

DOI 10.5281/zenodo.10141759

EDN WZPPHV

УДК 632/633/635-2

Румянцев С. Д., Алексеев В. Ю., Шеин М. Ю., Веселова С. В., Бурханова Г. Ф.,
Максимов И. В.

РОЛЬ БАКТЕРИЙ *VACILLUS SPP.* В ИНДУКЦИИ ГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ И МЕХАНИЗМА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ОБЫКНОВЕННОЙ ЧЕРЕМУХОВОЙ ТЛЕ *RHOPALOSIPHUM PADI (L.)*

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»

Реферат. Поиск новых перспективных эндофитных стимулирующих рост растений бактерий (СРРБ) и изучение механизмов их действия при развитии иммунитета против вредителей, связанных с праймингом и активацией системы РНК-интерференции, является актуальной задачей. Поэтому целью нашей работы было изучение роли нескольких штаммов и изолятов эндофитов рода *Bacillus* в активации системной индуцированной устойчивости (СИУ) и компонентов системы РНКи в растениях пшеницы заселенных обыкновенной черемуховой тлей *Rhopalosiphum padi L.* Исследования проводили в лаборатории ИБГ УФИЦ РАН в период с августа 2022 г. по апрель 2023 г. Изучено четыре штамма эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-6066, *B. thuringiensis* В-5351 и два изолята *Bacillus sp.* – *Tas-1* и *Tas-8.2*, выделенные из внутренних тканей растений пшеницы. Все изученные штаммы и изоляты *Bacillus spp.* опосредованно через растения увеличивали смертность черемуховой тли *R. padi* на 17–48 % и повышали толерантность растений к тле, увеличивая рост листа на 19–26 % по сравнению с необработанными заселенными тлей растениями. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени проведена сравнительная оценка характера транскрипционной активности генов, кодирующих защитные белки – маркеры салицилат-, этилен- и жасмонат-сигнальных путей (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9), а также генов системы РНК-интерференции – *AGO1*, *AGO2*, *AGO4*, *DCL2* и *DCL4*. Показано, что бактерии активировали системную устойчивость, регулируя работу разных гормональных сигнальных путей, но сигнальный путь этилена у них был общим. В большей степени бактерии влияли на экспрессию генов *AGO4* и *DCL2*, повышая ее по сравнению с контролем в 30 и 12–14 раз соответственно. Таким образом, сигнальный путь этилена и ферменты *AGO4* и *DCL2* играют важную роль в индукции устойчивости пшеницы к черемуховой тле *R. padi* опосредованной бактериальными штаммами *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-6066, *B. thuringiensis* В-5351 и изолятом *Bacillus sp. Tas8.2*.

Ключевые слова: *Bacillus spp.*, *Rhopalosiphum padi L.*, гормональные сигнальные пути, защита растений, РНК-интерференция, системная индуцированная устойчивость, эндофиты, этилен.

Для цитирования: Румянцев С. Д., Алексеев В. Ю., Шеин М. Ю., Веселова С. В., Бурханова Г. Ф., Максимов И. В. Роль бактерий *Bacillus spp.* в индукции гормональных сигнальных путей и механизма РНК-интерференции при формировании защитного ответа растений пшеницы к обыкновенной черемуховой тле *Rhopalosiphum padi (L.)* // Таврический вестник аграрной науки. 2023. № 3 (35). С. 199–214. EDN: WZPPHV. DOI: 10.5281/zenodo.10141759.

For citation: Rumyantsev S. D., Alekseev V. Yu., Shein M. Yu., Veselova S. V., Burkhanova G. F., Maksimov I. V. The role of *Bacillus* spp. in the induction of hormonal signaling pathways and mechanism of RNA interference during formation defensive response of wheat plants against *Rhopalosiphum padi* (L.) // *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2023. No. 3(35). P. 199–214. EDN: WZPPHV. DOI: 10.5281/zenodo.10141759.

Введение

В настоящее время для получения высоких урожаев необходимо использование не только устойчивых сортов, но и различных средств защиты растений (СЗР) от вредителей и болезней. Для сельского хозяйства представляют большой интерес биологические СЗР, индуцирующие иммунные реакции растений, а также обеспечивающие защиту растений с использованием технологий РНК-интерференции [1, 2]. Эффективным приемом может стать создание таких биологических СЗР на основе эндофитных стимулирующих рост растений бактерий (СРРБ), которые могут жить внутри растений, не вызывая у них болезней [3]. По сравнению с почвенными микроорганизмами эндофиты внутри растений могут оказывать более сильное и прямое воздействие на растения. Эндофиты благодаря синтезу различных метаболитов проявляют антагонизм к патогенам и/или инсектицидность, способность к мобилизации и/или фиксации элементов минерального питания, деградации токсинов, индукции устойчивости к стрессовым факторам, стимуляции роста растений и фитоиммунитета. Также эндофиты более устойчивы к воздействию факторов окружающей среды; все это предполагает их активное влияние на физиологические характеристики растений и может привести к созданию эффективных биопрепаратов [4].

К сожалению, в настоящее время против насекомых-вредителей, питающихся флоэмным соком (тли, белокрылки и цикадки), имеется ограниченное количество биологических СЗР и борьба с этими вредителями ограничивается применением химических системных инсектицидов, загрязняющих окружающую среду [1]. Актуальной задачей является поиск новых перспективных штаммов эндофитных бактерий и изучение механизмов их действия при развитии иммунитета против вредителей. Данная работа посвящена изучению роли бактерий рода *Bacillus* в развитии защитных реакций в растениях пшеницы к обыкновенной черемуховой тле *Rhopalosiphum padi* L.

Обыкновенная черемуховая тля относится к мигрирующим видам тлей и распространена повсеместно: на севере Евразии, Кольском полуострове, в Средней Азии, Приморье, Сибири, Казахстане и Закавказье [5]. Первичными растениями-хозяевами для черемуховой тли являются различные виды слив, а также черемуха, вторичными становятся злаки и растения из других семейств однодольных [6]. *R. padi* наносит значительный ущерб посевам пшеницы, так как воздействие тлей на растение обусловлено снижением скорости фотосинтеза, и как следствие скорости роста, при изъятии флоэмного сока во время кормления тлей [7, 8]. Применение биопрепаратов на основе эндофитных бактерий, способных долговременно защищать растения от вредителей, будет способствовать отказу от использования химических СЗР и гарантировать получение экологически чистой продукции, свободной от различных канцерогенов.

Один из механизмов защиты растений с помощью СРРБ связан с элиситорной активностью бактериальных метаболитов и запуском системной индуцированной устойчивости в растениях. Системная устойчивость осуществляется благодаря бактериальным детерминантам (МAMPs, от *microbe-associated molecular patterns*), таким как флагеллин, липополисахариды, сидерофоры, антибиотики, биосурфактанты, а также летучие органические соединения и регулируется фитогормонами – жасмоновой (ЖК) и салициловой (СК) кислотами, этиленом, абсцизовой кислотой (АБК), а также цитокининами (ЦК) и ауксинами [1, 2, 9, 10].

Отличительной особенностью системной устойчивости, опосредованной стимулирующими рост растений бактериями, является развитие устойчивости по механизму прайминга, который заключается в более быстрой и сильной активации клеточных механизмов защиты растения при атаке патогенами или вредителями и может длиться весь вегетационный период и даже передаваться по наследству [10–12]. Устойчивость, опосредованная бактериями и развивающаяся по пути прайминга, проявляется в регуляции экспрессии генов макроорганизма на различных этапах его взаимодействия с вредными организмами. Ранние ответы характеризуются быстрым накоплением активных форм кислорода (АФК), которые активируют редокс-чувствительные транскрипционные факторы (ERF, MYB, MYC, WRKY) и гены защитных белков [9, 10]. В долгосрочные ответы вовлекается эпигенетическая регуляция экспрессии генов растения, включающая (де)метиляцию ДНК и РНК-направленное метилирование ДНК (RNA-directed DNA Methylation – RdDM) при участии малых РНК растений (small RNAs – sRNAs) [12, 13]. Механизмы всех этих процессов и их регуляцию активно изучают последние несколько лет [10, 12].

