

На правах рукописи



ЛАСТОЧКИНА ОКСАНА ВЛАДИМИРОВНА

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ
К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ ЭНДОФИТНЫМИ
БАКТЕРИЯМИ *Bacillus subtilis* Cohn**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Уфа – 2026

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам Института биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук и на кафедре биохимии, биотехнологии и физиологии ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий»

Официальные оппоненты: Кузнецов Виктор Васильевич

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Казнина Наталья Мстиславовна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений, заместитель директора по научной работе Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»

Маркова Юлия Александровна

доктор биологических наук, заведующий лабораторией растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Защита диссертации состоится «17» ноября 2026 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.479.01, созданного на базе ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий» по адресу: 450008, г. Уфа, ул. К. Маркса, 12, e-mail: dis-bio-uust@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», адрес сайта: <http://www.uust.ru>

Автореферат разослан « » июля 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н

Григориади Анна Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В естественной среде обитания растительные организмы подвергаются различным абиотическим стрессам, в большинстве случаев вызывающим дефицит влаги и негативно влияющим на рост и развитие агрокультур по всему миру, что приводит к значительным потерям урожая и качества продукции (FAO, 2021; 2022; Asseng et al., 2019; Zandalinas et al., 2022). Проблема устойчивости многие годы занимает одно из центральных мест в физиологии и биохимии растений. Нарушая метаболизм на физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях, абиотические стрессы препятствуют прорастанию семян, росту растений, приводят к повреждению клеточных компартментов, деградации белков, инактивации ферментов, снижению поглощения питательных веществ, транспирации и фотосинтеза, закрытию устьиц, торможению роста, увяданию и высыханию (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020; Jiang et al., 2025). Растения развивают широкий спектр защитно-приспособительных механизмов, но их оказывается недостаточно для противодействия стрессам, частота и продолжительность которых в условиях глобального изменения климата возрастает ежегодно (Ahmad et al., 2018; Farooqi et al., 2020). Согласно прогнозам, интенсивность засух будет увеличиваться, что в сочетании с ростом населения планеты усугубляет проблему и требует безотлагательного решения для предотвращения продовольственной катастрофы (FAO, 2022).

Степень разработанности темы. На протяжении всего жизненного цикла растения живут в тесной связи с разнообразной микробиотой, и применение полезных ростстимулирующих бактерий (PGP-бактерий, Plant Growth-Promoting Bacteria) рассматривается как природная стратегия повышения их адаптивного потенциала и стресс-устойчивости (Glick, 2020; Velloso et al., 2021; Chukwudi et al., 2025). В литературе имеется немало данных о повышении под влиянием PGP-бактерий устойчивости агрокультур к широкому спектру стрессовых воздействий (Maksimov et al., 2020; Sood et al., 2020; Lyu et al., 2021; Rashid et al., 2022; Anand et al., 2023; Pusenkova et al., 2023; Soltani et al., 2023; Garipova et al., 2024; Chebotar et al., 2024; Shaymullina et al., 2024). Результатам изучения разнообразных механизмов микроб-индуцированной устойчивости (MIST, Microbe Induced Systemic Tolerance) растений посвящены многочисленные экспериментальные работы и обзорные статьи (Максимов и др., 2011; Miljakovic et al., 2020; Diniz et al., 2025). Их анализ показывает, что PGP-бактерии, колонизируя внешние (эктофиты) и/или внутренние (эндофиты) ткани растений, могут прямо и/или опосредованно снижать негативное воздействие фитопатогенов эффективно конкурируя за пространство и питательные вещества (Максимов и др., 2020; Kumar et al., 2021), улучшать поглощение растениями воды и минеральное питание (Sessitsch et al., 2012; Бровко и др., 2014; Danish et al., 2019; Hussain et al., 2020), фотосинтез и водный обмен (Naqqash et al., 2020; Ramandi et al., 2024), синтезировать широкий спектр различных биоактивных компонентов и защитных соединений с антибиотическими (Cherepanova et al., 2021; Румянцев и др., 2024), фитогормон-подобными (Dodd et al., 2010; Kudoyarova et al., 2019; Singh et al., 2022; Chebotar et al., 2024), осморегуляторными, антиоксидантными (Dobbelaere et al., 1999; Cassan et al., 2001; Kumar et al., 2016; Saha et al., 2016; Çakmakçı et al., 2017; Ilyas et al., 2020; Rashid et al., 2021) свойствами; все это приводит к индукции каскада защитных реакций растений и формированию системной стресс-устойчивости (Van Loon, 2007; Pieterse et al., 2014; Maksimov, Khairullin, 2016; Bukhat et al., 2020; Blake et al., 2021; Lyu et al., 2021). Вышеперечисленные эффекты регулируются сложным набором специфичных, множественных и взаимосвязанных механизмов, многие из которых остаются неясными и нуждаются в специальном исследовании (Niu et al., 2011; Rolli et al., 2014; Pandey et al., 2017; Abd El-Daim et al., 2019; Anand et al., 2023). Вместе с тем эффективность действия PGP-бактерий часто варьируется в зависимости от множества факторов (включая свойства бактерий, спектр синтезируемых ими соединений, виды стрессов и растений, их эколого-географическое происхождение, генетические и сортовые особенности и др.) (Mađry et al., 2013; Volis et al., 2015; Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Пусенкова и др., 2020; Kolesnikov et al., 2023; Garipova et al., 2024), чем ограничивается их внедрение в практику. При долгосрочных стрессовых воздействиях более эффективными могут быть эндофитные спорообразующие PGP-бактерии *Bacillus subtilis*, колонизирующие внутренние ткани растений и

положительно влияющие на общий метаболизм изнутри – к тому же общепризнанные безопасными (GRAS, Generally Recognized as Safe) для пищевой промышленности (Harwood et al., 1992; Martinez, 2013; Su et al., 2020).

Несмотря на широкие исследования роли PGP-бактерий в стимулировании роста, их влияние на адаптацию и устойчивость растений к абиотическим стрессам (засуха, засоление, токсичные загрязнители и т.д.) и их комбинациям приобретает все большее значение (Lastochkina, Bosacchi, 2023; Oyedoh et al., 2025). Для успешной реализации технологии применения эндофитных PGP-бактерий *B. subtilis*, как воспроизводимого подхода, необходимо развивать более глубокое понимание многих фундаментальных биохимических, физиологических и молекулярных механизмов их взаимодействия с растениями в стрессовых условиях. Важное место занимают вопросы о взаимосвязи путей передачи сигналов при регуляции физиологических процессов у растений, различающихся по стратегии адаптации к обезвоживанию, включая растения пшеницы лесостепного западносибирского (ЛСЗ) и степного волжского (СВ) агроэкологических групп (экотипов), представляющих, соответственно, Западную Сибирь и Поволжье – крупнейшие регионы-производители яровой пшеницы в России (Жуковский 1957; Цыганков 2011; Мухитов, Самуилов 2014). Хотя в последнее время уделяется внимание сопоставлению эффектов PGP-бактерий на разных сортах культурных растений, в т.ч. при абиотических стрессах (Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Маркова и др., 2023), тем не менее сведения по сходствам и различиям действия эндофитных *B. subtilis* на растения пшеницы с различными стратегиями адаптации к засухе отсутствовали к моменту начала нашей работы, а данные о сигнальных путях, запускаемых ими при абиотических стрессах (и их комбинациях), носили фрагментарный характер. Важную роль играет раскрытие особенностей влияния эндофитных PGP-бактерий на баланс фитогормонов у подвергнутых стрессу растений; функционирование компонентов антиоксидантной системы и аскорбат-глутатионового (AsA-GSH) цикла в поддержании редокс-статуса; фотосинтетическую деятельность (в т.ч. фотохимическую активность, параметры флуоресценции хлорофилла, состояние устьиц); барьерные свойства клеточных стенок корней и выявление взаимосвязи с колонизацией бактериями внутренних тканей растений. Кроме того, остается неясным, чем обусловлены вариации в успешности колонизации бактериями тканей разных растений-хозяев и формирование у них стресс-толерантных свойств в неблагоприятных условиях произрастания. Неизученным является участие гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) как возможной сигнальной молекулы в индуцированной эндофитными PGP-бактериями *B. subtilis* адаптации и устойчивости растений. Мало известно о влиянии эндофитных *B. subtilis* на качество (биохимический состав) растительной продукции, что также требует пристального внимания.

За последнее десятилетие секвенирование генома стало широко применяться для изучения устойчивости бактерий, однако, в отношении раскрытия фундаментальных основ эффективного взаимодействия растений и PGP-бактерий при стрессах исследования фрагментарны (Rodríguez et al., 2022; Afordoanyi et al., 2023; Narayanasamy et al., 2023). Детальный анализ и функциональная аннотация геномов PGP-бактерий необходимы для понимания молекулярных механизмов стимулирования роста и устойчивости растений в стрессовых условиях, а также оценки возможности прогнозирования эффективности новых изолятов для таргетного использования в целях повышения устойчивости растений в экстремальных условиях произрастания. Четкое понимание механизмов действия эндофитных PGP-бактерий чрезвычайно важно для полного использования их потенциала в качестве биоинокулянтов, обеспечивающих устойчивую продуктивность растениеводства и защиту агрокультур от доминирующих стрессов среды, в большинстве случаев, вызывающих обезвоживание, что особенно актуально в условиях меняющегося климата. Запланированные в настоящей работе исследования лежат в русле современных мировых тенденций, и впервые исследовано влияние эндофитных *B. subtilis* на ранее не изученные физиолого-биохимические и молекулярные механизмы адаптации растений, в т.ч. пшеницы с контрастными стратегиями засухоустойчивости, а также установлены связи между геномным потенциалом бактерий и их фенотипическими проявлениями на разных растениях-хозяевах в нормальных и стрессовых условиях произрастания.

Цель данной работы заключалась в комплексном изучении физиолого-биохимических и молекулярных механизмов регуляции устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам при инокуляции эндофитными бактериями *B. subtilis* (на примере штамма 10-4).

В связи с намеченной целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести комплексную оценку влияния инокуляции семян эндофитными бактериями *B. subtilis* на фенотип агрокультур и выявить основные физиолого-биохимические параметры их устойчивости к стресс-факторам различной природы.

2. Изучить морфолого-физиологические и биохимические механизмы ответных реакций к дефициту влаги у контрастных по стратегии адаптации к засухе экотипов мягкой пшеницы (лесостепного западносибирского и степного волжского) на инокуляцию эндофитными *B. subtilis*.

3. Исследовать участие эндогенных фитогормонов (АБК, ЦК, ИУК, СК) в регуляции эндофит-опосредованной устойчивости к водному дефициту у контрастных по стратегии адаптации к засухе растений пшеницы в сочетании с оценкой компонентов клеточных стенок корней (лигнин, суберин).

4. Провести сравнительный анализ влияния дефицита влаги и эндофитных *B. subtilis* на параметры фотосинтетического аппарата у контрастных по стратегии адаптации к засухе растений пшеницы.

