany. – 2021. – P. 14-24.

38. De Oliveira, D.M. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis / D.M. De Oliveira, A. Finger-Teixeira, T.R. Mota, V.H. Salvador, F.C. Moreira-Vilar¹, H.B.C. Molinari, R.A.C. Mitchell, R. Marchiosi, O. Ferrarese-Filho, W.D. Dos Santos // Plant Biotechnology Journal. – 2015. – V.13. – P. 1224–1232.

39. Degrassi, G. Purification and characterization of ferulate and p-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus* / G. Degrassi, P.P.de Laureto, C.V. Bruschi // Applied and Environmental Microbiology. –1995. – V. 61. – № 1. – P.326-332.

40. Dekak, A. Endophytic passenger bacteria associated with *Genista cinerea* nodules growing in North African drylands / A. Dekak, T. Menasria, Y. Benhizia, H. Chenchouni // Rhizosphere. – 2020. – V. 14. – P. 100205.

41. Dinca, N. The influence of rhizobium inoculation and nitrogen/molybdenum fertilization on the growth characteristics of red clover / N. Dinca, D. Dunea // AgroLife Scientific Journal. – 2017. – V. 6. – №. 2. – P. 83-88.

42. Dominguez-Arrizabalaga, M. A strain of *Bacillus thuringiensis* containing a novel cry7Aa2 gene that is toxic to *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera:

Chrysomelidae) / M. Dominguez-Arrizabalaga, M. Villanueva, A.B. Fernandez, P. Caballero // *Insects*. – 2019. – V. 10. – №. 9. – P. 259.

43. Droby, S. The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology / S. Droby, M. Wisniewski // *Postharvest Biology and Technology*. – 2018. – V. 140. – P. 107-112.

44. Dumitru, M. Preliminary characterization in vitro of *Bacillus licheniformis* strain for used as dietary probiotic / M. Dumitru, I. Sorescu, M. Habeanu, C. Tabuc, S. Jurcoane // *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. – 2019. – T. 23. – P. 164-172.

45. Egamberdieva, D. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum L.*) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress / D. Egamberdieva, S. J. Wirth, V. V. Shurigin, A. Hashem, E. F. Abd Allah // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 1887-1898.

46. Elsayed, T. R. Biocontrol of bacterial wilt disease through complex interaction between tomato plant, antagonists, the indigenous rhizosphere microbiota, and *Ralstonia solanacearum* / T.R. Elsayed, S. Jacquiod, E. H. Nour, S.J. Sorensen, K. Smalla // *Role of Endophytes in Plant Health and Defense Against Pathogens*. – 2020. – P.191-202.

47. Fan, H. Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization / H. Fan, Z. Zhang, Y. Li, X. Zhang, Y. Duan, Q. Wang // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 1973-1988.

48. Fgaier, H. Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup / H. Fgaier, H.J. Eberl // *Journal of Theoretical Biology*. – 2011. – V. 273. – №. 1. – P. 103-114.

49. Flores, A. Bridging genomics and field research: draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* CR71, an endophytic bacterium that promotes plant growth and fruit yield in *Cucumis sativus L* / A. Flores, J. T. Diaz-Zamora, M. del Carmen Orozco-Mosqueda, A. Chavez, S. de Los Santos-Villalobos, E. Valencia-Cantero, G. Santoyo // *Biotechnology*. – 2020. – V. 10. – №. 5. – P. 1-7.

50. Frank, A. C. Transmission of bacterial endophytes / A. C. Frank, J. P. Saldierna Guzman, Shay J. E. // *Microorganisms*. – 2017. – V. 5. – №. 4. – P. 70.

51. Gamalero, E. The Use of Plant growth-promoting bacteria to prevent nematode damage to plants / E. Gamalero, B.R. Glick // *Biology*. – 2020. – V. 9. – №. 11. – P. 381.
52. Gaiero, J. R. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion / J.R. Gaiero, C.A. McCall, K.A. Thompson, N.J. Day, A.S. Best, K.E. Dunfield // *American Journal of Botany*. – 2013. – V. 100. – №. 9. – P. 1738-1750.
53. Gangwar, M. Plant growth-promoting microbes (PGPM) as potential microbial bio-agents for eco-friendly agriculture / M. Gangwar, P. Saini, P. Nikhanj, S. Kaur // *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects*. –2017. – P. 37-55.
54. Gao, Z. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* / Z. Gao, B. Zhang, H. Llu, J. Han, Y. Zhang // *Biological Control*. –2017. – V. 105. – P. 27–39.
55. Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications / B. R. Glick // *Scientifica*. – 2012. – V. 2012.
56. Glick, B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world / B.R. Glick // *Microbiological Research*. – 2014. – V. 169. – №. 1. – P. 30-39.
57. Gonzalez, V. Phylogenomic *Rhizobium* species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters / V. Gonzalez, R.I. Santamaria, P. Bustos, O.M. Perez-Carrascal, P. Vinuesa, S. Juarez. // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 910-925.
58. Gorski, L. The use of flagella and motility for plant colonization and fitness by different strains of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* / L. Gorski, J.M. Duhe, D. Flaherty // *PloS one*. – 2009. – V. 4. – №. 4. – P. 42-51.
59. Goswami, M. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity / M. Goswami, S. Deka // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – V. 178. – P. 285-296.