В настоящее время явление РНК-интерференции (РНКи или РНК сайленсинг) и малые РНК также рассматривают как важные регуляторы перепрограммирования экспрессии генов в иммунных реакциях растений, вирулентности патогена или вредителя и коммуникации в растительно-микробных взаимодействиях [14, 15]. Производство малых РНК осуществляется с помощью ряда ключевых ферментов, таких как Dicer-подобные белки (Dicer-like – DCL), белки Argonaute (AGO) и РНК-зависимые РНК полимеразы (RNA-dependent RNA polymerases – RdR) [14, 16]. Бактерии могут быть индукторами экспрессии малых РНК в растениях посредством запуска системной устойчивости, однако механизм этого процесса еще плохо изучен [2]. Тем не менее, установлено, что фитогормоны играют регулируемую роль в перепрограммировании генома, в процессах РНК-интерференции и (де)метиляции ДНК при развитии прайминга [2, 17]. Таким образом, именно гормональные сигнальные пути могут играть одну из главных ролей в регуляции процесса прайминга при развитии системной устойчивости, опосредованной бактериями, при этом этот вопрос требует глубокого изучения, так как на данный момент в литературе присутствует разрозненная информация об участии фитогормонов в работе системы РНКи [2].

В последнее время стали появляться работы, свидетельствующие о развитии защитных реакций в растениях под влиянием эндофитных бактерий при атаке насекомыми [18, 19]. Однако большинство исследовательских работ и обзоров посвящено изучению влияния бактерий на развитие системной индуцированной устойчивости в растениях против насекомых с грызущим ротовым аппаратом [18]. Гораздо меньше работ о влиянии эндофитных бактерий на иммунные реакции растений против насекомых, питающихся флоэмным соком [19–21]. При этом показано, что бактерии запускают системную устойчивость в растениях против насекомых, питающихся флоэмным соком по этилен/ЖК- и СК-защитным путям [20–22]. Важную роль в индукции системной индуцированной устойчивости, опосредованной эндофитными бактериями, могут играть бактериальные метаболиты, такие как липопептиды и Сгу-белки [20–24]. Влияние бактерий на регуляцию механизма РНКи при развитии системной индуцированной устойчивости в растениях начали изучать последние несколько лет, и на данный момент показана роль бактерий в этом процессе только при формировании системной устойчивости против патогенов [25, 26].

Цель исследований – изучение влияния нескольких штаммов и изолятов эндофитных бактерий рода *Bacillus*, продуцирующих липопептиды и/или Сгу-белки, на индукцию системной индуцированной устойчивости и активацию компонентов

системы РНКи в растениях пшеницы заселенных обыкновенной черемуховой тлей *Rhopalosiphum padi* L.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в лаборатории ИБГ УФИЦ РАН в период с августа 2022 г. по апрель 2023 г. Обыкновенную черемуховую тлю (*R. padi*) для экспериментов размножали на молодых проростках мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Салават Юлаев (СЮ), выращенных в изолированных сосудах с прожаренной при 180 °С почвой в контролируемых лабораторных условиях на светоплощадках с 16-часовым световым периодом при температуре 20/24 °С (ночь/день), интенсивность света – 146 Вт/м² (лампы Osram L 36W/77). Эксперименты проводили на том же сорте яровой пшеницы Салават Юлаев. В работе использовали бактерии из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: два штамма *Bacillus subtilis* 26Д (ВНИИСХМ, №128) и 11ВМ (ВНИИСХМ №519), два штамма *B. thuringiensis* В-5351 и В-6066 и два изолята *Bacillus sp.* Tas1 и Tas8.2, выделенные из листьев пшеницы, произрастающих на территории Республики Башкортостан (<http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc>).

Бактерии культивировали на жидкой питательной среде Luria Bertani (LB) при 22–24 °С на шейкере Orbital Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Латвия) при 120 об./мин. Экспериментальные семена пшеницы перед посадкой обрабатывали полусухим способом 2 мкл суспензии бактерий с титром 10⁹ на 1 грамм семян. Эксперименты с растениями проводили на проростках пшеницы, выращенных на гидропонной культуре (10 % раствор Хогланда-Арнона) [27]. Проростки в возрасте трех суток заселяли тлями разных возрастов в количестве не менее 10 особей на растение. Смертность тлей и выносливость растений подсчитывали через 14 дней, как описано в ранее опубликованной нами работе [27].

Из контрольных и опытных листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 72 часа после заселения обыкновенной черемуховой тлей (*R. padi*), проводили выделение РНК с использованием реагента «Лира» согласно протоколу фирмы-поставщика («Biolabmix», Россия). Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты системы РНК-интерференции и защитные белки (PR-белки, от pathogenesis related) проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе «iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System» («BioRad», США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I («Синтол», Россия). ПЦР в реальном времени проводили как описано в ранее опубликованной нами работе [28], с использованием праймеров для генов, кодирующих следующие ферменты РНКи: *TaAGO1* (JQ805149.1), *TaAGO2* (KY794780), *TaAGO4* (JQ805150.1), *TaDCL2* (KY794782.1), *TaDCL4* (KY794783.1), а также PR-гены: *PR1* (AF384143), *PR2* (DQ090946), *PR3* (AB029936.1), *PR6* (EU293132.1) и *PR9* (TC151917). Для нормирования результатов экспрессии исследуемых генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессирующегося белка ингибитора РНКаз (RNase L inhibitor-like) *TaRLI* (AY059462). Все праймеры были разработаны с помощью онлайн ресурса IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home>).

Все эксперименты повторяли три раза и проводили в трех биологических и трех аналитических повторах (общее n = 9). Тесты на плодовитость тли включали в себя не менее 10 биологических повторов (общее n = 30). В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в соответствии с тестом Дункана при доверительном уровне $p \leq 0,05$ с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0.

Результаты и их обсуждение

Все шесть штаммов и изолятов рода *Bacillus*, использованные в данной работе, являются эндофитами. Эндофитность штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11ВМ, *B. thuringiensis* В-5351 и В-6066 была проверена ранее [29]. Изоляты *Bacillus sp.* Tas1 и *Bacillus sp.* Tas8.2 являются эндофитами, так как выделены из внутренних тканей растений пшеницы. Все шесть штаммов и изолятов рода *Bacillus* синтезируют цитокинины и ауксины [29]. Наибольшее содержание цитокининов обнаружено в культуральной среде штамма *B. subtilis* 26Д и изолята *Bacillus sp.* Tas8.2, а наибольшее содержание индолил уксусной кислоты – в культуральной среде штаммов *B. subtilis* 11ВМ и *B. thuringiensis* В-5351 [29].

Кроме того, ранее была изучена способность штаммов и изолятов продуцировать липопептиды и было показано, что штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-5351 и изоляты *Bacillus sp.* Tas1 и *Bacillus sp.* Tas8.2 продуцируют липопептид сурфактин, штамм *B. subtilis* 11ВМ – липопептид итурин, а штамм *B. thuringiensis* В-6066 – липопептид фенгицин [21, 29]. Продукция липопептидов может играть важную роль в инсектицидности бактериальных штаммов [21]. Так, в настоящее время показана инсектицидная активность липопептидов бактерий *Bacillus spp.* против отрядов Diptera, Coleoptera, Hemiptera и Lepidoptera [21, 30]. Однако также показана элиситорная роль липопептидов и их способность запускать системную устойчивость в растениях против патогенов и вредителей [20, 21, 24].