5. Проанализировать биохимические характеристики компонентов аскорбат-глутатионового (AsA-GSH) комплекса антиоксидантной системы защиты и выявить их возможный вклад в вызываемую эндофитными *B. subtilis* стабилизацию редокс-статуса и устойчивость к водному дефициту у контрастных по адаптивным стратегиям растений пшеницы.

6. Исследовать способность эндофитных *B. subtilis* оказывать пролонгированный защитный эффект (включая возможное участие ГАМК) на морфолого-физиологические и биохимические показатели контрастных по стратегии адаптации растений пшеницы в условиях комбинированного стресса (гербицид+почвенная засуха) и в пост-стрессовый период, и оценить влияние инокуляции на продукционные параметры и биохимический состав зерна.

7. Провести полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ генома штамма эндофита *B. subtilis* 10-4 для выявления генетических детерминант проявления функционально важных его свойств, связанных с формированием эффективных взаимодействий с растениями, стимуляцией роста и стресс-устойчивостью на уровне фенотипа агрокультур.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые проведено комплексное изучение влияния эндофитных *B. subtilis* (на примере штамма 10-4) при воздействии дефицита влаги на гормональный статус, AsA-GSH цикл, состояние ФСII фотосинтетического аппарата, морфологию устьиц, водный обмен, компоненты клеточной стенки (лигнин, суберин), ГАМК у контрастных по стратегии адаптации к засухе растений пшеницы. Проведен анализ полного генома штамма *B. subtilis* 10-4 и выявлены генетические детерминанты проявления заложенных на геномном уровне функционально-полезных его свойств на уровне фенотипа растений-хозяев в нормальных и стрессовых условиях.

Выявлено, что общие (универсальные) защитные реакции растений, индуцируемые эндофитными *B. subtilis* в условиях обезвоживания, засоления, токсического действия Cd, комбинации обезвоживания с инфицированием возбудителем фузариоза и гербицидным прессингом, включают эффективную колонизацию внутренних тканей растений, снижение уровня перекисного окисления липидов, регуляцию уровня пролина, усиление лигнификации клеточных стенок корней и поддержание повышенной фотосинтетической активности, что проявляется в снижении степени повреждающего эффекта стрессов на растительные организмы, и в конечном итоге, предотвращает снижение урожая.

Обнаружены сходства (универсальные механизмы) и различия (специфические эффекты) влияния эндофитных *B. subtilis* на контрастные по стратегии адаптации к засухе экотипы пшеницы (лесостепного западносибирского и степного волжского) в условиях дефицита влаги. Впервые установлено, что ключевую роль в реализации эндофит-индуцированного снижения окислительных повреждений клеток и стабилизации редокс-статуса растений пшеницы на ранних этапах онтогенеза (прорастание-всходы) играют AsA для устойчивого сорта Экада70 и GSH для

чувствительного сорта Салават Юлаев; тогда как на более поздних стадиях развития (кущение) – GR для обоих сортов. Впервые показан стресс-протекторный эффект эндофитных *B. subtilis* на фотохимическую активность ФСII растений пшеницы с контрастными стратегиями адаптации к засухе, проявляющийся в повышении максимального (Fv/Fm) и эффективного Y(II) квантовых выходов, снижении квантового выхода нерегулируемой диссипации энергии (Y(NO)) ФСII, что способствует поддержанию повышенной фотосинтетической деятельности в стрессовых условиях, а в пост-стрессовый период – быстрому восстановлению до контрольных значений.

Впервые установлено, что опосредованная эндофитом *B. subtilis* 10-4 устойчивость контрастных по адаптивным стратегиям растений пшеницы в условиях дефицита влаги на ранних стадиях онтогенеза связана с предотвращением резкого сдвига в балансе ИУК/АБК и поддержанием повышенного уровня ЦК. Ростстимулирующий эффект обусловлен быстрым 1,5-кратным (для чувствительного сорта) и 2-кратным (для устойчивого сорта) накоплением ИУК на фоне отсутствия изменений в концентрации ЦК и АБК. Антистрессовый эффект связан с предотвращением стресс-индуцированного снижения содержания ИУК и уменьшением амплитуды сдвигов в балансе АБК/ЦК, с усилением синтеза лигнина и суберина в корнях с максимальными значениями для растений устойчивого сорта Экада70 в сравнении с чувствительным сортом Салават Юлаев.

Впервые с использованием ингибиторного анализа продемонстрирована ключевая роль эндофит (*B. subtilis* 10-4)-индуцированного накопления эндогенной СК как гормонального интермедиата в реализации протекторного действия на растения пшеницы с контрастными стратегиями адаптации в условиях водного дефицита в начальных стадиях вегетации.

Новизной обладают сведения об участии эндогенной ГАМК в опосредованной эндофитными *B. subtilis* адаптации и устойчивости к комбинированному воздействию гербицидного прессинга и засухи растений пшеницы, контрастных по стратегии адаптации к обезвоживанию. Колонизация растений эндофитами *B. subtilis* 10-4 и 26Д способствует повышению базового уровня ГАМК (до стресса) и быстрому ее накоплению при возникновении стресса в сравнении с контролем и ускоренной перестройке растительного метаболизма с усилением генетически заложенных механизмов у растений устойчивого сорта Экада70 и компенсацией недостающих у растений чувствительного сорта Салават Юлаев.

Получены приоритетные данные о пролонгированном защитном эффекте эндофитных *B. subtilis* (10-4, 26Д) на рост и биохимические показатели контрастных по стратегии засухоустойчивости растений пшеницы при комбинированном стрессе (гербицид+засуха), ускоренном их восстановлении в пост-стрессовый период и формировании повышенного урожая зерна с улучшенным аминокислотным, минеральным составом и другими показателями качества.

Впервые выявлены функционально-важные свойства и ключевые гены эндофита *B. subtilis* 10-4, ответственные за проявление на уровне фенотипа растений-хозяев антифунгальной, рострегулирующей и антистрессовой активностей с помощью полногеномного секвенирования, функциональной аннотации и биоинформатического анализа его генома. Проявление ростстимулирующих и антистрессовых свойств *B. subtilis* 10-4 на агрокультуры при разных стрессах детерминирована набором генов, ассоциированных с колонизацией (подвижность, хемотаксис, адгезия, формирование биопленок, синтез ЭПС); с усвоением питательных элементов (N, P, K, S, Fe), синтезом сидерофоров, фитогормонов (ауксины, СК) и других биоактивных соединений (витамин B6, летучие вещества ацетоин, 2,3-бутандиол); с биоконтролем (NRPS-кластеры бацитилина, бацитилаена, субтилозина A, бациллибактина, сурфактина, фенгицина пипастатина, уникальный терпеновый кластер, сакти- и рантипептиды, протеазы, глюканазы); с устойчивостью к абиотическим стрессам, включая гены синтеза осмопротекторов (пролин, глицин бетаин, ГАМК), полиамина спермидина, детоксикации АФК (СОД, глутатион); с регуляцией общих стресс-реакций, клеточной сигнализации и устойчивости к агрессивным условиям среды. Это свидетельствует о широком метаболическом потенциале эндофита *B. subtilis* 10-4 и формировании эффективного взаимодействия с растениями в оптимальных и стрессовых условиях, что подтверждается данными об их влиянии на рост, устойчивость и продуктивность/качество агрокультур.

Практическая значимость. Выявлен ряд общих критериев, характеризующих защитное действие эндофитных *B. subtilis* на физиологию различных агрокультур (сахарная свекла, пшеница, горох, фасоль, картофель) при разнообразных стрессовых воздействиях и их комбинациях (засоление, дефицит влаги, токсические ионы Cd, инфицирование возбудителем альтернариоза, засуха+фузариоз, гербицид+засуха), включающий эффективную колонизацию растений, снижение окислительных и осмотических повреждений клеток, усиление лигнификации корней и поддержание фотосинтеза. Выявленная индукция эндофитом *B. subtilis* 10-4 устойчивости растений пшеницы к водному дефициту, засолению, токсическому действию Cd и комбинированным стрессам (гербицид+засуха, засуха+фузариоз) позволяет отнести этот природный регулятор роста к препаратам с широким спектром защитного действия.

Впервые в комплексном аспекте продемонстрирована реализация детерминированных на геномном уровне функционально-полезных свойств штамма *B. subtilis* 10-4 в фенотипе инокулированных растений в нормальных и стрессовых условиях, что позволяет рассматривать полногеномный анализ в качестве эффективного инструмента для прогнозирования агрономической эффективности новых изолятов. Полученные результаты открывают перспективы для разработки микробных препаратов и интеграции ассоциированных с растениями эндофитных бактерий *B. subtilis* в селекционные программы по созданию климатически устойчивых агрокультур. Полученные сведения вносят вклад в понимание фундаментальных основ взаимодействия эндофитных бактерий *B. subtilis* с растениями пшеницы с контрастными стратегиями адаптации к водному дефициту и могут быть использованы для разработки биоинокулянтов, усиливающих генетически заложенные или компенсирующие недостающие механизмы защиты растений, для внедрения в экологически-ориентированные технологии выращивания культур в разных агроэкологических регионах в условиях меняющегося климата.

Перспективный для практического применения эндофитный штамм *B. subtilis* 10-4 депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (г. Москва) (регистр. номер: В-12988); полногеномная последовательность штамма депонирована в международной базе данных NCBI DDBJ/ENA/GenBank (номер доступа: JAVHKKX000000000, геномный проект ID: PRJNA1008864).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Универсальные (неспецифические) защитные реакции растений, индуцируемые эндофитными *B. subtilis* в условиях дефицита влаги, засоления, токсического действия Cd, комбинированном воздействии обезвоживания с фузариозной инфекцией и гербицидным прессингом, включают эффективную колонизацию внутренних тканей растений, снижение уровня перекисного окисления липидов, регуляцию уровня пролина и поддержание повышенного уровня фотосинтетических пигментов, что проявляется в снижении степени повреждающего эффекта стрессов на растительные организмы, и, в конечном итоге, предотвращает падение урожая.

2. Ростстимулирующий эффект *B. subtilis* 10-4 на растения пшеницы обусловлен быстрым 1,5–2-кратным накоплением ИУК на фоне отсутствия изменений в концентрации ЦК и АБК. Антистрессовый эффект связан с предотвращением вызываемого обезвоживанием падения содержания ИУК, уменьшением амплитуды сдвигов в балансе АБК/ЦК и с усилением отложения лигнина и суберина в клеточных стенках корней с максимальными значениями для растений устойчивого сорта в сравнении с растениями чувствительного сорта.

3. Эндогенная СК играет ключевую роль в реализации преадаптирующего и антистрессового действия эндофита *B. subtilis* 10-4 на растения пшеницы с контрастными стратегиями адаптации в условиях дефицита влаги.