60. Gray, S. M. Anthropogenic influences on emergence of vector-borne plant viruses: The persistent problem of Potato virus Y / S.M. Gray, A.G. Power // *Current Opinion in Virology*. – 2018. – V. 33. – P. 177-183.
61. Gurujeyalakshmi, G. Dissimilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis* / G. Gurujeyalakshmi, A. Mahadevan // *Current Microbiology*. – 1987. – V. 16. – №. 2. – P. 69-73.
62. Hallmann, J. Bacterial endophytes in agricultural crops / J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee, J.W. Kloepper // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1997. – V. 43. – №. 10. – P. 895-914.
63. Hamouche, L. The effect of chemotaxis on the swarming ability of *Bacillus subtilis*: critical effect of glutamic acid and lysine / L. Hamouche, S. Laalami, G. Lakkis, A. Kobaissi, A. Chokr, H. Putzer, K. Hamze // *International Journal of Scientific & Technology Research*. – 2015. – Vol. 4. – №10. – P. 14-20.
64. Hardoim, P.R. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth / P.R. Hardoim, L.S. van Overbeek, J.D. van Elsas // *Trends in Microbiology*. – 2008. – V. 16. – №. 10. – P. 463-471.
65. Hardoim, P. R. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes / P.R. Hardoim, L.S. Van Overbeek, G. Berg, A.M. Pirttila, S. Compant, A. Campisano, A. Sessitsch // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2015. – V. 79. – №. 3. – P. 293-320.
66. Harshey, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal / R. M. Harshey // *Annual Reviews in Microbiology*. – 2003. – V. 57. – №. 1. – P. 249-273.
67. Hashem, A. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress / A. Hashem, B. Tabassum, E.F. Abd Allah // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2019. – V. 26. – №. 6. – P. 1291-1297.
68. He, W. Endophyte-assisted phytoremediation: mechanisms and current application strategies for soil mixed pollutants / W. He, M. Megharaj, C.Y. Wu, S.R.

Subashchandrabose, C.C. Dai // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2020. – V. 40. – №. 1. – P. 31-45.

69. Heckel, D.G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective / D.G. Heckel // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2020. – V. 104. – №. 2. – P. 216-273.

70. Helepciuc, F. E. Root colonization capacity by plant beneficial bacteria / F.E. Helepciuc, E.M. Mitoi, A. Brezeanu, C.P. Cornea // *AgroLife Scientific Journal*. – 2019. – V. 8. – №. 1. – P. 48-53.

71. Henrichsen, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification / J. Henrichsen // *Bacteriological Reviews*. – 1972. – V. 36. – №. 4. – P. 478.

72. Herpell, J.B. The Potato yam phyllosphere ectosymbiont *Paraburkholderia* sp. Msb3 is a potent growth promotor in tomato / J.B. Herpell, F. Schindler, M. Bejtovic, L. Fragner, B. Diallo, A. Bellaire, W. Weckwerth // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 581.

73. Hider, R. C. Chemistry and biology of siderophores / R.C. Hider, X. Kong // *Natural Product Reports*. – 2010. – V. 27. – №. 5. – P. 637-657.

74. Hole, R. C. A rapid plate screening technique for extracellular ribonuclease producing strains / R.C. Hole, R.S. Singhal, J.S. Melo, S.F. D'Souza // *BARC Newsletter*. – 2004. – V. 249. – P. 91-97.

75. Holliday, P.A *Dictionary of Plant Pathology*. Cambridge University Press, Cambridge. – 1989. – №. 2.

76. Hong, C.E. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art / C.E. Hong, J.M. Park // *Plant Biotechnology Reports*. – 2016. – T. 10. – №. 6. – P. 353-357.

77. Hussain, I. Microbe and plant assisted-remediation of organic xenobiotics and its enhancement by genetically modified organisms and recombinant technology: a review / I. Hussain, G. Aleti, R. Naidu, M. Puschenreiter, Q. Mahmood, M.M. Rahman, T. G. Reichenauer // *Science of the Total Environment*. – 2018. – V. 628. – P. 1582-1599.

78. Hyde, K. D. The fungal endophyte dilemma / K.D. Hyde, K. Soytong // *Fungal Diversity*. – 2008. – V. 33. – №. 163. – P. 163-173.
79. Ibanez, F. Bacterial endophytes of plants: diversity, invasion mechanisms and effects on the host / F. Ibanez, M.L. Tonelli, V. Munoz, M.S. Figueredo, A. Fabra // *Endophytes: Biology and Biotechnology*. – 2017. – P. 25-40.
80. Idris, A. L. Ecologically controlling insect and mite pests of tea plants with microbial pesticides: a review / A.L. Idris, X. Fan, M.H. Muhammad, Y. Guo, X. Guan, T. Huang, // *Archives of Microbiology*. – 2020. – P. 1-10.
81. Ilinskaya, O. The native monomer of *Bacillus pumilus* ribonuclease does not exist extracellularly / O. Ilinskaya, V. Ulyanova, I. Lisevich, E. Dudkina, N. Zakharchenko, A. Kusova, Y. Zuev // *BioMed Research International*. – 2018. – V. 2018. – P.1-7.
82. Jadhav, H.P. Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview / H.P. Jadhav, S.S. Shaikh, R.Z. Sayyed // *Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation*. – 2017. – P. 183-203.
83. Janisiewicz, W. J. Culturable bacteria from plum fruit surfaces and their potential for controlling brown rot after harvest / W.J. Janisiewicz, W.M. Jurick, I. Vico, K.A. Peter, J.S. Buyer // *Postharvest Biology and Technology*. – 2013. – V. 76. – P. 145-151.
84. Jia, H. T. Characterization of cucumber rhizosphere bacterial community with high-throughput amplicon sequencing / H.T. Jia, J.Y. Liu, Y.I. Shi, D.L. Li, F.Z. Wu, X.G. Zhou // *Allelopathy Journal*. – 2019. – V. 47. – №. 1. – P. 103-112.
85. Jouzani, G. S. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings / G.S. Jouzani, E. Valijanlian, R. Sharafi // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 101. – №. 7. – P. 2691-2711.
86. Kang, S. M. Complete genome sequence of *Pseudomonas psychrotolerans* CS51, a plant growth-promoting bacterium, under heavy metal stress conditions / S. Kang, M.S. Asaf, A.L. Khan, A. Khan, B.G. Mun, M.A. Khan, I.J. Lee // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8. – №. 3. – P. 382.