В дальнейшей работе было изучено опосредованное через растение влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus spp.* на выносливость растений, заселенных черемуховой тлей, и на смертность тли, кормившейся на обработанных растениях (таблица 1). Опосредованное влияние может выражаться в рост-стимулирующем эффекте бактерий, приводящем к повышению выносливости (толерантности) растений к тлям, которая заключается в быстроте восстановления фотосинтетической активности и ростовых процессов [8, 18]. В наших экспериментах установлена невысокая выносливость растений пшеницы сорта Салават Юлаев по отношению к черемуховой тле *R. padi*, которая проявлялась в торможении роста первого листа на 17,5 % по сравнению с контрольными растениями. Предпосевная обработка растений бактериальными штаммами и изолятами ускоряла рост первого листа пшеницы при заселении тлей. Таким образом, эндофитные бактерии, влияя на рост растений, формировали определенную степень толерантности растений к вредителю. При этом предпосевная обработка семян пшеницы бактериями увеличивала смертность тлей, кормившихся на таких растениях, на 17–48 % относительно необработанных растений, где смертность тли составила 9,5 %. Наибольший опосредованный эффект на смертность тли оказывали штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-6066, *B. thuringiensis* В-5351 и изолят *Bacillus sp.* Tas8.2.

Такой результат опосредованного влияния на жизнедеятельность черемуховой тли может быть связан с запуском бактериями системной индуцированной устойчивости в растениях против вредителя. Для определения способности бактерий рода *Bacillus spp.* регулировать системную устойчивость в растениях пшеницы к *R. padi* была изучена экспрессия генов, кодирующих PR-белки, маркеры салицилат- и этилен/жасмонат-сигнальных путей. Белки PR-1, PR-2 (глюканазы) являются маркерами сигнального пути салициловой кислоты. Белки PR-3 (хитиназы) считаются маркерами этиленового сигнального пути, а PR-6 (ингибиторы протеиназ) – маркерами сигнального пути жасмоновой кислоты. Белки PR-9 (пероксидазы) индуцируются как сигнальным путем салициловой кислоты, так и сигнальным путем жасмоновой кислоты [9].

Таблица 1 – Опосредованное влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus spp.* на смертность обыкновенной черемуховой тли *R. padi* и выносливость растений пшеницы, заселенных тлей

Штамм и изолят	Смертность тлей, %	Прирост первого листа, % от контроля*
Вода	9,5 ± 1,7a	82,5 ± 4,2a
<i>B. subtilis</i> 26Д	41,2 ± 3,8b	108,9 ± 5,1b
<i>B. subtilis</i> 11ВМ	26,5 ± 2,7c	101,2 ± 4,3b
<i>B. thuringiensis</i> В-6066	54,4 ± 4,5d	102,6 ± 4,9b
<i>B. thuringiensis</i> В-5351	57,6 ± 4,3d	101,5 ± 6,2b
<i>Bacillus sp.</i> Tas8.2	37,4 ± 4,3b	109,2 ± 6,1b
<i>Bacillus sp.</i> Tas1	28,7 ± 2,5c	105,4 ± 5,4b

Примечание. *Прирост первого листа, не обработанного бактериальными штаммами и незаселенного тлей, принят за 100 %. Варианты в одном столбце, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0,05$.

Во многих работах показано, что заселение растений тлями вызывает в первую очередь индукцию жасмонат-зависимых генов липоксигеназ и ингибиторов протеиназ, что говорит о повреждении тканей растений стилетами тлей [7]. При дальнейшем питании тлей активируется салицилат-зависимый сигнальный путь и растения реагируют на атаку тлей как на патогены [7]. Так, активацию жасмонат-зависимых генов наблюдали у восприимчивых и у устойчивых к тле растений, а индукция салицилат-зависимых генов была более ранней и сильной у устойчивых генотипов [7]. Об активации этиленового сигнального пути и его роли в защите растений от насекомых, питающихся флоэмным соком, известно мало [21, 22]. В некоторых исследованиях наблюдали повышение уровня этилена в сортах ячменя, устойчивых к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* и обыкновенной черемуховой тле *R. padi* [22]. В другой работе показано, что передача сигналов этилена способствует заселению тлей на восприимчивые растения, но индуцирует антиксеноз при заселении на устойчивые растения [31].

Наши результаты показали, что через 72 часа после заселения черемуховой тлей средневосприимчивого сорта Салават Юлаев в листьях растений повышалось содержание транскриптов генов *PR-2*, *PR-3*, *PR-6* и *PR-9* – маркеров этилен-, жасмонат- и салицилат- сигнальных путей (рисунок 1).

При заселении черемуховой тлей растений, предварительно обработанных бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д или изолятом *Bacillus sp.* Tas8.2, наблюдали накопление мРНК гена *PR-2* и более сильное, чем у необработанных бактериями растений, накопление мРНК генов *PR-3* и *PR-9* (рисунок 1 а, е). Кроме этого, у таких растений обнаружено значительное накопление транскриптов гена *PR-1* (рисунок 1 А, Е). Предпосевная обработка штаммами *B. thuringiensis* В-6066 и *B. thuringiensis* В-5351 также индуцировала более сильное накопление мРНК гена *PR-3* по сравнению с необработанными бактериями растениями через 72 часа после заселения черемуховой тлей (рисунок 1 В, Г). Обработка растений *B. thuringiensis* В-6066 положительно влияла на экспрессию гена *PR-9*, но в меньшей степени, чем у необработанных бактериями и заселенных тлей растений (рисунок 1 В). Вместе с тем, у растений, обработанных штаммами *B. thuringiensis* В-6066 и *B. thuringiensis* В-5351 и заселенных тлей, обнаружена значительная индукция экспрессии гена *PR-6* – маркера сигнального пути жасмоновой кислоты (рисунок 1 В, Г). Также на индукцию транскрипции гена *PR-6* влияла обработка изолятом *Bacillus sp.* Tas1, но в гораздо меньшей степени, чем обработка штаммами *B. thuringiensis* В-6066 и *B. thuringiensis* В-5351 (рисунок 1 Д). Предпосевная обработка штаммом *B. subtilis* 11ВМ индуцировала накопление транскриптов только гена *PR-9*, но в меньшей степени, чем у необработанных бактериями и заселенных тлей растений (рисунок 1 Б).