4. Поддержание фотосинтеза у инокулированных растений пшеницы при дефиците влаги связано с оптимизацией работы ФСII (повышением максимального и эффективного квантовых выходов Fv/Fm, Y(II), снижением квантового выхода нерегулируемой диссипации энергии Y(NO)), с увеличением площади листьев и предотвращением деградации хлорофиллов при стрессе, с регуляцией устьичной проводимости, обеспечивающей компромисс между снижением потери воды и поддержанием газообмена в зависимости от стратегии адаптации к засухе и длительности стресса.

5. Ключевую роль в снижении уровня стресс-индуцированных окислительных повреждений клеток и стабилизации редокс-статуса контрастных по стратегии адаптации к засухе инокулированных растений пшеницы устойчивого сорта Экада 70 и чувствительного сорта Салават Юлаев в ранние фазы онтогенеза (прорастание-всходы) играют AsA и GSH соответственно; тогда как в более поздние стадии развития (кущение) – GR для растений обоих сортов.

6. Инокуляция семян эндофитами *B. subtilis* (10-4, 26Д) способствует повышению содержания эндогенной ГАМК до стресса в контрастных по стратегии адаптации к обезвоживанию растениях пшеницы и быстрому накоплению этой аминокислоты при возникновении стресса (комбинация гербицида с почвенной засухой) в сравнении с контролем, что сопровождается повышением устойчивости растений и ускоренным их восстановлением в пост-стрессовый период, свидетельствуя о вовлечении этого соединения как сигнальной молекулы в процессы вызываемой эндофитами стресс-адаптации растений.

7. Предпосевная инокуляция *B. subtilis* (10-4, 26Д) оказывает пролонгированный защитный эффект на рост и биохимические показатели контрастных по стратегии адаптации к засухе экотипы пшеницы при комбинированном стрессе (гербицид+засуха) и способствует ускоренному их восстановлению в пост-стрессовый период, что отражается на повышении урожайности с улучшением аминокислотного, минерального состава и показателей хлебопекарного качества зерна. У устойчивого экотипа при стрессе инокуляция усиливает генетически заложенные защитные механизмы, у чувствительного – компенсирует недостающие.

8. Проявление ростстимулирующих и антистрессовых свойств эндофита *B. subtilis* 10-4 на различные растения и при разных стрессах детерминирована набором генов, ассоциированных с колонизацией (жгутиковая подвижность, хемотаксис, адгезия, формирование биопленок, синтез ЭПС); с усвоением питательных элементов (N, P, K, S, Fe), синтезом сидерофоров, фитогормонов (ауксины, СК) и других биоактивных соединений (включая витамин B6, летучие вещества ацетон, 2,3-бутандиол); с биоконтролем через синтез антимикробных агентов (NRPS-кластеры бацитилина, бацитилаина, субтилозина А, бациллибактина, сурфактина, фенгидина, пилипастина, уникальный терпеновый кластер, сакти- и рантипептиды, протеазы, глюканазы); с устойчивостью к абиотическим стрессам, включая гены синтеза осмопротекторов (пролин, глицин бетаин), ГАМК, полиамины спермидина, детоксикации АФК (СОД, глутатион); с регуляцией общих стресс-реакций, передачи сигналов клетками и устойчивостью к агрессивным условиям среды.

Личный вклад автора. Автором сформулированы цели и задачи исследования, подобраны модельные объекты, получены, проанализированы и обобщены основополагающие результаты. Исследования, осуществленные в соавторстве, отражены в совместных публикациях, в которых вклад автора составляет не менее 80%. Научный консультант, профессор, д.б.н. Ф.М. Шакирова участвовала в обсуждении результатов начиная с ранних этапов исследования до своей кончины в 2023 г.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и доложены на следующих научных форумах: Международном Симпозиуме «Биохимия – основа наук о жизни» (Казань, 2013), VII и XI Всероссийских с международным участием Конгрессах молодых ученых-биологов «СимбиозРоссия» (Екатеринбург, 2014, Пермь, 2019), 4th International Symposium «Plant Signaling and Behavior» (Санкт-Петербург, 2016), VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)» (Крым, 2016), II и III Международных Симпозиумах «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Уфа, 2017, Екатеринбург, 2021), Международных научных конференциях PLAMIC2018, PLAMIC2020, PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Уфа, 2018, Саратов, 2020, Санкт-Петербург, 2022), 3rd Global Congress on Plant Biology and Biotechnology (Сингапур, 2019), 10th International Conference «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability2019» (Санкт-Петербург, 2019), International Scientific Conference «Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health and Quality of Human and Bees Life» (Словакия, 2019), IX и X Съездах Общества Физиологов Растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019) и «Биология

растений в эпоху глобальных изменений климата» (Уфа, 2023), 4th Edition of Global Conference on Plant Sciences and Molecular Biology (Великобритания, 2019), ICABBBE 2019: International Conference on Agricultural, Biotechnology, Biological and Biosystems Engineering (ОАЭ, 2019), Международной научно-практической конференции «Рациональное использование природных ресурсов в агроценозах» (Симферополь, 2020), IESPS: 1st International Electronic Conference on Plant Science (MDPI, Switzerland, 2020), Congress on Plant Biology Europe 2021 (PBE2021) (Италия, 2021), 7th International Conference on Agricultural and Biological Sciences (ABS2021), 4th International Conference on Applied Biochemistry and Biotechnology (ABB2021) (Китай, 2021), V Российском симпозиуме с международным участием «Cell Signaling: Conclusions and Perspectives» (Казань, 2021), 5th International Scientific Conference «Agrobiodiversity for Improving the Nutrition, Health, Quality of Life and Spiritual Human Development» (Словакия, 2021), International e-Conference on Postharvest Disease Management and Value Addition of Horticultural Crops (Индия, 2021), III Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии» (Уфа, 2021), 2nd International Wheat Congress (Китай, 2022), 4th–5th International Conferences on Soil Remediation and Plant Protection (SRPP2023, SRPP2024) (Санья, Китай, 2023, 2024), GENARA2025 (Турция, 2025).

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследование выполнялось в рамках НИР рег. №01201251021 «Механизмы действия новых штаммов бактерий *Bacillus subtilis* как перспективной основы для создания биопрепаратов нового поколения» (2011–2020 гг.), рег. №АААА-А16-116020350028-4 «Молекулярные механизмы реализации биологического потенциала растений и микроорганизмов» (2018–2020 гг.), рег. №АААА-А16-116020350029-1 «Взаимодействие фитогормонов в регуляции устойчивости растений к условиям обезвоживания» (2020–2021 гг.), рег. №122041400162-3 «Молекулярные механизмы адаптации организмов к окружающей среде» (2022–2024 гг.), рег. №1022040500077-6 «Молекулярные механизмы адаптации организмов к изменяющимся условиям среды» (2025–2027 гг.). Исследования поддержаны 6 грантами, в которых автор являлся руководителем (РФФИ №19-016-00035а (2019–2021 гг.) и № 20-116-50151 (2019–2020 гг.), Президента РФ №МК-643.2019.11 (2019–2020 гг.), РНФ №18-76-00031 (2018–2020 гг.), №22-26-00076 (2021–2023 гг.) и №25-16-00188 (2025–2027 гг.)).

Публикации. По теме диссертации автором опубликовано 39 работ, в том числе 2 статьи из перечня журналов, рекомендованных ВАК, 9 публикаций из перечня изданий ВАК-МБД, 23 статьи из перечня изданий Web of Science и Scopus, 3 публикации из перечня изданий РИНЦ, 2 главы в монографиях издательства Springer.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 347 страницах машинописного текста и состоит из введения, 9 глав (обзор литературы, объекты и методы исследований, 7 глав результативной части), заключения, выводов, списка литературы и приложения. В работе представлено 60 рисунков, 19 таблиц. Список литературы включает 640 источников, из них 569 – зарубежных.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность и признательность своим учителям и наставникам проф., д.б.н. Ф.М. Шакировой, к.с.-х.н. Л.И. Пусенковой, проф., д.б.н. И.В. Максимова, д.б.н. С.Р. Гариповой, д.б.н. И.С. Марданшину за неоценимую помощь, плодотворное обсуждение результатов, ценные советы и поддержку на всех этапах работы. Особая благодарность сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам к.б.н. А.М. Авальбаеву, к.б.н. Д.Р. Масленниковой, к.б.н. А.Р. Лубяновой, к.б.н. Р.А. Юлдашеву, к.б.н. Ч.Р. Аллагуловой, м.н.с. И.С. Корякову, м.н.с. Д.Ю. Гаршиной, коллегам из лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов д.б.н., Ан.Х. Баймиеву, а также коллегам из УФИХ УФИЦ РАН к.х.н. С.П. Иванову, к.х.н. С.Ф. Петровой, коллегам из ИПЧ УУНиТ проф., д.б.н. Р.Г. Фархутдинову, к.б.н. И.А. Шпирной и коллегам из Тегеранского университета (Тегеран, Иран) за неоценимую помощь и плодотворное сотрудничество на разных этапах диссертационного исследования, за постоянное внимание и помощь в ходе ее выполнения, обсуждения и написания. Благодарность магистрантам, студентам и всем, кто принимал активное участие и оказывал поддержку на различных стадиях работы.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

ГЛАВА 1. РОЛЬ PGP-БАКТЕРИЙ В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ (обзор литературы)

Представлен анализ современного состояния исследований в мире в области растительно-микробных взаимодействий в контексте защиты растений от абиотических стрессов. Проанализированы различные аспекты: синтез осмопротекторов и антиоксидантов, регуляция экспрессии защитных генов, сигнальные каскады с участием фитогормонов, модуляция биодоступности макро-/микроэлементов и продуктивность. Систематизирована имеющаяся информация о влиянии *Bacillus* spp. на фотосинтез, водный обмен, адаптационный потенциал и устойчивость растений. Выявлены пробелы в понимании механизмов формирования эффективных растительно-микробных взаимодействий, приводящих к вариабельности их действия. Отмечены важность раскрытия механизмов стресс-реакций растений в присутствии эндوفитов (включая неизученные аспекты работы фотосинтетического аппарата, редокс-гомеостаза, фитогормональных перестроек) и применение новых подходов, включая NGS-технологии и *in silico* инструменты для анализа геномов PGP-бактерий для прогнозирования эффективности их применения на растениях в условиях меняющегося климата.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований. Основным объектом исследования служили растения яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорта Башкирская26, Саратовская55, Экада70, Омская35, Салават Юлаев), озимой мягкой пшеницы (сорт Скипетр); дополнительными – растения овса (*Avena sativa* L., сорт Яков), редьки масличной (*Raphanus sativus*, сорт Тамбовчанка), фасоли (*Phaseolus vulgaris* L., сорт Золотистая), гороха (*Pisum sativum* L., сорт Памяти Хангильдина), картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Башкирский), сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L., сорт Кампай). В качестве представителей СВ (интенсивный рост в ранние фазы развития и замедленный во второй половине вегетации для избегания летней засухи) и ЛСЗ (замедленный рост в ранние фазы развития для избегания весенней засухи и быстрый рост во вторую половину вегетации) экотипов пшеницы использовались сорта Экада70, Саратовская55 и Салават Юлаев, Омская35, соответственно.