87. Kannoja, P. PGPR bioelicitors: induced systemic resistance (ISR) and proteomic perspective on biocontrol / P. Kannoja, K.K. Choudhary, A.K. Srivastava, A. K. Singh // PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. –2019. – P. 67-84.
88. Khalaf, E. M. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew / E.M. Khalaf, M.N. Raizada // Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 42-60.
89. Khan, N. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol / N. Khan, P. Martinez-Hidalgo, T.A. Ice, M. Maymon, E.A. Humm, N. Nejat, A.M. Hirsch // Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 2363.
90. Khare, E. Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and Prospects / E. Khare, J. Mishra, N.K. Arora // Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 2732.
91. Khedher, S.B. Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae / S.B. Khedher, H. Boukedi, M. Dammak, O. Kilani-Feki, T. Sellami-Boudawara, L. Abdelkefi-Mesrati, S. Tounsi // Journal of Invertebrate Pathology. – 2017. – V. 144. – P. 11-17.
92. Kim, J. S. Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus sp.* JS, which induces systemic resistance in tobacco plants / J.S. Kim, J. Lee, C.H. Lee, S.Y. Woo, H. Kang, S.G. Seo, S. H. Kim // The plant pathology journal. – 2015. – V. 31. – №. 2. – P. 195.
93. Kouassi, K. C. Assessment of the risk of microbial contamination of an urban crop in the city of Daloa (Cote d'Ivoire): case of lettuce (*Lactuca sativa* L.) / K.C. Kouassi, K.A. Kouassi, K.M. Yao, A.G. Kouassi, N.R. Koffi // Journal of Food Research. – 2019. – V. 8. – №. 3. – P. 122.
94. Kour, D. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability / D. Kour, K.L. Rana, A. N. Yadav, N. Yadav, M. Kumar, V. Kumar, A.K. Saxena // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2020. – V. 23. – P. 101-487.

95. Kuebutornye, F.K.A. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture / F.K.A. Kuebutornye, E.D. Abarike, Y. Lu // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2019. – V. 87. – P. 820-828.
96. Kumar, V. Robbins basic pathology e-book / V. Kumar, A.K. Abbas, J.C. Aster // Elsevier Health Sciences. – 2017.
97. Kumar, M. Biodiversity of methylotrophic microbial communities and their potential role in mitigation of abiotic stresses in plants / M. Kumar, D. Kour, A.N. Yadav, R. Saxena, P.K. Rai, A. Jyoti, R.S. Tomar // *Biologia*. – 2019. – V. 74. – №. 3. – P. 287-308.
98. Latha, P. Endophytic bacteria: prospects and applications for the plant disease management / P. Latha, M. Karthikeyan, E. Rajeswari // *Plant Health Under Biotic Stress*. – 2019. – P. 1-50.
99. Lehnert, N. Reversing nitrogen fixation / N.H. Lehnert, T. Dong, J.B. Harland, A.P. Hunt, C.J. White // *Nature Reviews Chemistry*. – 2018. – V. 2. – №. 10. – P. 278-289.
100. Li, Y. Excessive rainfall leads to maize yield loss of a comparable magnitude to extreme drought in the United States / Y. Li, K. Guan, G.D. Schnitkey, E. DeLucia, B. Peng // *Global Change Biology*. – 2019a. – V. 25. – №. 7. – P. 2325-2337.
101. Li, Y. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation / Y. Li, M.C. Heloir, X. Zhang, M. Geissler, S. Trouvelot, L. Jacquens, M. Adrian // *Molecular Plant Pathology*. – 2019b. – V. 20. – №. 8. – P. 1037-1050.
102. Link, H.F. Observationes in ordines plantarum naturales / H.F. Link // *Dissertatio*. – 1809. – V. 1. – P. 1-33.
103. Liu, H. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria / H. Liu, L. C. Carvalhais, M. Crawford, E. Singh, P. G. Dennis, C. M. Pieterse, P. M. Schenk // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 25-52.
104. Liu, Y.L. Cry64Ba and Cry64Ca, two ETX/MTX2-type *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins active against hemipteran pests / Y.L. Liu, Y.L.

Wang, C.L. Shu, K.J. Lin, F.P. Song, A. Bravo, M. Sobero'n, J. Zhang // Applied and Environmental Microbiology. – 2018. – V. 84. – №.3.