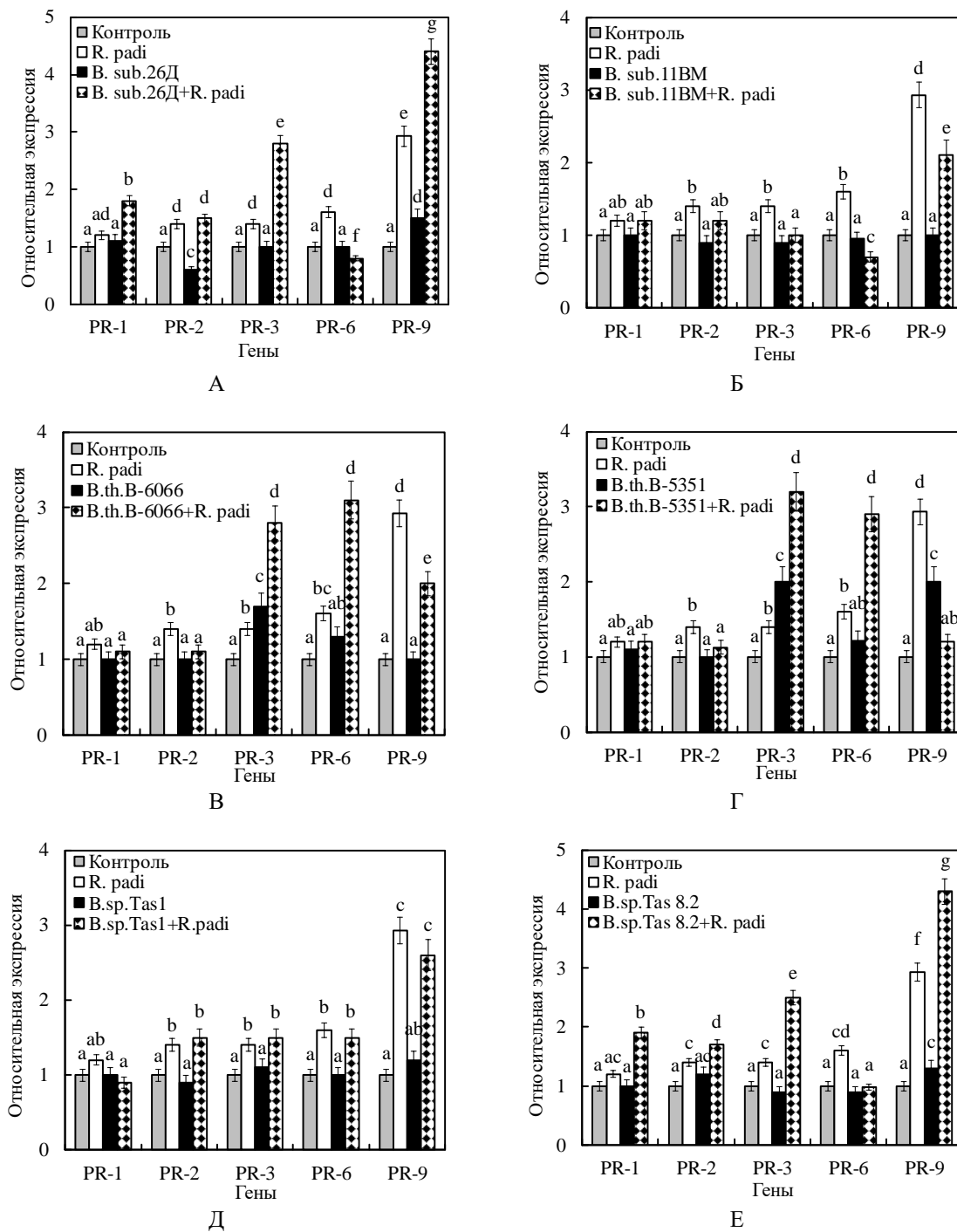


Рисунок 1 – Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus* spp. на транскрипционную активность генов, кодирующих PR-белки пшеницы, маркеры сигнальных путей PR-1, PR-2, PR-3, PR-6 и PR-9, через 72 часа после заселения растений обыкновенной черемуховой тлей *R. padi* L.

Примечание. Здесь и далее: А: *B. sub.26Д* – *B. subtilis* 26Д; Б: *B. sub. 11BM* – *B. subtilis* 11BM; В: *B.th. B-6066* – *B. thuringiensis* B-6066; Г: *B.th. B-5351* – *B. thuringiensis* B-5351; Д: *B. sp. Tas1* – *Bacillus* sp. Tas1; Е: *B. sp. Tas8.2* – *Bacillus* sp. Tas8.2. Варианты на одной гистограмме, обозначенные разными латинскими буквами, статистически отличаются друг от друга согласно тесту Дункана при $p \leq 0,05$.

Таким образом, черемуховая тля индуцировала в растениях пшеницы средневосприимчивого сорта Салават Юлаев этилен-, жасмонат- и салицилат-сигнальные пути. Обработка бактериями *B. subtilis* 26Д и *Bacillus sp.* Tas8.2 индуцировала этилен- и салицилат- сигнальные пути, а обработка бактериями *B. thuringiensis* В-6066 и *B. thuringiensis* В-5351 – жасмонат- и этилен-сигнальные пути защиты у растений пшеницы заселенных черемуховой тлей (рисунок 1). Именно эти бактерии оказали наибольший положительный эффект на устойчивость растений пшеницы к черемуховой тле и привели к высокой смертности тли на растениях (таблица 1). Однако обработка этими бактериальными штаммами и изолятами индуцировала системную устойчивость в растениях к тле по различным гормональным сигнальным путям, что может быть связано с видовой принадлежностью бактерий и синтезом различных групп метаболитов [18, 28]. Согласно литературным данным, бактерии *B. subtilis* способны индуцировать системную устойчивость в растениях по салицилат-зависимому пути, а бактерии *B. thuringiensis* могут индуцировать системную устойчивость по салицилат-независимому, но этилен/жасмонат-зависимому пути [9, 28]. Так, штаммы *Bacillus pumilis* и *Bacillus amyloliquefaciens* индуцировали системную устойчивость в растениях хлопчатника против малой совки *Spodoptera exigua* по этилен/жасмонат-зависимому пути [32]. А бактерии *Pseudomonas fluorescens* индуцировали системную устойчивость в растениях *Arabidopsis thaliana* против персиковой тли *Myzus persicae* по салицилат- и жасмонат-зависимым путям [33]. Также было показано, что штаммы *B. thuringiensis* (В-5689 и В-6066) индуцировали гены жасмонат-зависимого защитного пути, а штамм *B. subtilis* 26Д запускал гены салицилат-защитного пути у растений пшеницы заселенных обыкновенной злаковой тлей *Schizaphis graminum* [27].

В регуляции системной индуцированной устойчивости, опосредованной бактериями и развивающейся по пути прайминга, играют важную роль не только гормональные сигнальные пути, но и система РНК-интерференции и малые РНК [2, 17]. Белки DCL и AGO являются наиболее важными компонентами механизма РНК-интерференции в защите растений, поскольку малые РНК генерируются DCL и функционируют через AGO, подавляя гены-мишени [14]. Показано, что белки DCL и AGO участвуют в индукции устойчивости растений к вирусам, патогенам и вредителям через механизм сайленсинга генов, регуляцию экспрессии собственных генов, а также запускают системную устойчивость [14]. В отдельных работах была изучена экспрессия двух генов, кодирующих Dicer-подобные белки DCL2 и DCL4 и участвующих в регуляции иммунитета растений против вирусов и насекомых-вредителей [14, 34]. Также изучали экспрессию трех генов, кодирующих белки Argonaute AGO1, AGO2 и AGO4, играющих роль во взаимодействии растений и микроорганизмов, в развитии защитных реакций в ответ на стрессовые факторы и участвующих в РНК-направленном метилировании ДНК [14].

Анализ экспрессии генов ферментов системы РНКи у средневосприимчивого сорта Салават Юлаев показал накопление транскриптов всех пяти генов *AGO1*, *AGO2*, *AGO4*, *DCL2* и *DCL4* через 72 часа после заселения тлей (рисунок 2).

Однако только у двух генов *AGO4* и *DCL2* обнаружено значительное повышение транскриптов – в 5 раз и в 3,2 раза соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 2). Через 72 часа после заселения тлей у растений, предварительно обработанных бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д или изолятом *Bacillus sp.* Tas8.2, наблюдали значительное накопление мРНК всех пяти генов *AGO1*, *AGO2*, *AGO4*, *DCL2* и *DCL4*, причем в гораздо большей степени, чем у необработанных бактериями и заселенных тлей растений (рисунок 2, А, Е).