В качестве **основной эндофитной бактерии** в экспериментах использовали штамм *B. subtilis* 10-4 (регистр. № ВКПМ В-12988, NCBI JAVNHX0000000000), взятый из коллекции микроорганизмов Башкирского НИИСХ УФИЦ РАН (г. Уфа). Для сравнения применяли *B. subtilis* 26Д (референсный штамм, основа биопрепарата Фитоспорин-М; регистр. № ВКПМ 016-02-2491-1, NCBI JBJBSD0000000000), любезно предоставленный ООО НВП «БашИнком» (г. Уфа), а также коммерческие биопрепараты Фитоспорин-М (*B. subtilis* 26Д, ООО НВП «БашИнком») (П, 30г/10л воды) и Витаплан (*B. subtilis* 2604D + *B. subtilis* 2605D, ЗАО «Агробиотехнология») (СП, 80 г/га). Для **получения инокулюма**, клетки *B. subtilis* (10-4 и 26Д) культивировали на средах LB или PDA (37 °C, 180 об/мин, 24 ч) до достижения титра 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл и разбавляли стерильной водой методом разведения (Нетрусов и др., 2005) до 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 КОЕ/мл для оценки фитотоксичности и определения оптимальной в стимуляции роста растений концентрации; в остальных экспериментах штамм 10-4 применяли в концентрации 10^5 КОЕ/мл (оптимальной в стимуляции роста растений) (Lastochkina et al., 2017), а 26Д применяли в рекомендованной производителем концентрации (10^8 КОЕ/мл). Титр клеток определяли путем измерения при 600 нм (OD_{600}) и посева на агаризованную среду LB.

Молекулярно-генетическую идентификацию *B. subtilis* 10-4 проводили с помощью анализа 16S рРНК (Lastochkina et al., 2017). **Бактериальную ДНК выделяли** согласно (Innis et al., 1990). **Полногеномное секвенирование** *B. subtilis* 10-4 проводили на платформе Illumina, **фильтрацию прочтений** от последовательностей адаптеров осуществляли с помощью ПО fastp v. 0.23.2, **сборку генома de novo** – SPAdes v.3.15.3, **аннотацию** – Prokka v.1.12. **Филогеномное древо** *B. subtilis* 10-4 построено на основе полногеномных данных (номер

доступа в NCBI: JAVNHX010000000) с использованием сервера TYGS (<https://tygs.dsmz.de>) (Meier-Kolthoff, Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022). **Биоинформатический анализ генома *B. subtilis* 10-4** проводили с использованием веб-сервисов RAST (<https://rast.nmpdr.org>), категории кластеров генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов с антимикробными свойствами – antiSMASH bacterial v.7.1.0. (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>), за антимикробную устойчивость – CARD (Alcock et al., 2023), метаболические пути строили при помощи KEEG (<http://www.genome.jp/kegg/>). **In vitro** антагонистическую активность клеток *B. subtilis* (Нетрусов и др., 2005) и их метаболитов (Toral et al., 2018) оценивали методом лунок на среде PDA против тест-культур фитопатогенов: *Fusarium cilmorum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* (из коллекций БНИИСХ УФИЦ РАН и ООО НВП «Башинком», Уфа) и *Phytophthora infestans* (из коллекции ВИЗР, Санкт-Петербург). **Фитотоксичность *B. subtilis*** оценивали согласно ГОСТ 33777-2016, **толерантность клеток бактерий** к осмотическому стрессу, засолению, токсическому действию кадмия (Cd), пестицидам – путем наблюдения за их ростом в жидкой и агаризованной LB среде, содержащей различные концентрации ПЭГ-6000 (0, 4, 8, 12%), $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0, 0.1, 0.5 и 1.0 mM), NaCl (0, 1, 1.5, 2.0%), гербицида (ГБ) Sekator®Turbo (0, 0.25, 0.375, 0.5 мл/л). **Продукцию бактериями ИУК** оценивали в присутствии L-триптофана (Malik, Sindhu, 2011) и при помощи метода ИФА (Shakirova et al., 2003), **СК** – методом ВЭЖХ (Shanmugam, Narayanasamy, 2008), **АБК** и **ЦК** – методом ИФА (Shakirova et al., 2003), **сидерофоров** – с использованием красителя Chrome AzurolS (Schwyn et al., 1987), **метаболитов и липопептидов** – среды MOLP (Toral et al., 2018), **солюбилизацию фосфатов** – среды Пиковской (Pikovskaya, 1948), **фиксацию атмосферного азота** по росту бактерий на среде Эшби (Нетрусов и др., 2005) и методом газовой хроматографии (Умаров, 1986), а также ряд **физико-биохимических свойств** с помощью набора тест-систем N2 («MicroGen», Нижний Новгород).

Для оценки фитотоксичности семена редьки масличной и овса проращивали в чашках Петри с фильтр. бумагой и добавлением 3 мл суспензии *B. subtilis* (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 КОЕ/мл) или воды (контроль) в темноте при 22–24°C в течение 5 сут (ГОСТ 33777-2016). **Для определения оптимальной в стимуляции роста** концентрации *B. subtilis*, семена перед посевом стерилизовали 96% этанолом (60 сек), промывали водой и замачивали 1 ч в суспензиях бактерий (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 КОЕ/мл) и воде (контроль) и анализировали данные по всхожести (через 3 сут), по длине корней и побегов, накоплению их сырой и сухой биомассы (через 6 сут). **Всхожесть** оценивали проращиванием семян в чашках Петри с фильтр. бумагой и 5 мл воды в течение 3 сут (пшеница) (21–24 °C, 16-ч фотопериод, 200 мкмоль м⁻² с⁻¹), 7 сут (фасоль, горох) (в темноте, 21–24 °C). **Засухоустойчивость растений пшеницы** оценивали путем проращивания семян в растворах сахарозы (16, 18, 20% = осмотический потенциал 1.32, 1.44 и 1.56 МПа) и ПЭГ-6000 (3, 6, 9, 12% = осмотический потенциал ≈0,11, ≈0,23 и ≈0,45 МПа) (Удовенко, 1988).

Для оценки морфофизиологических и биохимических параметров стерилизованные семена замачивали 1 ч в суспензиях *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл), *B. subtilis* 26Д (10^8 КОЕ/мл) (опыт) (Lastochkina et al., 2017; 2020a) или в воде (контроль) и проращивали в чашках Петри или кюветах с фильтр. бумагой, смоченных водой в течение 3-х сут (21–24 °C, 16 ч фотопериод, 200 мкмоль м⁻² с⁻¹). Затем в зависимости от целей использовали разные постановки: **1) Лабораторные эксперименты.** 3-х или 4-х сут неинокулированные (контроль) и инокулированные *B. subtilis* (опыт) проростки (вместе с эндоспермом) пересаживали в стаканы с растворами 1% или 2% NaCl (засоление), 12% ПЭГ-6000 (дефицит влаги), 1 mM ацетата кадмия [$\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$] (Cd стресс) или воду (норма), и через разные промежутки времени (1, 3, 7, 24, 48, 72 ч) в свежем или в зафиксированном в жидком азоте и хранившемся при -70 °C растительном материале (корни, побеги, листья или целое растение в зависимости от анализа) оценивали физиолого-биохимические параметры. В опытах, по выявлению роли СК в эндофит-опосредованной засухоустойчивости пшеницы, суспензии бактерий готовили в растворах с ингибитором биосинтеза СК – 1-аминобензотриазолом

(АВТ) (Lastochkina et al., 2022b). **2) Вегетационные эксперименты в контролируемых условиях.** 3-сут проростки пересаживали в сосуды с почвой (рН6.5, влажность 65%) (по 20 растений/сосуд), выращивали их при 22–24 °С (16 ч фотопериод, 320 мкмоль м⁻² с⁻¹, влажность воздуха 60%) и дважды в неделю поливали водопроводной водой. Далее 17-сут растения (фаза 2–3 листа) разделяли на 2 группы: 1) нормальные условия и обычный полив; 2) однократное опрыскивание Гб (75 мл/га, <https://www.cropscience.bayer.ru/product/sekator-turbo>). Через 3-е сут часть растений обеих групп подвергали почвенной засухе (путем приостановки полива на 7 сут) с последующей репарацией (Todorova et al., 2021). Все измерения морфофизиологических и биохимических показателей производились в динамике: до стрессов (16-сут растения); 4-сут и 7-сут засухи (21 и 28-сут растения); 4-сут репарации (32-сут растения). Структуру урожая оценивали через 3 месяца (Ведров, Халипский, 2012). **Полевые опыты** проводили в опытном хозяйстве Чишминского селекционного центра УФИЦ РАН (Чишмы). Семена инокулировали *B. subtilis* как описано выше и высевали в деланки (5 м²) (Доспехов, 1979).

Колонизацию внутренних тканей растений *B. subtilis* (**эндофитность**) оценивали с использованием поверхностно стерилизованных гидропонных проростков, LB или *Bacillus* ChromoSelect агара и RAPD-ПЦР анализа. **Бактериальную ДНК выделяли** при помощи лизирующего буфера. Количество КОЕ (**титр**) бактерий в растениях определяли согласно методике описанной (Pusenкова et al., 2023). **О росте растений** судили по линейным размерам, сырой и сухой массе (Мокроносова, 1994). **Содержание АБК, ИУК и ЦК** определяли в одной растительной навеске методом ИФА (Shakirova et al., 2003). Методом ВЭЖХ определяли **содержание СК** (Темердашев и др., 2011) и **ГАМК** (Wang et al., 2022 с модификациями). **Уровень ПОЛ** оценивали по содержанию **МДА** (Мокроносова, 1994), **проницаемость мембран** – по экзоосмосу электролитов (Bari et al., 2019), **генерацию H₂O₂** (Bindschedler et al., 2001), **O₂⁻** (Minibayeva et al., 2001), **активность СОД** (Beyer, Fridovich, 1987), **APX** (Verma et al., 2003), **GR** (Rao et al., 1996), **содержание GSH и GSSG** (Rao et al., 1996), **AsA** (Плешков, 1976), **КАТ** (Aebi, 1984), **свободного пролина** (Bates et al., 1973, Калинкина и др., 1985), **фотосинтетических пигментов (Хл а, Хл b, Кар)** (Мокроносова, 1994), **состояние устьиц** (Salehinia et al., 2024) и **площадь листьев** методами отпечатков и сканирования, соответственно, в сочетании с ПО ImageJ. **Фотохимическую активность** фотосинтетического аппарата оценивали при помощи импульсного флуориметра IMAGE-RAM-MAXI («Heinz Waltz GmbH», Германия). С помощью световой и конфокальной микроскопии оценивали **отложение и локализацию лигнина** (Фурст, 1979, Lastochkina et al., 2021), **суберина** (Boerjan et al., 2003). Показатели водного обмена оценивали по **интенсивности транспирации** (Sharipova et al., 2012), **осмотическому потенциалу** (Lubyanova et al., 2022), **относительному содержанию воды (ОСВ)** (Lubyanova et al., 2023), **водоудерживающую способность (ВС)** определяли согласно (Щукин, Громов, 2008). **Тотальную РНК** из растений выделяли с использованием TRIzol («Thermo Fisher Scientific», США). ПЦР проводили с использованием праймеров к последовательностям гена *PR1* (Lu et al., 2011). **Развитие заболеваний** оценивали согласно (Pusenкова, Lastochkina, 2025), **элементы структуры урожая** (Доспехов, 1979; Ведров, Халипский, 2012), **массовую долю аминокислот** в зерне – методами капиллярного электрофореза (ГОСТ 55569-2013, Методика М04-92-2020), **содержание макро-микроэлементов** (ГОСТ 13496.4-93, ГОСТ 26657-97, ГОСТ 30504-97, ГОСТ 56372-2015), **влажность, содержание белка, количество и качество клейковины (ИДК), стекловидность, число падения** с помощью инфракрасного анализатора («Люмэкс», Россия).