105. Lopez, J. L. Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds / J.L. Lopez, F. Alvarez, A. Principe, M.E. Salas, M.J. Lozano, W. O. Draghi, A. Lagares // Journal of Biotechnology. – 2018. – V. 267. – P. 55-62.

106. Lu, Sh.M. Microbial fertilizer resistant to diseases and insects and preparation method. CN Patent no. 105036986. Published 2015.11.11.

107. Luo, J. Role of vertical transmission of shoot endophytes in root-associated microbiome assembly and heavy metal hyperaccumulation in *Sedum alfredii* / J. Luo, Q. Tao, R. Jupa, Y. Liu, K. Wu, Y. Song, T. Li // Environmental Science & Technology. – 2019. – V. 53. – №. 12. – P. 6954-6963.

108. Ma, Y. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation / Y. Ma, M. Rajkumar, C. Zhang, H. Freitas // Journal of Environmental Management. – 2016. – V. 174. – P. 14-25.

109. Maggini, V. Promoting model systems of microbiota–medicinal plant interactions / V. Maggini, A. Mengoni, P. Bogani, F. Firenzuoli, R. Fani // Trends in Plant Science. – 2020. – V. 25. – №. 3. – P. 223-225.

110. Makarova, S. S. Virus resistance in potato: current state and prospects / S.S. Makarova, V.V. Makarov, M.E. Taliansky, N.O. Kalinina // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2017. – V. 7. – №. 8. – P. 845-857.

111. Maksimov, I.V. Mechanisms of plant tolerance to rna viruses induced by plant-growth-promoting microorganisms / I.V. Maksimov, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, S.V. Veselova, V.Y. Alekseev, M.Y. Shein, A.M. Avalbaev, P.D. Dhaware, G.T. Mehetre, B.P. Singh, R.M. Khairullin // Plants. – 2019. – V. 8. – №. 12. – P.575-582.

112. Maksimov, I. V. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene Btcry1Ia encoding Cry1Ia toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond / I.V. Maksimov, D.K. Blagova, S. V. Veselova, A.V. Sorokan, G.F.

Burkhanova, E.A. Cherepanova, E.R. Sarvarova, R.M. Khayrullin // *Biological Control*. – 2020. – V. 144. – P. 104242.

113. Massoni, J. Consistent host and organ occupancy of phyllosphere bacteria in a community of wild herbaceous plant species / J. Massoni, M. Bortfeld-Miller, L. Jardillier, G. Salazar, S. Sunagawa J. A. Vorholt // *The ISME Journal*. – 2020. – V. 14. – №. 1. – P. 245-258.

114. Matos, A. D. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees / A.D. Matos, I.C. Gomes, S. Nietsche, A.A. Xavier, W.S. Gomes, J.A. Dos Santos Neto, M.C. Pereira // *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. – 2017. – V. 89. – №. 4. – P. 2945-2954.

115. Matsuda, R. Production of indoleacetic acid by strains of the epiphytic bacteria *Neptunomonas* spp. isolated from the red alga *Pyropia yezoensis* and the seagrass *Zostera marina* / R. Matsuda, M.L. Handayani, H. Sasaki, K. Takechi, H. Takano, S. Takio // *Archives of Microbiology*. – 2018. – V. 200. – №. 2. – p. 255-265.

116. Mello, I.S. Endophytic bacteria mitigate mercury toxicity to host plants / I. Mello, S.W. Pietro-Souza, B.M. Barros, G.F. da Silva, M.L. Campos, M.A. Soares // *Symbiosis*. – 2019. – V. 79. – №. 3. – P. 251-262.

117. Merkl, R. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters / R. Merkl, I. Hradkova, V. Filip, J. Smidrkal // *Czech Journal of Food Sciences*. – 2010. – V. 28. – №. 4. – P. 275-279.

118. Milner, J. Antibiosis and beyond: genetic diversity, microbial communities, and biological control // *Ecological Interactions and Biological Control*. – 2019. – P.107-127.

119. Mingmongkolchai, S. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production / S. Mingmongkolchai, W. Panbangred // *Journal of Applied Microbiology*. – 2018. – V. 124. – №. 6. – P. 1334-1346.

120. Mitter, B. A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds / B. Mitter, N. Pfaffenbichler, R. Flavell, S. Compant, L. Antonielli, A. Petric, A. Sessitsch // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 11.

121. Morales-Cedeno, L.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: fundamentals, methods of application and future perspectives / L.R. Morales-Cedeno, M.C. Orozco-Mosqueda, P.D. Loeza-Lara, F.I. Parra-Cota, S. de los Santos-Villalobos, G. Santoyo // *Microbiological Research*. – 2020. – V.242. – P.126-612.

122. Moreno, A. B. When viruses play team sports: Mixed infections in plants / A. B. Moreno, J.J. Lopez-Moya // *Phytopathology*. – 2020. – V. 110. – №. 1. – P. 29-48.

123. Moslehi, S. Potential of some endophytic bacteria in biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* / S. Moslehi, S. Pourmehr, A. Shirzad, R. Khakvar // *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. – 2021. – V. 31. – №. 1. – P. 1-11.

124. Mota, M.S. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation / M.S. Mota, C.B. Gomes, I.T. Souza Junior, A.B. Moura, // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2017. – V. 48. – №. 1. – P. 62-70.