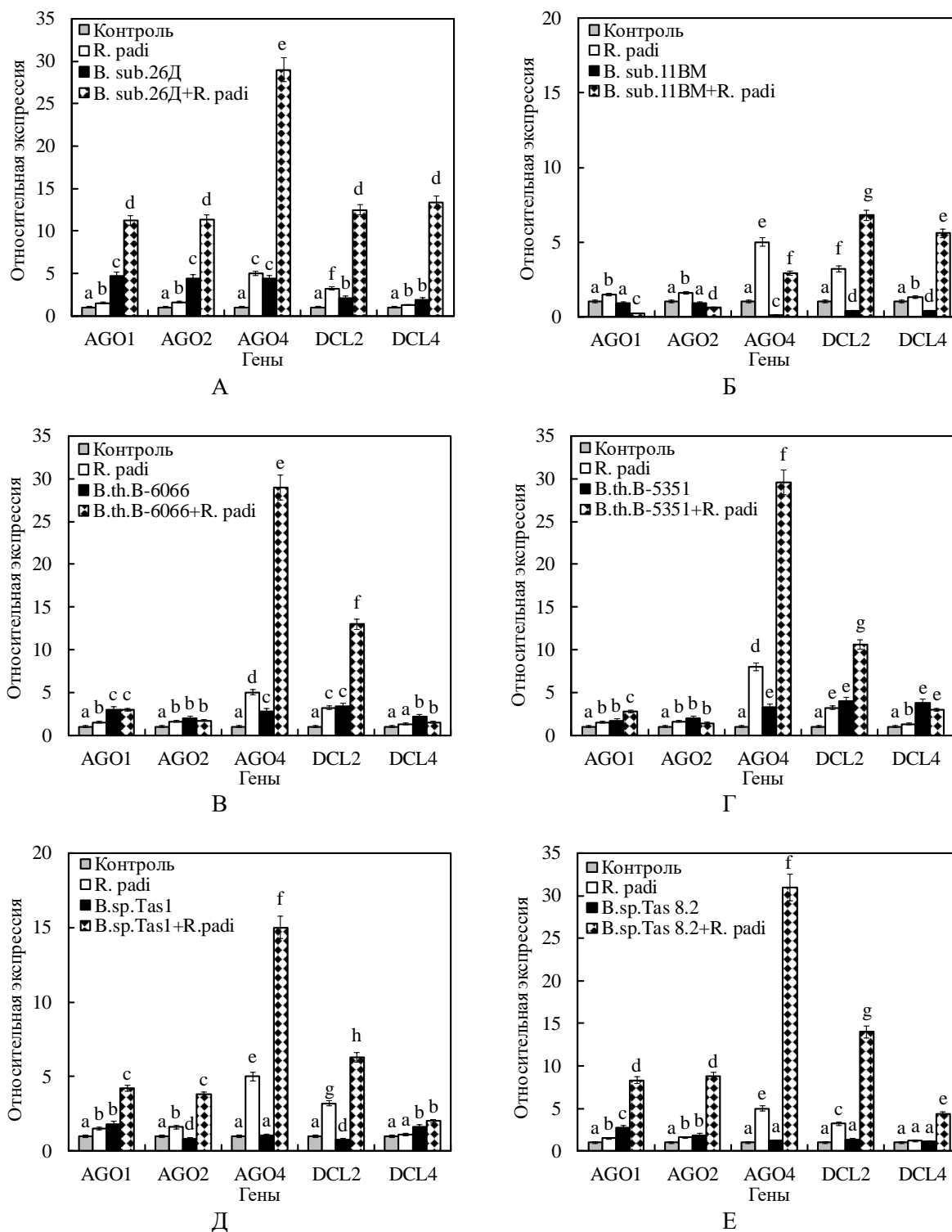


Рисунок 2 – Влияние бактериальных штаммов и изолятов *Bacillus spp.* на транскрипционную активность генов, кодирующих ферменты системы РНКи *AGO1*, *AGO2*, *AGO4*, *DCL2* и *DCL4* пшеницы, через 72 часа после заселения растений обыкновенной черемуховой тлей *R. padi* L.

Обработка растений штаммом *B. subtilis* 26Д или изолятом *Bacillus sp.* Tas8.2 повышала содержание мРНК генов *AGO1* и *AGO2* в 8–11 раз, гена *DCL2* – примерно в 13–14 раз, а гена *AGO4* – в 30 раз по сравнению с контрольными растениями. На

экспрессию гена *DCL4* бактерии влияли в разной степени: через 72 часа после заселения растений тлей обработка штаммом *B. subtilis* 26Д увеличивала содержание транскриптов этого гена в 13 раз, а обработка изолятом *Bacillus sp.* Tas8.2 – в четыре раза по сравнению с контролем. Обработка изолятом *Bacillus sp.* Tas1 влияла на экспрессию генов *AGO1*, *AGO2*, *AGO4*, *DCL2* и *DCL4* также, как изолят *Bacillus sp.* Tas8.2, но в меньшей степени – содержание мРНК изученных генов повышалось в 4, 4, 15, 6 и 2 раза соответственно по сравнению с контролем (рисунок 2, Д). Обработка штаммом *B. subtilis* 11ВМ у заселенных тлей растений снижала содержание транскриптов генов *AGO1* и *AGO2*, только в три раза повышала содержание мРНК гена *AGO4*, в семь и шесть раз повышала содержание транскриптов генов *DCL2* и *DCL4* по сравнению с контролем (рисунок 2, Б). Обработка растений штаммами *B. thuringiensis* В-6066 и *B. thuringiensis* В-5351 больше всего увеличивала содержание мРНК генов *AGO4* и *DCL2* – соответственно в 30 и 12 раз, в меньшей степени повышала содержание транскриптов гена *AGO1* – примерно в три раза по сравнению с контролем, и практически не влияла на экспрессию генов *AGO2* и *DCL4* (рисунок 2, В, Г). Таким образом, бактериальные штаммы и изоляты влияли на экспрессию всех изученных генов компонентов РНК-интерференции, но в особенности на экспрессию генов *AGO4* и *DCL2*.

Известно, что белки *DCL2* и *DCL4*, обеспечивающие процессинг двуцепочечных РНК, участвуют в развитии защитных ответов растений к вирусам и патогенам [2, 35]. Было показано участие *DCL4* в развитии устойчивости растений табака *Nicotiana attenuata* к личинкам табачного бражника *Manduca sexta* [34], а бахчевая тля *Aphis gossypii* индуцировала экспрессию генов всех классов *DCL* у растений хлопчатника, в том числе генов *DCL2* и *DCL4*, причем содержание транскриптов гена *DCL2* было в шесть раз больше у устойчивого сорта, чем у восприимчивого [36]. В данной работе черемуховая тля индуцировала накопление мРНК гена *DCL2*, но не *DCL4* (см. рисунок 2). Обработка всеми изученными бактериальными штаммами и изолятами индуцировала повышение транскриптов обоих генов *DCL2* и *DCL4*, но *DCL2* в большей степени, что можно связать с развитием устойчивости растений к тле [36]. Наши результаты согласуются с недавно полученными данными на мутантах *Arabidopsis thaliana dcl1-9*, дефектных по синтезу *DCL*-белков о том, что для индукции устойчивости в растениях бактериальному штамму *Bacillus cereus* AR156 требовались белки *DCL* [26]. В некоторых работах была показана чувствительность *DCL2* к салициловой кислоте и этилену при развитии устойчивости к вирусной инфекции [2, 37], а в промоторной области генов *DCL2*, *DCL3* и *DCL4* хлопчатника были обнаружены чувствительные элементы к фитогормонам этилену, гиббереллинам и метилжасмонату [36]. Как показали наши результаты, изученные бактерии запускали в растениях системную индуцированную устойчивость по салицилат-, этилен- или жасмонат/этилен-сигнальным путям.

Роль белков *AGO* в развитии иммунных реакций растений хорошо изучена при вирусной, бактериальной и грибной инфекции [14]. Мутанты *ago1* с потерей функции показывали уменьшение устойчивости к бактериальным патогенам, а мутанты *ago1-27* проявляли повышенную устойчивость к заражению грибковыми патогенами *Verticillium dahlia* и *Botritis cinerea* [14]. Было показано участие *AGO1* в индукции биосинтеза глюкозинолата, ингибирующего питание персиковой тли на растениях *A. thaliana* [38]. Полагают, что *AGO1* является основным регулятором всех путей защиты растений [39]. Так, на мутантах *ago1-27* бактериальный штамм *B. cereus* AR156 не мог индуцировать защитные реакции против бактериальной инфекции [26]. Экспрессия гена *AGO1* индуцируется как жасмонат-сигнальным путем, так и салицилат- и этилен-сигнальными путями [14, 39]. В данной работе черемуховая тля слабо индуцировала экспрессию гена *AGO1* в растениях пшеницы, а бактериальные штаммы и изоляты, за исключением штамма *B. subtilis* 11ВМ, значительно повышали транскрипцию этого

гена. В большей степени увеличивали содержание мРНК гена *AGO1* бактерии, которые индуцировали салицилат- и этилен-сигнальные пути – *B. subtilis* 26Д, *Bacillus sp.* Tas8.2 и *Bacillus sp.* Tas1, и в меньшей степени бактерии, которые индуцировали жасмонат- и этилен-сигнальные пути – *B. thuringiensis* B-6066 и *B. thuringiensis* B-5351 (см. рисунок 2).