Все опыты проводили не менее чем в трех биологических и четырех-пяти аналитических повторах. В иллюстрациях представлены средние арифметические значения и ошибки средних. Статистическую обработку проводили с использованием ПО Statistica («StatSoft Inc», США). На рисунках и в таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки ($\pm$ SE) при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, РОСТСТИМУЛИРУЮЩИЕ И АНТИСТРЕССОВЫЕ СВОЙСТВА *Bacillus subtilis* 10-4 НА РАЗЛИЧНЫЕ РАСТЕНИЯ

В этой главе проведена молекулярно-генетическая идентификация, исследована биологическая активность *B. subtilis* 10-4 и оценено влияние инокуляции семян на основные физиолого-биохимические параметры устойчивости агрокультур при действии разных по природе стрессов и их комбинаций. Выявлено, что *B. subtilis* 10-4 обладает комплексом свойств, присущих ростстимулирующим бактериям (PGP-traits); толерантен к осмотическому стрессу, засолению, тяжелым металлам, пестицидам; нефитотоксичен в отношении однодольных и двудольных растений; ингибирует *in vitro* рост фитопатогенов-возбудителей экономически опасных заболеваний растений, включая *Fusarium spp.*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans*, оказывает *in planta* ростстимулирующий и протекторный эффекты на однодольные и двудольные растения на клеточном и организменном уровнях при засолении, дефиците влаги, Cd стрессе, комбинации дефицита влаги с поражением возбудителем фузариоза и гербицидным стрессом, инфицированием возбудителем альтернариоза.

Морфолого-культуральные свойства, идентификация и *in vitro* антагонистическая активность *B. subtilis* 10-4. По морфолого-культуральным признакам и при помощи 16S рРНК анализа штамм 10-4 был отнесен к *B. subtilis* (99%), построенное на основе полногеномных данных филогенетическое древо подтвердило систематическое положение (рис. 3.1).

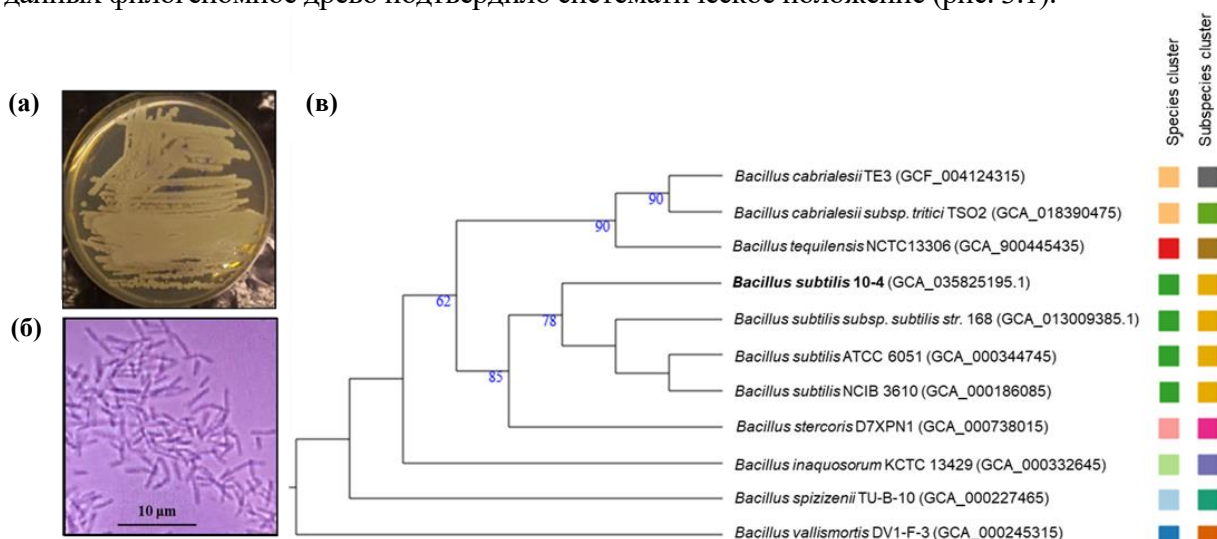


Рис. 3.1. Репрезентативные фотографии роста *B. subtilis* 10-4 на агаризованной среде LB (а) и визуализация клеток под микроскопом Biozero BZ-8100E (б). Филогенетическое древо BLAST Distance Phylogeny (GBDP), показывающее систематическое положение *B. subtilis* 10-4, построенное с использованием сервера TYGS (выведено с помощью FastMe 2.1.6.1 на основе расстояний GBDP, рассчитанных по последовательностям генома); в скобках указаны номера геномов в GenBank/JGI (в)

Установлено, что *B. subtilis* 10-4 не уступает, а в некоторых случаях превосходит референсный штамм 26Д по подавлению *in vitro* роста фитопатогенов *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *Ph. infestans* (Lastochkina et al., 2020; 2021b; 2022), *A. alternata* (Ласточкина и др., 2018), что обусловлено синтезом таких низкомолекулярных метаболитов с антимикробными свойствами как липопептиды сурфактины C13–C15 (Lastochkina et al., 2021b).

Ростстимулирующие (PGP-traits) и физико-химические свойства. Выявлено, что *B. subtilis* 10-4 обладает свойствами, присущими ростстимулирующим бактериям (PGP-traits), включая продукцию ИУК (на среде Сальковской), сидерофоров, фиксацию атмосферного азота (Lastochkina et al., 2017; 2021; Ласточкина и др., 2023). В среде культивирования обнаружены фитогормоны ИУК (1147 нг/мл), АБК (85 нг/мл), СК (52 нг/мл) и следовые количества ЦК (Lastochkina et al., 2023), играющие важную роль в регуляции роста/развития растений и формировании растительно-микробных взаимодействий.

Оценка толерантности клеток *B. subtilis* к экстремальным условиям культивирования *in vitro* и фитотоксичности в отношении высших растений. Выявлено, что клетки *B. subtilis* 10⁻⁴ толерантны к осмотическому стрессу, засолению, тяжелым металлам, пестицидам, на что указывает их способность расти на LB среде в присутствии ПЭГ-6000, NaCl, Cd(CH₃COO)₂, гербицида Sekator® Turbo (Lastochkina et al., 2023; Maslennikova et al., 2023). Установлено, что *B. subtilis* 10⁻⁴ в диапазоне концентраций (0, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ КОЕ/мл) не оказывает угнетающего воздействия на рост однодольных (овес) и двудольных (редька) тест-растений (рис. 3.2), максимально увеличивая всхожесть и длину растений при применении 10⁵ КОЕ/мл для овса (131%) и 10⁵ КОЕ/мл (132%), 10⁶ КОЕ/мл (137%) для редьки.

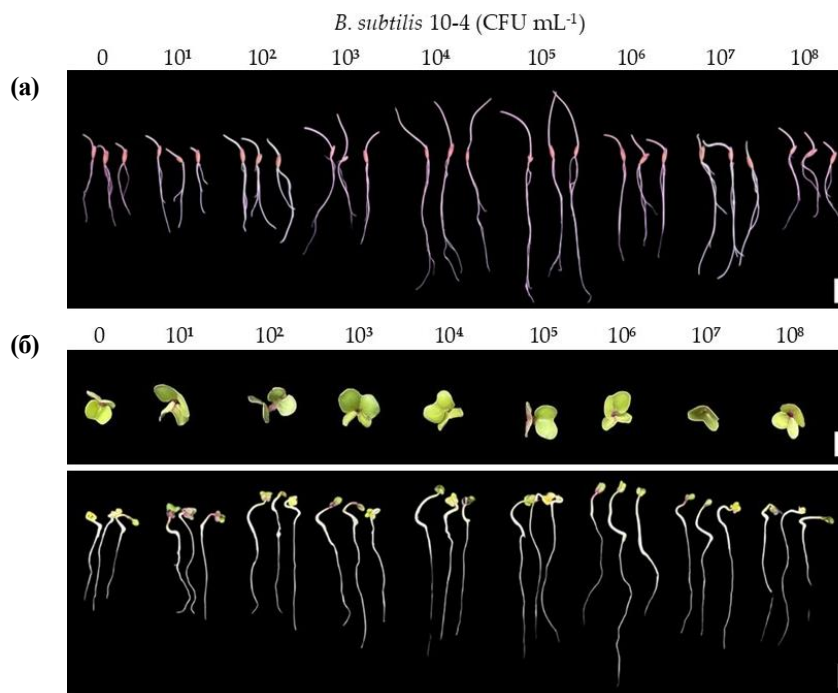


Рис. 3.2. Отсутствие фитотоксичности и дозо-зависимое положительное влияние *B. subtilis* 10⁻⁴ на рост однодольных (овес) (а) и двудольных (редька масличная) (б) растений. На фото представлены 5-сут тест-растения. Шкала: 0,5 см

Влияние *B. subtilis* 10⁻⁴ в разных концентрациях на рост пшеницы. Использование в качестве модельного объекта яровой мягкой пшеницы подтвердило дозо-зависимое влияние *B. subtilis* 10⁻⁴ при предпосевной обработке (инокуляции) на прорастание семян и интенсивность ростовых процессов растений (длина корней и побегов, сырая и сухая масса) (рис. 3.3а–в). Хотя при всех использованных концентрациях наблюдалось увеличение энергии прорастания семян (на 7–20%), однако, оптимальной в стимуляции роста оказалась концентрация 10⁵ КОЕ/мл, демонстрирующая увеличение энергии прорастания и всхожести семян (на 20%), длины корней (на 30%) и побегов (на 23%) проростков, их сырой и сухой массы (на 42% и 27%) по сравнению с контролем (рис. 3.3), которая использовалась в последующих экспериментах.