125. Moyes, A.B. Evidence for foliar endophytic nitrogen fixation in a widely distributed subalpine conifer / A.B. Moyes, L.M. Kueppers, J. Pett-Ridge, D.L. Carper, N. Vandehey, J. O'Neil, A. C. Frank // *New Phytologist*. – 2016. – V. 210. – №. 2. – P. 657-668.

126. Muthukumar, A. Role of bacterial endophytes in plant disease control / A. Muthukumar, R. Udhayakumar, R. Naveenkumar // *Endophytes: Crop Productivity and Protection*. – 2017. – P. 133-161.

127. Nareddy, P.K. Purification, physico-chemical characterization and thermodynamics of chitoooligosaccharide binding to cucumber (*Cucumis sativus*) phloem lectin / P.K. Nareddy, K.B. Bobbili, M.J. Swamy // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – V. 95. – P. 910-919.

128. Nautiyal, C.S. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils / C.S. Nautiyal, S. Bhadauria, P. Kumar, H. Lal, R. Mondal, D. Verma // *FEMS Microbiology Letters*. – 2000. – V. 182. – №. 2. – P. 291-296.

129. Niem, J. M. Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic pseudomonas against grapevine trunk diseases / J. Niem, M. R. Billones-Baaijens, B. Stodart, S. Savocchia // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 477-496.
130. Oana-Alina, B. Cornea C.P. Bacterial endophytes improving plant growth / B. Oana-Alina // *AgroLife Scientific Journal* – 2020. –V. 9. – №. 2. – P. 56-70.
131. Olanrewaju, O.S. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria / O.S. Olanrewaju, B.R. Glick, O.O. Babalola // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 33. – №. 11. – P. 1-16.
132. Ongena, M. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol / M. Ongena, P. Jacques // *Trends in Microbiology*. – 2008. – V. 16. – №. 3. – P. 115-125.
133. Orozco-Mosqueda, M. Plant-microbial endophytes interactions: scrutinizing their beneficial mechanisms from genomic explorations / M. Orozco-Mosqueda, G. Santoyo // *Current Plant Biology*. – 2021. – P. 100-189.
134. Ou, T. A microbiome study reveals seasonal variation in endophytic bacteria among different mulberry cultivars / T. Ou, W. F. Xu, F. Wang, G. Strobel, Z. Y. Zhou, Z. H. Xiang, J. Xie // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2019. – V. 17. – P. 1091-1100.
135. Pacheco-Ordaz, R. Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria / R. Pacheco-Ordaz, A. Wall-Medrano, M.G. Goni, G. Ramos-Clamont-Montfort, J.F. Ayala-Zavala, G.A. Gonzalez-Aguilar // *Letters in Applied Microbiology*. – 2018. – V. 66. – №. 1. – P. 25-31.
136. Palma, L. *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides, are they as effective as they should be? / L. Palma // *Revista Argentina de Microbiologia*. – 2017. – V. 49. – №. 1. – P. 119.
137. Palmieri, F. Oxalic acid, a molecule at the crossroads of bacterial-fungal interactions / F. Palmieri, A. Estoppey, G.L. House, A. Lohberger, S. Bindschedler, P. S. Chain, P. Junier // *Advances in Applied Microbiology*. – 2019. – V. 106. – P. 49-77.

138. Panebianco, F. New insights into the antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from different food matrices / F. Panebianco, A. Caridi // *Grasas y Aceites*. – 2021. – V. 72. – №. 1. – P. 400.

139. Pangesti, N. Antagonism between two root-associated beneficial *Pseudomonas* strains does not affect plant growth promotion and induced resistance against a leaf-chewing herbivore / N. Pangesti, S. Vandenbrande, A. Pineda, M. Dicke, J. M. Raaijmakers, J. J. Van Loon // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2017. – V. 93. – №. 4. – P. 1-8.

140. Park, S.H. Adventitious root formation of *in vitro* peach shoots is regulated by auxin and ethylene / S.H. Park, M. Elhiti, H. Wang, A. Xu, D. Brown, A. Wang // *Scientia Horticulturae*. – 2017. – V. 226. – P. 250-260.

141. Parte, A.C. LPSN–List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 20 years on // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68. – №. 6. – P. 1825-1829.

142. Patzke, H. Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate-ferulic acid as a natural pesticide against *Botrytis cinerea* / H. Patzke, A. Schieber // *Food Research International*. – 2018. – V. 113. – P. 18-23.

143. Pohare, M.B. *Bacillus thuringiensis* as Potential Biocontrol Agent for Sustainable Agriculture / M.B. Pohare, S.G. Wagh, V. Udayasuriyan // *Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture*. – 2021. – P. 439-468.

144. Poole, P. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts / P. Poole, V. Ramachandran, J. Terpolilli // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – V. 16. – №. 5. – P. 291-303.

145. Preyanga, R. Groundnut (*Arachis hypogaea*) nodule *Rhizobium*, passenger endophytic bacterial cultivable diversity, and their impact on plant growth promotion / R. Preyanga, R. Anandham, R. Krishnamoorthy, M. Senthilkumar, N.O. Gopal, A. Vellaikumar, S. Meena // *Rhizosphere*. – 2021. – V. 17. – P. 100309.

146. Puri, A. Seedling growth promotion and nitrogen fixation by a bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R and its GFP derivative in corn in a long-

term trial / A. Puri, K.P. Padda, C.P. Chanway // *Symbiosis*. – 2016. – V. 69. – №. 2. – P. 123-129.