Напротив, индукцию экспрессии гена *AGO2* активировали только три бактерии – *B. subtilis* 26Д, *Bacillus sp.* Tas8.2 и *Bacillus sp.* Tas1, которые индуцировали салицилат- и этилен-сигнальные пути (см. рисунок 2), что согласуется с литературными данными. Так, была выявлена важная роль белка *AGO2* и *miR393b** при индукции устойчивости растений *A. thaliana* к бактерии *Pseudomonas syringae*, проявляющейся в замалчивании синтеза белка MEMB12, что приводило к усилению секреции патоген-индуцируемого белка PR-1 маркера – сигнального пути салициловой кислоты в апопласт и повышению устойчивости растений к бактерии [2]. Также показано влияние этиленового сигнального пути на повышение экспрессии гена *AGO2* при развитии устойчивости к вирусной инфекции [37].

Белки *AGO4* – наиболее изученные *AGO* в пути РНК-направленного метилирования ДНК при формировании устойчивости растений к бактериальным патогенам [14]. Экспрессия *AGO4* подавлялась в ответ на бактериальную инфекцию или обработку флагеллином *flg22*, что впоследствии снижало метилирование ДНК в локусах защитных генов [14]. Кроме того, мутанты по гену *ago4* оказывались восприимчивыми к вирусной и грибковой инфекции, причем замалчивание синтеза *AGO4* нарушало работу сигнального пути жасмоновой кислоты [34]. Недавно было показано, что у мутантов *ago4* с нарушенной функцией РНК-направленного метилирования ДНК снижалась экспрессия транскрипционных факторов этиленового сигнального пути из семейства ERF, участвующих в защитном ответе растений *A. thaliana* при заселении персиковой тлей *Myzus persicae* [40]. Однако биологические функции *AGO4* сложны и требуют дальнейшего изучения [34]. В данной работе экспрессию гена *AGO4* у растений пшеницы индуцировала черемуховая тля, но обработка бактериями влияла на транскрипцию этого гена гораздо сильнее, что, скорее всего, можно связать с развитием устойчивости к тле и активацией бактериями этиленового сигнального пути (см. рисунок 2). Так, недавно было показано, что для активации этиленового сигнального пути требуется метилирование генов, контролирующих синтез этилена, передачу сигналов в цитоплазме и ядре и ответ на стрессовые факторы [41].

Предположительно в процессе активации механизма РНК-интерференции у растений при бактериальной обработке участвуют метаболиты бактерий, такие как липопептиды. Мутантный штамм *B. amyloliquefaciens* FZB42ΔsfpΔalss с подавленным синтезом сурфактина был не способен запускать системную индуцированную устойчивость в растениях *A. thaliana* к *Pseudomonas syringae* и не влиял на экспрессию микроРНК, ассоциированных с защитой, в отличие от материнского штамма *B. amyloliquefaciens* FZB42 [25]. В нашей работе штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* B-5351 и изоляты *Bacillus sp.* Tas1 и *Bacillus sp.* Tas8.2, больше всего влияющие на экспрессию генов *AGO* и *DCL*, продуцировали сурфактин, а штамм *B. thuringiensis* B-6066 – фенгицин [21, 29]. Изучение роли сурфактина в индукции РНК-интерференции у растений станет предметом наших дальнейших исследований.

Выводы

Таким образом, изученные в нашей работе эндофитные липопептид-синтезирующие штаммы и изоляты *Bacillus spp.*, опосредованно через растения увеличивали смертность черемуховой тли *R. padi* на 17–48 % и повышали толерантность растений к тле, увеличивая рост листа на 19–26 % по сравнению с необработанными заселенными тлей растениями. Наибольший опосредованный эффект на смертность тли оказали штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* B-6066, *B.*

thuringiensis B-5351 и изолят *Bacillus sp.* Tas8.2. Однако эти бактерии активировали системную индуцированную устойчивость, регулируя работу разных гормональных сигнальных путей. Обработка бактериями *B. subtilis* 26Д и *Bacillus sp.* Tas8.2 индуцировала этилен- и салицилат-сигнальные пути, а обработка бактериями *B. thuringiensis* B-6066 и *B. thuringiensis* B-5351 – жасмонат- и этилен-сигнальные пути защиты у растений пшеницы, заселенных черемуховой тлей. При этом сигнальный путь этилена у них был общим. Также наши результаты показали, что бактериальные штаммы и изоляты регулировали активацию системной устойчивости к черемуховой тле *R. padi* через механизм РНК-интерференции. Обработка растений бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д или изолятом *Bacillus sp.* Tas8.2 приводила к значительному накоплению мРНК всех пяти изученных генов: *AGO1*, *AGO2*, *AGO4*, *DCL2* и *DCL4*. Обработка растений штаммами *B. thuringiensis* B-6066 и *B. thuringiensis* B-5351 увеличивала содержание мРНК генов *AGO1*, *AGO4* и *DCL2*. В большей степени три бактериальных штамма и изолят влияли на экспрессию генов *AGO4* и *DCL2*, повышая ее в 30 и 12–14 раз соответственно по сравнению с контролем. Из результатов следует, что сигнальный путь этилена, ферменты *AGO4* и *DCL2* играют важную роль в индукции устойчивости пшеницы к черемуховой тле *R. Padi*, опосредованной бактериальными штаммами *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* B-6066, *B. thuringiensis* B-5351 и изолятом *Bacillus sp.* Tas8.2. Таким образом, изученные в данной работе бактериальные штаммы и изоляты являются перспективными кандидатами для создания эффективных биопрепаратов для защиты растений и повышения урожая. Наша работа является первой, в которой показана способность липопептид-синтезирующих бактерий активировать системную индуцированную устойчивость против насекомых через механизм РНК-интерференции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-76-00056.

Литература/References

1. Miljakovic D., Marinkovic J., Balešević-Tubić S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8. Art. No. 1037. DOI: 10.3390/microorganisms8071037.
2. Максимов И. В., Шейн М. Ю., Бурханова Г. Ф. РНК-интерференция в защите растений от грибной и оомицетной инфекции // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 3. С. 219–234. DOI: 10.31857/S0555109923030133. [Maksimov I. V., Shein M. Yu., Burkhanova G. F. RNA interference in plant protection from fungal and oomycete infection // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2023. Vol. 58. No. 1. P. 16–31. DOI: 10.1134/S0003683822100106].
3. Rana K. L., Kour D., Kaur T., Devi R., Yadav A. N., Yadav N., Dhaliwal H. S., Saxena A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2020. Vol. 113(8). P. 1075–1107. DOI: 10.1007/s10482-020-01429-y.
4. Xia Y., Liu J., Chen C., Mo X., Tan Q., He Y., Wang Z., Yin J., Zhou G. The multifunctions and future prospects of endophytes and their metabolites in plant disease management // *Microorganisms*. 2022. Vol. 23. Art. No. 1072. DOI: 10.3390/microorganisms10051072.
5. Singh B., Simon A., Halsey K., Kurup S., Clark S., Aradottir G. I. Characterisation of bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) behaviour and aphid host preference in relation to partially resistant and susceptible wheat landraces // *Ann. Appl. Biol.* 2020. Vol. 177(2). P. 184–194. DOI: 10.1111/aab.12616.
6. Radchenko E. E., Abdullaev R. A., Anisimova I. N. Genetic resources of cereal crops for aphid resistance // *Plants*. 2022. Vol. 11. Art. No. 1490. DOI: 10.3390/plants11111490.
7. Morkunas I., Mai V. C., Gabrys B. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding // *Acta Physiol. Plant.* 2011. Vol. 33. No. 6. P. 2057–2073. DOI: 10.1007/s11738-011-0751-7.
8. Koch K. G., Chapman K., Louis J., Heng-Moss T., Sarath G. Plant tolerance: a unique approach to control hemipteran pests // *Front. Plant Sci.* 2016. Vol. 7. Art. No. 1363. DOI: 10.3389/fpls.2016.01363.
9. Pieterse C. M., Zamioudis C., Berendsen R. L., Weller D. M., van Wees S. C., Bakker P. A. Induced systemic resistance by beneficial microbes // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014. Vol. 52. P. 347–375. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
10. Yu Y., Gui Y., Li Z., Jiang C., Guo J., Niu D. Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes // *Plants*. 2022. Vol. 11. Art. No. 386. DOI: 10.3390/plants11030386.