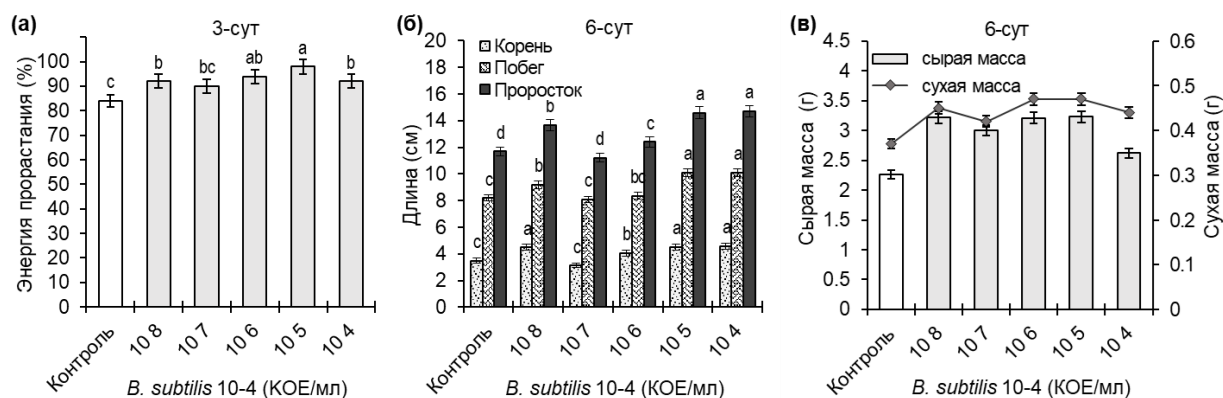


Рис. 3.3. Влияние предпосевной инокуляции семян яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Башкирская26) *B. subtilis* 10⁻⁴ в разных концентрациях на энергию прорастания семян (а), линейные размеры проростков (б), их сырую и сухую биомассу (в)

Анализ эндофитности. Колонизация внутренних тканей растений бактериями является одним из наиболее важных свидетельств их эндофитных свойств и фактором, влияющим на биологическую активность в растительно-микробных системах. С использованием поверхностно-стерилизованных проростков, селективной хромогенной среды *Bacillus* ChromoSelectAgar и RAPD-ПЦР анализа продемонстрирована способность *B. subtilis* 10-4 эффективно колонизировать внутренние ткани проростков пшеницы при предпосевной инокуляции (рис. 3.4а–в); максимальный титр бактерий был обнаружен в корнях (в 3,5 раза выше, чем в побегах) (рис. 3.4г). Дальнейшие тесты подтвердили эндофитность *B. subtilis* 10-4 для растений фасоли (Lastochkina et al., 2021), гороха (Ласточкина и др., 2023), картофеля (Pusenкова et al., 2023). Важный вклад в проникновение во внутренние ткани растений и колонизацию *B. subtilis* 10-4, вероятно, играет выявленная микробная продукция ИУК и СК (Lastochkina et al., 2023) и наличие в геноме эндофита связанных с колонизацией генов (*eps*, *pel*, *Fli*, *Flh*, *Flg*, *PomA* и др.) (см. главу 9).

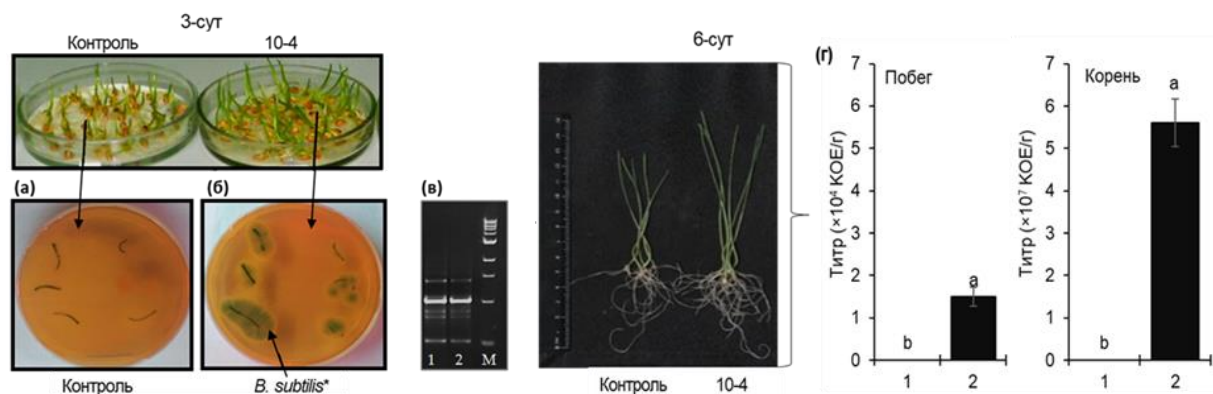


Рис. 3.4. Способность *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани поверхностно-стерилизованных проростков пшеницы: (а) отсутствие роста бактерий *B. subtilis* вокруг сегментов (корней, побегов) у неинокулированных проростков (Контроль); (б) рост бактерий *B. subtilis* (*колонии от светло-зеленого до зеленого цвета) вокруг сегментов побегов и корней, инокулированных *B. subtilis* 10-4; (в) электрофореграмма ПААГ: М – ДНК-маркер; 1 – ДНК *B. subtilis* 10-4 (инокулянта), 2 – ДНК бактерий, выросших вокруг сегментов проростков; (г) титр эндофитных *B. subtilis* в корнях и побегах 6-сут проростков

Морфофизиологические параметры и устойчивость различных видов растений к стрессовым факторам среды под влиянием эндофитных *B. subtilis*. Далее была проведена комплексная оценка влияния инокуляции семян *B. subtilis* 10-4 на основные морфофизиологические процессы разных культурных растений (злаковые, амарантовые, бобовые, пасленовые) и биохимические параметры их устойчивости к различным по природе стрессам и комбинациям, определяющим особенности роста, фотосинтеза, окислительного и осмотического статуса. Результаты продемонстрировали проявление ростстимулирующего и протекторного эффектов на организменном (фенотипическом) (табл. 3.1, рис. 3.5) и клеточном (рис. 3.6) уровнях инокулированных растений как яровой (Lastochkina et al., 2017; 2020a), так и озимой пшеницы (Lubyanova et al., 2023), сахарной свеклы (Пусенкова и др., 2015; 2016; Ласточкина и др., 2018), фасоли (Lastochkina et al., 2021), гороха (Ласточкина и др., 2023), картофеля (Pusenкова et al., 2023; Pusenkova, Lastochkina, 2024) в норме и при различных стрессах: засолении (Lastochkina et al., 2017; 2021; Ласточкина и др., 2023), ПЭГ-индуцированном обезвоживании (Maslennikova, Lastochkina, 2021; Lastochkina et al., 2020a; 2022b; 2023b; Lubyanova et al., 2023), Cd стрессе (Maslennikova et al., 2023), поражении возбудителем альтернариоза (Ласточкина и др., 2018), комбинации водного дефицита с инфицированием возбудителем фузариоза (Lastochkina et al., 2020b; 2021b) и гербицидным стрессом (Lastochkina et al., 2023) (рис. 3.5), что позволяет отнести *B. subtilis* 10-4 к биостимуляторам роста с широким спектром защитного действия.

Установлено, что универсальные (общие) реакции растений в ответ на инокуляцию *B. subtilis* включали улучшение (в разной степени) роста (прорастания и всхожести, длины корней и побегов, биомассы), архитектуры корневой системы (удлинение и ускоренное

формирование боковых корней) (рис. 3.5), обуславливающей повышение усвоения элементов питания и поглощения воды при стрессе, а также снижение стресс-индуцированных окислительных (МДА) и осмотических (пролин) повреждений, деградации фотосинтетических (ФС) пигментов (рис. 3.6), что отражалось в формировании повышенной урожайности (табл. 3.2).

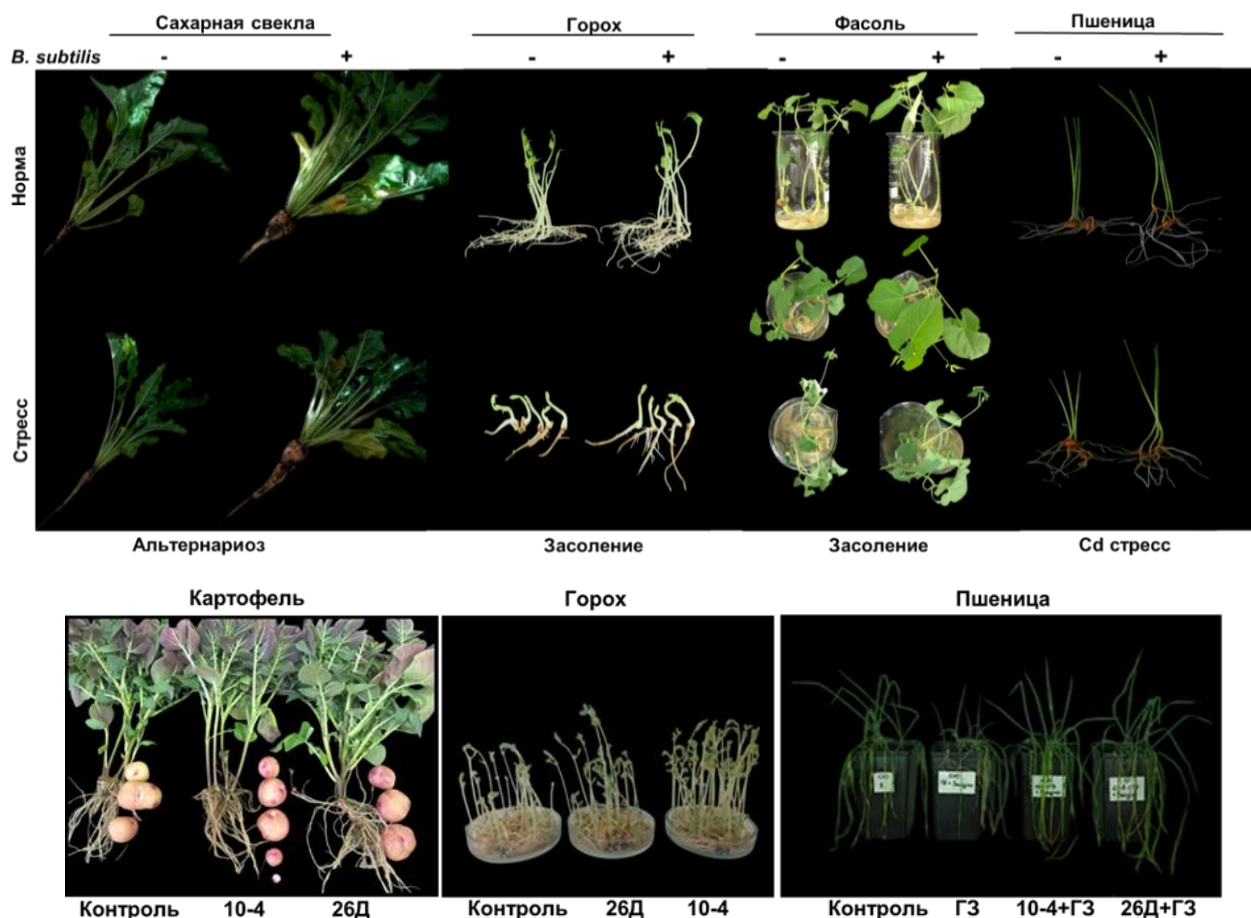


Рис. 3.5. Репрезентативные фотографии (примеры) ростстимулирующего и защитного действия эндофитных бактерий *B. subtilis* (10-4, 26Д) на разные растения в норме и при стрессах. ГЗ - комбинированное воздействие гербицида и засухи (28-сут растения, длительность стресса 7 дней)