147. Reinhold-Hurek, B. Life in grasses: diazotrophic endophytes / B. Reinhold-Hurek, T. Hurek // *Trends in Microbiology*. – 1998. – V. 6. – №. 4. – P. 139-144.

148. Rahman, A. Biocontrol potential of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* and brown seaweed enhances the plant growth and activity of antioxidant defensive enzymes in glycine max against *Macrophomina phaseolina* / A. Rahman, S. Ehteshamul-Haque, F. K. Habiba, J. Ara // *International Journal of Biology and Biotechnology*. – 2021. – V. 18. – №. 1. – P. 103-111.

149. Rahnama, H. Induction of resistance to potato virus Y (PVY) using hairpin construct of coat protein / H. Rahnama, M. Ghanbari Jahromi, A. Mousavi, S. Sohiliwand, R. Pourrahim // *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. – 2020. – V. 9. – №. 1. – P. 1-10.

150. Rana, K.L. Endophytic microbiomes: biodiversity, ecological significance and biotechnological applications / K.L. Rana, D. Kour, A.N. Yadav // *Research Journal of Biotechnology*. – 2019. – V. 14. – P. 10.

151. Rashid, M. Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes / M. Rashid, Y.R. Chung // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – P. 1816-1827.

152. Rawool, P. P. Endophytic microbiomes and their plant growth-promoting attributes for plant health / P. P. Rawool, V. B. Berde, P. V. B. Chari, C. Parulekar-Berde // *Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture*. – 2020. – P. 145-158.

153. Rodrigues, A.A. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane / A.A. Rodrigues, M.V. Forzani, R.D.S. Soares, S.T. Sibov, J.D.G. Vieira // *Pesquisa Agropecuária Tropical*. – 2016. – V. 46. – №. 2. – P. 149-158.

154. Rodriguez, P. A. Systems biology of plant-microbiome interactions / P. A. Rodriguez, M. Rothballer, S. P. Chowdhury, T. Nussbaumer, C. Gutjahr, P. Falter-Braun // *Molecular plant*. – 2019. – V. 12. – №. 6. – P. 804-821.

155. Roossinck, M.J. Deep sequencing for discovery and evolutionary analysis of plant viruses / M.J. Roossinck // *Virus Research*. – 2017. – V. 239. – P. 82-86.
156. Rosenblueth, M. Bacterial endophytes and their interactions with hosts / M. Rosenblueth, E. Martínez-Romero // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2006. – V. 19. – №. 8. – P. 827-837.
157. Ruiu, L. Plant-growth-promoting Bacteria (PGPB) against insects and other agricultural pests / L. Ruiu // *Agronomy*. – 2020. – V. 10. – №. 6. – P. 861.
158. Sahay, H. Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes / H. Sahay, A. N. Yadav, A. K. Singh, S. Singh, R. Kaushik, A. K. Saxena // *Biotechnology*. – 2017. – V. 7. – №. 2. – P. 1-11.
159. Santos, M.S. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture / M.S. Santos, M.A. Nogueira, M. Hungria // *AMB Express*. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 1-22.
160. Santoyo, G. Plant growth-promoting bacterial endophytes / G. Santoyo, G. Moreno-Hagelsieb, del Carmen Orozco-Mosqueda, B.R. Glick // *Microbiological Research*. – 2016. – V. 183. – P. 92-99.
161. Santoyo, G. Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in *Rhizobacteria*. *Methods in Rhizosphere* / G. Santoyo, J.M. Sanchez-Yanez, S. de los Santos-Villalobos // *Biology Research*. – 2019. – P. 133-149.
162. Santoyo, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): an efficient mechanism to counter salt stress in crops / G. Santoyo M., del Carmen Orozco-Mosqueda, B.R. Glick // *Microbiological Research*. – 2020. – V. 235. – p. 126-439.
163. Sawarkar, A. Antibacterial activity of endophytic bacteria from leaves of *Tamarindus indica* / A. Sawarkar, R.K. Sharma, V. Gautam, K. Shraman, S. Jain // *The Pharma Innovation Journal*. – 2021. – T. 10. – №. 2. – P. 472-475.
164. Schulz, B. What are endophytes? / B. Schulz, C. Boyle // *Microbial Root Endophytes*. – 2006. – P. 1-13.

165. Schutte, G. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants / G. Schutte, M. Eckerstorfer, V. Rastelli, W. Reichenbecher, S. Restrepo-Vassalli, M. Ruohonen-Lehto, M. Mertens // *Environmental Sciences Europe*. – 2017. – V. 29. – №. 1. – P. 1-12.

166. Shafi, J. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review / J. Shafi, H. Tian, M. Ji // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2017. – V. 31. – №. 3. – P. 446-459.

167. Sheibani-Tezerji, R. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress / R. Sheibani-Tezerji, T. Rattei, A. Sessitsch, F. Trognitz, B. Mitter // *MBio*. – 2015. – V. 6. – №. 5. – P. 621-632.

168. Silva, J.D.O. Biocontrol agents in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato / J.D.O. Silva, M.V. Santana, L.L. Freire, B.D.S. Ferreira, M.R.D. Rocha // *Ciencia Rural*. – 2017. – V. 47. – №. 10.

169. Sindhu, S.S. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea / S.S. Sindhu, K.R. Dadarwal // *Microbiological Research*. – 2001. – V. 156. – №. 4. – P. 353-358.