11. Conrath U., Beckers G. J., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M. A., Pieterse C. M., Poinssot B., Pozo M. J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B. Priming: getting ready for battle // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006. Vol. 19. P. 1062–1071. DOI: 10.1094/MPMI-19-1062.
12. Tiwari M., Pati D., Mohapatra R., Sahu B. B., Singh P. The impact of microbes in plant immunity and priming induced inheritance: a sustainable approach for crop protection // *Plant Stress.* 2022. Vol. 4. Art. No. 100072. DOI: 10.1016/j.stress.2022.100072.
13. Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // *Генетика.* 2006. Т. 42. № 9. С. 1186–1199. [Vanyushin B. F. DNA methylation and epigenetics // *Russian Journal of Genetics.* 2006. Vol. 42. No. 9. P. 985–997. DOI: 10.1134/S1022795406090055].
14. Huang Ch.-Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H. Small RNAs – big players in plant-microbe interactions // *Cell Host Microbe.* 2019. Vol. 26. P. 173–182. DOI: 10.1016/j.chom.2019.07.021.
15. Третьякова П. Я., Соловьев А. А. Малые РНК в защите растений от болезней // *Экологическая генетика.* 2020. Т. 18. № 4. С. 467–481. DOI: 10.17816/ecogen35203. [Tretiakova P. Y., Soloviev A. A. Application of small RNAs for plant protection // *Ecological genetics.* 2020. Vol. 18. No. 4. P. 467–481. DOI: 10.17816/ecogen35203].
16. Dubrovina A. S., Kiselev K. V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. Art. No. 2282. DOI: 10.3390/ijms20092282.
17. Zhu Q-H., Shan W-X., Ayliffe M. A., Wang M. B. Epigenetic mechanisms: an emerging player in plant-microbe interactions // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2016. Vol. 29(3). P. 187–96. DOI: 10.1094/MPMI-08-15-0194-FI.
18. Rashid M. H., Chung Y. R. Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes // *Front. Plant Sci.* 2017. Vol. 8. Art. No. 1816. DOI: 10.3389/fpls.2017.01816.
19. Serteyn L., Quaghebeur C., Ongena M., Cabrera N., Barrera A., Molina-Montenegro M. A., Francis F., Ramírez C. C. Induced systemic resistance by a plant growth-promoting rhizobacterium impacts development and feeding behavior of aphids // *Insects.* 2020. Vol. 11. Art. No. 234. DOI: 10.3390/insects11040234.
20. Rashid M. H., Kim H.-J., Yeom S.-I., Yu H.-A., Manir M. M., Moon S.-S., Kang Y. J., Chung Y. R. *Bacillus velezensis* YC7010 enhances plant defenses against brown planthopper through transcriptomic and metabolic changes in rice // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9. Art. No. 1904. DOI: 10.3389/fpls.2018.01904.
21. Rummyantsev S. D., Alekseev V. Y., Sorokan A. V., Burkhanova G. F., Cherepanova E. A., Garafutdinov R. R., Maksimov I. V., Veselova S. V. Additive effect of the composition of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on systemic resistance of wheat against greenbug aphid *Schizaphis graminum* due to lipopeptides // *Life.* 2023. Vol. 13. Art. No. 214. DOI: 10.3390/life13010214.
22. Argandona V. H., Chaman M., Cardemil L., Munoz O., Zuniga G. E., Corcuera L. J. Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley // *J. Chem. Ecol.* 2001. Vol. 27. P. 53–68. DOI: 10.1023/a:1005615932694.
23. Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. Draft genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a putative 41.9-kDa insecticidal toxin // *Toxins.* 2014. Vol. 6. P. 1490–1504. DOI: 10.3390/toxins6051490.
24. Tunsagool P., Leelasuphakul W., Jaresitthikunchai J., Phaonakrop N., Roytrakul S., Jutidamrongphan W. Targeted transcriptional and proteomic studies explicate specific roles of *Bacillus subtilis* iturin A, fengycin, and surfactin on elicitation of defensive systems in mandarin fruit during stress // *PLoS ONE.* 2019. Vol. 14. Art. No. e0217202. DOI: 10.1371/journal.pone.0217202.
25. Xie S., Jiang H., Ding T., Xu Q., Chai W., Cheng B. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 represses plant miR846 to induce systemic resistance via a jasmonic acid-dependent signalling pathway // *Molecular Plant Pathology.* 2018. Vol. 19(7). P. 1612–1623. DOI: 10.1111/mpp.12634.
26. Wang S., Zheng Y., Gu C., He C., Yang M., Zhang X., Guo J., Zhao H., Niu D. *Bacillus cereus* AR156 activates defense responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis thaliana* similarly to flg22 // *MPMI.* 2018. Vol. 31. No. 3. P. 311–322. DOI: 10.1094/MPMI-10-17-0240-R.
27. Веселова С. В., Бурханова Г. Ф., Румянцев С. Д., Благова Д. К., Максимов И. В. Бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 1. С. 56–63. DOI: 10.1134/S0555109919010185. [Veselova S. V., Burkhanova G. F., Rummyantsev S. D., Blagova D. K., Maksimov I. V. Strains of *Bacillus* spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2019. Vol. 55. No. 1. P. 41–47. DOI: 10.1134/S0003683819010186].
28. Maksimov I. V., Blagova D. K., Veselova S. V., Sorokan A. V., Burkhanova G. F., Cherepanova E. A., Sarvarova E. R., Rummyantsev S. D., Alekseev V. Yu., Khayrullin R. M. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene BtcryIIa encoding CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. // *Biol. Control.* 2020. Vol. 144. Art. No. 104242. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104242.
29. Веселова С. В., Сорокань А. В., Бурханова Г. Ф., Румянцев С. Д., Алексеев В. Ю., Черепанова Е. А., Максимов И. В. Бактерии рода *Bacillus* как перспективный источник для создания

биопрепаратов от патогенов и вредителей сельскохозяйственных культур // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2022. № 4(97). С. 40-45. DOI: 10.21515/1999-1703-97-40-45. [Veselova S. V., Sorokan A. V., Burkhanova G. F., Rummyantsev S. D., Alekseev V. Yu., Cherepanova E. A., Maksimov I. V. Bacteria of the genus *Bacillus* as a promising source for the creation of biological control agents against pathogens and pests of agricultural crops // Proceedings of the Kuban State Agrarian University. 2022. No. 4(97). P. 40-45. DOI: 10.21515/1999-1703-97-40-45].

30. Denoirjean T., Ameline A., Couty A., Dubois F., Coutte F., Doury G. Effects of surfactins, *Bacillus* lipopeptides, on the behavior of an aphid and host selection by its parasitoid // Pest Manag. Sci. 2022. Vol. 78. P. 929–937. DOI: 10.1002/ps.6702.