Таблица 3.1 – Накопление массы листьев и корнеплодов у растений сахарной свеклы (сорт Кампай), сахаристость их корнеплодов в норме и при инфицировании *Alternaria alternata* под влиянием *B. subtilis* 10-4 и коммерческих бактериальных биопрепаратов (Фитоспорин-М, Витаплан) (2013 г, полевые эксперименты)

Вариант	Масса наземной части, г			Масса корнеплодов, г			Сахаристость, %
	2–3 пары настоящих листьев	4–6 пар настоящих листьев	Уборка урожая	2–3 пары настоящих листьев	4–6 пар настоящих листьев	Уборка урожая	
Здоровые							
Контроль (+)	4,45±0,19	14,67±0,77	165,20±2,65	0,52±0,09	4,33±0,30	550,80±10,41	16,7
Фитоспорин-М	6,11±0,30	27,96±0,82	304,80±2,32	0,92±0,19	10,42±0,48	971,00±11,89	17,9
Витаплан	7,75±0,51	14,25±0,46	425,40±3,01	1,17±0,28	4,94±0,12	970,60±13,03	17,1
<i>B. subtilis</i> 10-4	11,00±0,42	36,7±0,91	336,40±4,69	1,80±0,12	14,12±0,22	1142,40±12,62	18,3
Инфицированные <i>A. alternata</i>							
Контроль (-)	6,86±0,22	14,14±1,13	71,20±1,78	1,32±0,09	3,37±0,21	276,30±4,11	16,1
Фитоспорин-М	8,84±0,14	15,61±0,91	182,00±1,99	1,81±0,12	7,11±0,29	463,00±5,33	18,5
Витаплан	4,68±0,49	11,84±0,70	127,40±2,06	0,64±0,11	3,98±0,15	502,20±5,09	17,9
<i>B. subtilis</i> 10-4	11,21±0,30	25,70±1,42	209,40±2,57	2,72±0,23	11,66±0,23	607,20±4,95	19,0

К примеру, обработка растений сахарной свеклы *B. subtilis* 10-4, наряду с коммерческими биопрепаратами Фитоспорин-М и Витаплан, стимулировала их ростовые процессы, синтез ФС пигментов Хл а, b в норме (в 1,2–1,9 раза) и препятствовала их деградации при инфицировании *A. alternata* (возбудитель альтернариоза), что отразилось в увеличении площади (до 30%) и массы листьев (в 1,8–2,9 раза), массы корнеплодов и их сахаристости (табл. 3.1) (Ласточкина и др., 2018).

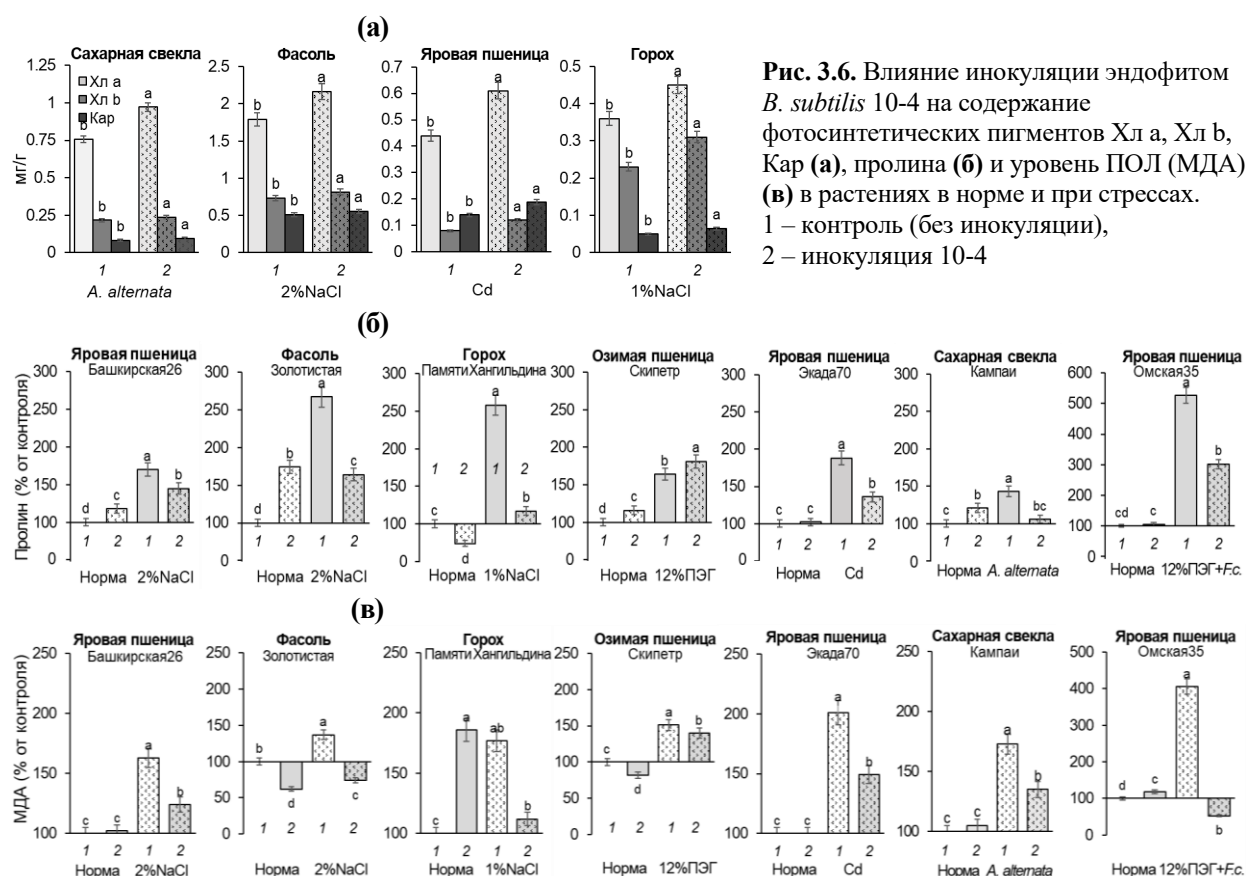


Рис. 3.6. Влияние инокуляции эндофитом *B. subtilis* 10-4 на содержание фотосинтетических пигментов Хл а, Хл b, Кар (**а**), пролина (**б**) и уровень ПОЛ (МДА) (**в**) в растениях в норме и при стрессах. 1 – контроль (без инокуляции), 2 – инокуляция 10-4

Таблица 3.2 – Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* 10-4 и 26Д на урожайность агрокультур в полевых условиях

Вариант	Яровая пшеница (сорт Башкирская26)	Сахарная свекла (сорт Кампай)	Картофель (сорт Башкирский)	Фасоль (сорт Золотистая)
	Урожайность (ц/га)			
Контроль	24,3 ^с	44,3 ^с	25,4 ^с	17,4 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> 10-4	38,5 ^a (+30%)	85,6 ^a (+93%)	28,5 ^a (+11%)	18 ^b (+4%)
<i>B. subtilis</i> 26Д	29,4 ^b (+21%)	72,8 ^b (+64%)	27,3 ^b (+7%)	24,3 ^a (+39%)

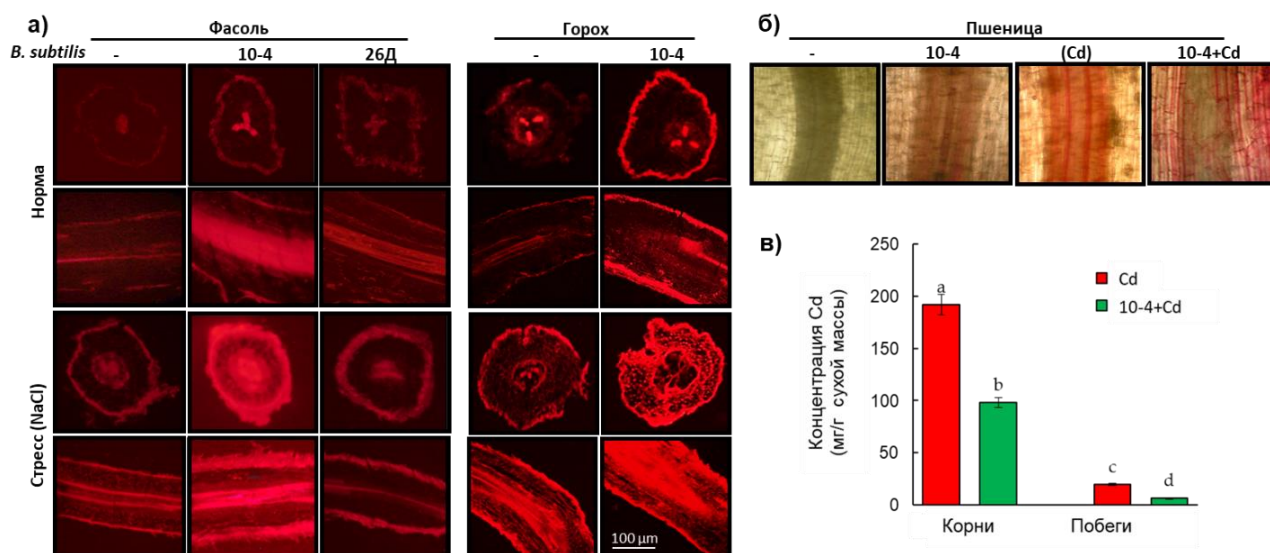


Рис. 3.7. Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* (10-4, 26Д) на лигнификацию клеточных стенок корней растений фасоли и гороха в норме и при засолении (NaCl) (**а**), пшеницы в норме и при действии ацетата кадмия (Cd) (**б**), а также на накопление Cd в корнях и побегах пшеницы в условиях Cd стресса (**в**)

Получены приоритетные данные об участии эндофитных *B. subtilis* в процессе лигнификации клеточных стенок корней (рис. 3.7а,б) (Lastochkina et al., 2021; 2023b;

Ласточкина и др., 2023; Maslennikova et al., 2023), вносящего важный вклад в укрепление их барьерных свойств, включая защиту растений от ионов токсичных соединений и обезвоживания. Так, у инокулированных растений пшеницы в условиях Cd стресса выявлено снижение накопления ионов Cd в корнях и их перемещения в побеги (рис. 3.7в).