170. Singh, J. Natural bioactive products in sustainable agriculture / J. Singh, A.N. Yadav // Springer Nature. – 2020.

171. Soare, M.G. Antimicrobial activity of newly isolated *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. strains and their potential use as biocontrol agents / M.G. Soare, C. Tomulescu, M.M. Petrescu, I. Lupescu, M. Moscovici, O. Popa, N. Babeanu // *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnol.* – 2017. – P. XXI.

172. Sokurenko, Y. Extracellular ribonuclease from *Bacillus licheniformis* (Balifase), a new member of the N1/T1 RNase superfamily / Y. Sokurenko, A. Nadyrova, V. Ulyanova, O. Ilinskaya // *BioMed Research International*. – 2016. – V. 2016. – P. 24-33.

173. Solanki, M. K. Co-inoculation of different antagonists can enhance the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato / M.K. Solanki, M.S. Yandigeri,

S. Kumar, R.K. Singh, A.K. Srivastava // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2019. – V. 112. – №. 11. – P. 1633-1644.

174. Sorokan, A. Endophytic Strain *Bacillus subtilis* 26DCryChS Producing CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes multifaceted potato defense against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and Pest *Leptinotarsa decemlineata* Say / A. Sorokan, G. Benkovskaya, G. Burkhanova, D. Blagova, I. Maksimov // *Plants*. – 2020. – V. 9. – №. 9. – P. 11-15.

175. Strobel, G. Natural products from endophytic microorganisms / G. Strobel, Daisy, B. U. Castillo, J. Harper // *Journal of Natural Products*. – 2004. – V. 67. – №. 2. – P. 257-268.

176. Su, F. *Burkholderia phytofirmans* PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* / F. Su, C. Jacquard, S. Villaume, J. Michel, F. Rabenoelina, C. Clement, N. Vaillant-Gaveau // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – V. 6. – P. 810.

177. Subramanian, P. Psychrotolerant endophytic *Pseudomonas* sp. strains OB155 and OS261 induced chilling resistance in tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.) by activation of their antioxidant capacity / P. Subramanian, A. Mageswari, K. Kim, Y. Lee, T. Sa // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2015. – V. 28. – №. 10. – P. 1073-1081.

178. Tahir, H. A. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2 / H. A. Tahir, Q. Gu, H. Wu, W. Raza, A. Hanif, L. Wu, X. Gao // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 171.

179. Therien, M. Surfactin production is not essential for pellicle and root-associated biofilm development of *Bacillus subtilis* / M. Therien, H.T. Kiesewalter, E. Auria, V. Charron-Lamoureux, M. Wibowo, G. Maroti, P. B. Beauregard // *Biofilm*. – 2020. – V. 2. – P. 100021.

180. Tiwari, S. *Bacillus*: plant growth promoting bacteria for sustainable agriculture and environment / S. Tiwari, V. Prasad, C. Lata // *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. – 2019. – P. 43-55.

181. Toral, L. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea* / L. Toral, M. Rodriguez, V. Bejar, I. Sampedro // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1315.

182. Tsatsakis, A.M. Environmental impacts of genetically modified plants: a review / A.M. Tsatsakis, M.A. Nawaz, D. Kouretas, G. Balias, K. Savolainen, V.A. Tutelyan, G. Chung // *Environmental Research*. – 2017. – V. 156. – P. 818-833.

183. Tyc, O. The ecological role of bacterial seed endophytes associated with wild cabbage in the United Kingdom / O. Tyc, R. Putra, R. Gols, J.A. Harvey, P. Garbeva // *Microbiology Open*. – 2020. – V. 9. – №. 1. – P. 935-954.

184. Ullah, A. Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach / A. Ullah, M. Nisar, H. Ali, A. Hazrat, K. Hayat, A. A. Keerio, X. Yang // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 103. – №. 18. – P. 7385-7397.

185. Valenzuela-Ruiz, V. Lipopeptidos producidos por agentes de control biologico del genero *Bacillus*: revision de herramientas analíticas utilizadas para su estudio / V. Valenzuela-Ruiz, G.T.G. Gamboa, E.D.V. Rodríguez, F.I.P. Cota, G. Santoyo, S. de los Santos Villalobos // *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. – 2020. – V. 11. – №. 2. – P. 419-432.

186. Verma, P. Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement / P. Verma, A.N. Yadav, V. Kumar, D.P. Singh, A. K. Saxena // *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. – 2017. – P. 543-580.

187. Verma, P. Appraisal of diversity and functional attributes of thermotolerant wheat associated bacteria from the peninsular zone of India / P. Verma, A.N. Yadav, K.S. Khannam, S. Mishra, S. Kumar, A.K. Saxena, A. Suman // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2019. – V. 26. – №. 7. – P. 1882-1895.

188. Villarreal-Delgado, M.F. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity / M.F. Villarreal-Delgado, E.D. Villa-Rodríguez, L.A. Cira-Chavez, M.I. Estrada-Alvarado, F.I. Parra-Cota, S. Santos-Villalobos // *Revista Mexicana de Fitopatología*. – 2018. – V. 36. – P. 95-130.