31. Wu C., Avila C. A., Goggin F. L. The ethylene response factor Pti5 contributes to potato aphid resistance in tomato independent of ethylene signaling // J. Exp. Bot. 2015. Vol. 66. P. 559–570. DOI: 10.1093/jxb/eru472.

32. Zebelo S., Song Y., Kloepper J. W., Fadamiro H. Rhizobacteria activates (+)- δ -cadinenine synthase genes and induces systemic resistance in cotton against beet armyworm (*Spodoptera exigua*) // Plant Cell Environ. 2016. Vol. 39. P. 935–943. DOI: 10.1111/pce.12704.

33. Pineda A., Zheng S. J., van Loon J. J. A., Dicke M. Rhizobacteria modify plant–aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility // Plant Biology. 2012. Vol. 14. No. 1. P. 83–90. DOI:10.1111/j.1438-8677.2011.00549.x.

34. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I. T., Pandey S. P. Argonaute4 modulates resistance to *Fusarium brachygybosum* infection by regulating jasmonic acid signaling // Plant Physiology. 2020. Vol. 184. P. 1128–1152. DOI: 10.1104/pp.20.00171.

35. Cai Q., Qiao L., Wang M., He B., Lin F.-M., Palmquist J., Huang S.-D., Jin H. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes // Science. 2018. Vol. 360(6393). P. 1126–1129. DOI: 10.1126/science.aar4142.

36. Moura M. O., Fausto A. K. S., Fanelli A., Guedes F. A. de F., Silva T. da F., Romanel E., Vaslin M. F. S. Genome-wide identification of the Dicer-like family in cotton and analysis of the DCL expression modulation in response to biotic stress in two contrasting commercial cultivars // BMC Plant Biology. 2019. Vol. 19. Art. No. 503. DOI: 10.1186/s12870-019-2112-4.

37. Sun D., Nandety R. S., Zhang Y., Reid M. S., Niu L., Jiang C.-Z. A petunia ethylene-responsive element binding factor, *PhERF2*, plays an important role in antiviral RNA silencing // Journal of Experimental Botany. 2016. Vol. 67. No. 11. P. 3353–3365. DOI: 10.1093/jxb/erw155.

38. Westwood J. H., Groen S. C., Du Z., Murphy A. M., Anggoro D. T., Tungadi T., Luang-In V., Lewsey M. G., Rossiter J. T., Powell G., Smith A. G., Carr J. P. A trio of viral proteins tunes aphid–plant interactions in *Arabidopsis thaliana* // PLoS ONE. 2013. Vol. 8(12). Art. No. e83066. DOI: 10.1371/journal.pone.0083066.

39. Mason G. A., Lemus T., Queitsch C. The mechanistic underpinnings of an *ago1*-mediated, environmentally dependent, and stochastic phenotype // Plant Physiology. 2016. Vol. 170. P. 2420–2431. DOI: 10.1104/pp.15.01928.

40. Annacondia M. L., Markovic D., Reig-Valiente J. L., Scaltsoyiannes V., Pieterse C. M. J., Ninkovic V., Slotkin R. K., Martinez G. Aphid feeding induces the relaxation of epigenetic control and the associated regulation of the defense response in *Arabidopsis* // New Phytologist. 2021. Vol. 230. P. 1185–1200. DOI: 10.1111/nph.17226.

41. Jiang Y., Zhang S., Chen K., Xia X., Tao B., Kong W. Impacts of DNA methylases and demethylases on the methylation and expression of *Arabidopsis* ethylene signal pathway genes // Functional & Integrative Genomics. 2023. Vol. 23. Art. No. 143. DOI: 10.1007/s10142-023-01069-1.

UDC 632/633/635-2

Rummyantsev S. D., Alekseev V. Yu., Shein M. Yu., Veselova S. V., Burkhanova G. F., Maksimov I. V.

THE ROLE OF *BACILLUS SPP.* IN THE INDUCTION OF HORMONAL SIGNALING PATHWAYS AND MECHANISM OF RNA INTERFERENCE DURING FORMATION DEFENSIVE RESPONSE OF WHEAT PLANTS AGAINST *RHOPALOSIPHUM PADI* (L.)

Summary. *To date, an urgent task is to search for new promising endophytic plant growth–promoting bacteria (PGPB) and to study the mechanisms of their action in the development of immunity against pests associated with priming and activation of the RNA interference (RNAi) system. In this regard, the aim of our work was to study the effect of several strains and isolates of endophytic bacteria of the genus Bacillus on the triggering of*

induced systemic resistance (ISR) and activation of the components of the RNAi system in wheat plants colonized by the bird cherry-oat aphid (Rhopalosiphum padi L.). The research was carried out in the laboratory of the Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences between August 2022 and April 2023. In this work, we studied four strains of endophytic bacteria Bacillus subtilis 26D, B. subtilis 11BM, B. thuringiensis B-6066, B. thuringiensis B-5351 and two isolates Bacillus sp. Tas-1 and Tas-8.2 obtained from the internal tissues of wheat plants. All studied strains and isolates of Bacillus spp. indirectly, through plants, increased the mortality of R. padi by 17–48 % and enhanced plant tolerance against aphids raising leaf growth by 19–26 % compared to untreated aphid-infested plants. Comparative assessment of the pattern of the transcriptional activity of genes encoding defensive proteins – markers of salicylate, ethylene and jasmonate signaling pathways (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9) and genes of the RNA interference system AGO1, AGO2, AGO4, DCL2 and DCL4 was carried out by real-time polymerase chain reaction (PCR). It was shown that the bacteria activated ISR by regulating various hormonal signaling pathways, but we should note that ethylene signaling pathway was common to all of them. To a greater extent, the bacteria influenced the expression of the AGO4 and DCL2 genes, increasing it by 30 and 12–14 times, respectively, compared with the control figures. It follows from the results that the ethylene signaling pathway, as well as AGO4 and DCL2 enzymes play an important role in the induction of wheat resistance against the bird cherry-oat aphid mediated by bacterial strains B. subtilis 26D, B. thuringiensis B-6066, B. thuringiensis B-5351 and Bacillus sp. Tas8.2 isolate.

Keywords: *Bacillus spp., Rhopalosiphum padi L., hormonal signaling pathways, plant protection, RNA interference, induced systemic resistance, endophytes, ethylene.*

Румянцев Сергей Дмитриевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномики растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 71; e-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru.

Алексеев Валентин Юрьевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии и иммунологии Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 71; e-mail: valentin-1994@yandex.ru.

Шейн Михаил Юрьевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии и иммунологии Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 71; e-mail: mikeshenoda@yandex.ru.

Веселова Светлана Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 71; e-mail: veselova75@rambler.ru.

Бурханова Гузель Фанилевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 71; e-mail: guzel_mur@mail.ru.

Максимов Игорь Владимирович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 71; e-mail: igor.mak2011@yandex.ru.

Rumyantsev Sergey Dmitrievich, Cand. Sc. (Biol.), researcher at the Laboratory of plant genomics of the Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 71, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru.

Alekseev Valentin Yurievich, junior researcher at the Laboratory of molecular pharmacology and immunology of the Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 71, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: valentin-1994@yandex.ru.

Shein Mikhail Yurievich, junior researcher at the Laboratory of molecular pharmacology and immunology of the Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 71, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: mikeshenoda@yandex.ru.

Veselova Svetlana Viktorovna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of biochemistry of plant immunity of the Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 71, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: veselova75@rambler.ru.

Burkhanova Guzel Fanilevna, Cand. Sc. (Biol.), researcher at the Laboratory of biochemistry of plant immunity of the Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 71, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: guzel_mur@mail.ru.

Maksimov Igor Vladimirovich, Dr. Sc. (Biol.), professor, chief researcher at the Laboratory of biochemistry of plant immunity of the Institute of Biochemistry and Genetics – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 71, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: igor.mak2011@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию – 19.06.2023.

Дата принятия к печати – 19.07.2023.