189. Vinodkumar, S. Diversity and antiviral potential of rhizospheric and endophytic *Bacillus* species and phyto-antiviral principles against tobacco streak virus in cotton / S. Vinodkumar, S. Nakkeeran, P. Renukadevi, S. Mohankumar, //Agriculture, Ecosystems & Environment. – 2018. – V. 267. – P. 42-51.
190. Waghunde, R.R. Endophyte microbes: a weapon for plant health management / R.R. Waghunde, R.M. Shelake, M.S. Shinde, H. Hayashi // Microorganisms for Green Revolution. – 2017. – P. 303-325.
191. Walia, A. Endophytic bacteria: role in phosphate solubilization / A. Walia, S. Guleria, A. Chauhan, P. Mehta // Endophytes: Crop Productivity and Protection. – 2017. – P. 61-93.
192. Wang, T.T. Complete genome sequence of endophyte *Bacillus flexus* KLBMP 4941 reveals its plant growth promotion mechanism and genetic basis for salt tolerance / T.T. Wang, P. Ding, P. Chen, K. Xing, J.L. Bai, W. Wan, S. Qin // Journal of Biotechnology. – 2017. – V. 260. – P. 38-41.
193. Wang M., Zhang Q. The medicament-fertilizer mixture of preventing and treating crops virus infection/ CN Patent no. CN106818901A. Published 2017.06.13.
194. Wassermann, B. Studying seed microbiomes / B. Wassermann, D. Rybakova, E. Adam, C. Zachow, M. Bernhard, M. Muller, G. Berg // The Plant Microbiome. – Humana. – 2021. – P. 1-21.
195. Wells, J.M. Butterfield J.E. Salmonella contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace / J.M. Wells // Plant Disease. – 1997. – V. 81. – №. 8. – P. 867-872.
196. Wu, H. Distribution and Exudation of Allelochemicals in Wheat *Triticum aestivum* / H. Wu, T. Haig, J. Pratley, D. Lemerle, M. An // Journal of Chemical Ecology. – 2000. – V.26. – P. 2141-2154.
197. Wu, F. Effects of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Growth, Photosynthesis, and Nutrient Uptake of *Camellia oleifera* Abel / F. Wu, J. Li, Y. Chen, L. Zhang, Y. Zhang, S. Wang, J. Liang // Forests. – 2019. – V. 10. – №. 4. – P. 348.

198. Xiao, Y. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops / Y. Xiao, K. Wu // *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* – 2019. – V. 374. – №. 1767. – P. 208-316.
199. Xicohtencatl-Cortes, J. Interaction of *Escherichia coli* O157: H7 with leafy green produce / J. Xicohtencatl-Cortes, E.S. Chacon, Z. Saldana, E. Freer, J.A. Giron // *Journal of food protection.* – V.72. – №.7. – 2009 – P.1531-1537.
200. Xu, C. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins / C. Xu, B. C. Wang, Z. Yu, M. Sun // *Toxins.* – 2014. – V. 6. – №. 9. – P. 2732-2770.
201. Yadav, A. N. Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture / A. N. Yadav, A. K. Saxena // *Journal of Applied Biology & Biotechnology.* – 2018. – V. 6. – P. 48-55.
202. Yadav, A.N. Recent advancement in white biotechnology through fungi / A.N. Yadav, S. Mishra, S. Singh, A. Gupta // *Diversity and Enzymes Perspectives.* – 2019. – V.1.
203. Yang, S.Y. Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9 / S.Y. Yang, D.J. Lim, M.Y. Noh, J.C. Kim, Y.C. Kim, I.S. Kim // *Entomological Research.* – 2017. – V. 47. – №. 1. – P. 55-59.
204. Yang, X. Increased multiple virus resistance in transgenic soybean overexpressing the double-strand RNA-specific ribonuclease gene PAC1 / X. Yang, L. Niu, W. Zhang, H. He, J. Yang, G. Xing, Y. Dong // *Transgenic Research.* – 2019. – V. 28. – №. 1. – P. 129-140.
205. Yasbin, R. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells / R.E. Yasbin, G.A. Wilson, F.E. Young // *Journal of Bacteriology.* – 1975. – V. 121. – №. 1. – P. 296-304.
206. Yu, X. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper / X. Yu, C. Ai, L. Xin, G. Zhou // *European Journal of Soil Biology.* – 2011. – V. 47. – №. 2. – P. 138-145.

207. Zeigler, D.R. *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains, Volume 1: *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* / D.R. Zeigler // *Bacillus Genetic Stock Center*. – 1999. – V.2. – P.36-51.
208. Zeigler, D.R. Experimental evolution of *Bacillus subtilis* / D.R. Zeigler, W.L. Nicholson // *Environmental Microbiology*. – 2017. – V. 19. – №. 9. – P. 3415-3422.
209. Zhang, K. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system / K. Zhang, L. Su, X. Duan, L. Liu, J. Wu // *Microbial Cell Factories*. – 2017. – V. 16. – №. 1. – P. 1-15.
210. Zhang, Y. Isolation of a *Bacillus aryabhatai* strain for the resolution of (R, S)-ethyl indoline-2-carboxylate to produce (S)-indoline-2-carboxylic acid / Y. Zhang, J. Chen, C. Chen, S. Wu // *Catalysts*. – 2019. – V. 9. – №. 2. – P. 206.
211. Zhao, H. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus* / H. Zhao, D. Shao, C. Jiang, J. Shi, Q. Li, Q. Huang, M. Jin // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 101. – №. 15. – P. 5951-5960.
212. Zotti, M. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes / M. Zotti, E.A. Dos Santos, D. Cagliari, O. Christiaens, C.N.T. Taning, G. Smagghe // *Pest Management Science*. – 2018. – V. 74. – №. 6. – P. 1239-1250.