Вместе с тем отзывчивость растений на инокуляцию и степень проявления полезных свойств *B. subtilis* варьировала в зависимости от вида растения и стресс-фактора (рис. 3.6, табл. 3.1, 3.2), свидетельствуя о наличии множественных систем регуляции взаимодействия и необходимости их детального изучения в стрессовых условиях. Анализ публикаций по эффективности биопрепарата Фитоспорин-М (на основе эндофита *B. subtilis* 26Д) показал, что прибавка урожайности пшеницы существенно варьировала по годам и сортам (от 2,6 до 146,3%) (обзор Пусенкова, Ласточкина и др., 2020), что подтверждает тесную связь реализации потенциала эндофитов с генотипическими особенностями сорта растения-хозяина. Разнообразие сортов пшеницы в нашей стране представлено рядом агроэкологических групп (экотипов), сформировавшимися в результате естественного и искусственного отбора в различных природно-климатических условиях (Якубцинер 1957; Жученко, 2002). Наибольшее экономическое значение имеют два широко распространенных экотипа с контрастными стратегиями засухоустойчивости: лесостепной западносибирский (ЛЗС) (быстрый начальный рост с последующим замедлением для избегания летней засухи) (Мухитов, Самуилов, 2012) и степной волжский (СВ) (замедленный рост в начале вегетации для избегания весенней засухи и интенсивный рост в поздние фазы) (Цыганков, 2011). Несмотря на известный феномен сортоспецифичности реакции растений на инокуляцию PGP-бактериями (Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Маркова и др., 2023), их влияние, включая эндофитные *B. subtilis*, на растения пшеницы с различными стратегиями адаптации к засухе оставалось неизученным, что обуславливает высокую степень новизны и значимости проводимых исследований. В связи с этим, представляло интерес изучение особенностей влияния эндофитных *B. subtilis* на устойчивость к водному дефициту у представителей контрастных экотипов пшеницы.

ГЛАВА 4. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ИНОКУЛИРОВАННЫХ ЭНДОФИТНЫМИ *B. subtilis* РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ С РАЗНЫМИ СТРАТЕГИЯМИ АДАПТАЦИИ ПРИ ОБЕЗВОЖИВАНИИ

Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* на прорастание и начальный рост пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями в условиях водного дефицита. Ранний этап онтогенеза, во время которого растения наиболее чувствительны к дефициту влаги, представляет собой критически важную фазу в их развитии. Как видно из рисунков 4.1. и 4.2, в условиях моделируемого обезвоживания инокуляция *B. subtilis* (10-4, 26Д) оказывала разнонаправленное влияние на прорастание семян и начальный рост проростков у контрастных по адаптивным стратегиям сортов пшеницы.

Установлено, что инокуляция способствовала лучшему прорастанию семян сортов Саратовская55 и Экада70 (представители СВ экотипа) (рис. 4.1а) в условиях водного дефицита, тогда как практически не оказывала (при умеренном стрессе), или, напротив, в некоторых случаях (при сильном стрессе), даже ингибировала прорастание семян сортов Омская35 и Салават Юлаев (представители ЛЗС экотипа) (рис. 4.1б). В контроле (без инокуляции) растения исследуемых сортов демонстрировали изначально разный уровень устойчивости, что согласуется с их адаптивными стратегиями на ранних этапах онтогенеза (Цыганков, 2011; Мухитов, Самуилов, 2012). В норме инокуляция стимулировала начальный рост проростков сорта Экада70 существенно увеличивая длину корней и побегов (до 29%) (рис. 4.2а), сырую и сухую массу (до 20%) (рис. 4.2д) и содержание Хл (a+b) (до 12%) (рис. 6.1), но оказывала значительно меньший эффект на проростки сорта Салават Юлаев: наблюдалось в основном накопление сырой и сухой массы (до 17%) (рис. 4.2ж) при незначительных изменениях в длине (рис. 4.2б,г) и содержании Хл (a+b) (рис. 6.1).

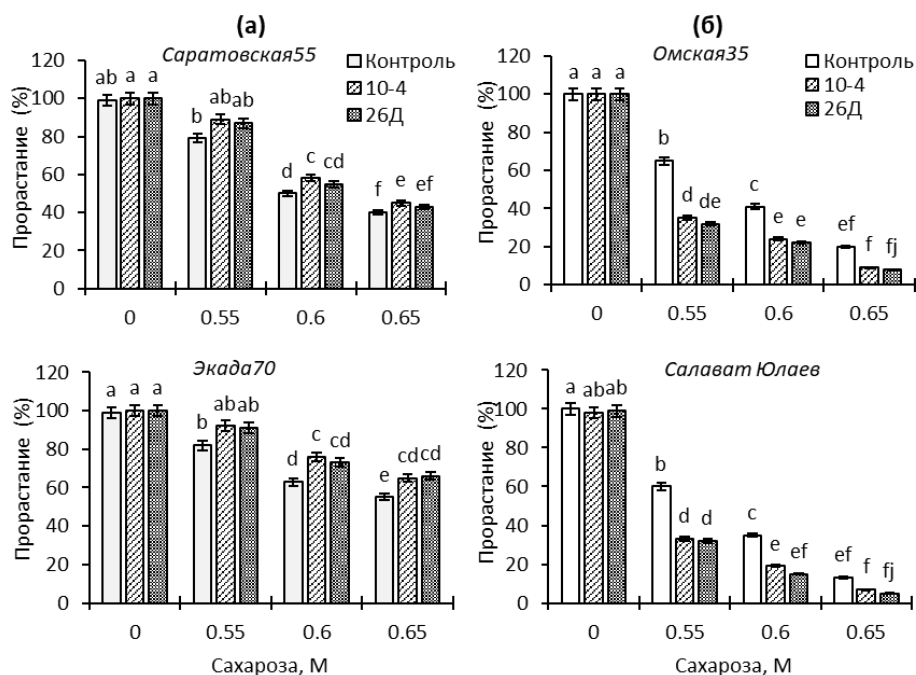


Рис. 4.1. Влияние возрастающего дефицита влаги и эндофитных *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на прорастание семян яровой мягкой пшеницы сортов Саратовская55, Экада70 (устойчивые) (а) и Омская35, Салават Юлаев (чувствительные) (б) через 5 суток проращивания в присутствии высоких концентраций сахарозы

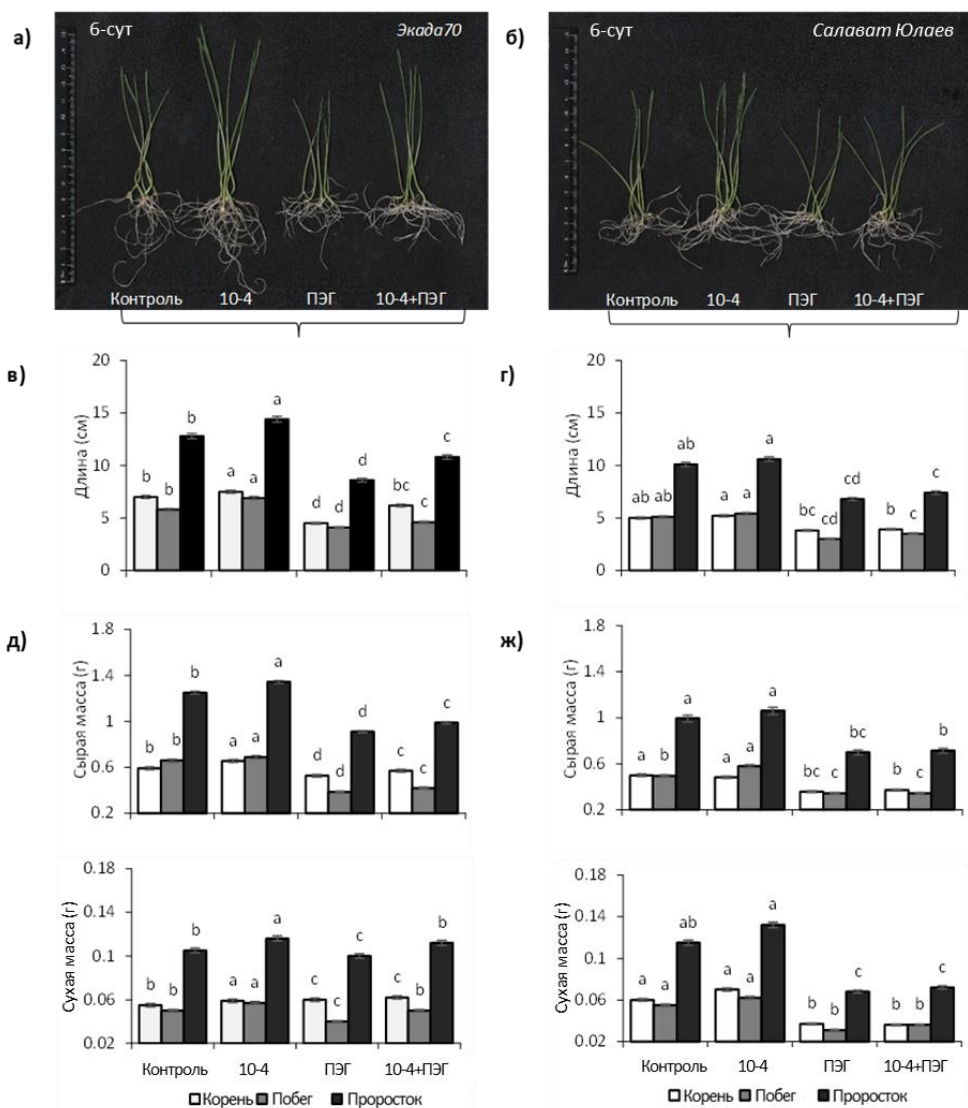


Рис. 4.2. Репрезентативные фотографии инокулированных *B. subtilis* 10-4 проростков пшеницы (6-суток) сортов Экада70 (а) и Салават Юлаев (б) в норме и после 24 часов воздействия 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ), линейные размеры их корней и побегов (в, г), накопление сырой и сухой биомассы (д, ж)

Таким образом, получены приоритетные данные о выраженном защитном эффекте *B. subtilis* при водном дефиците на прорастание семян и начальный рост проростков СВ экотипа,

при отсутствии такового эффекта для ЛСЗ экотипа. Вероятно, торможение бактериями прорастания семян ЛСЗ экотипа при стрессе может являться элементом адаптивной стратегии, минимизирующим энергозатраты на ранних этапах в пользу долгосрочной адаптации.

Влияние инокуляции на концентрацию пролина, целостность и проницаемость мембранных структур клеток в растениях пшеницы при дефиците влаги. Для поддержания водного гомеостаза между основными внутриклеточными компартментами в условиях обезвоживания важная роль принадлежит осмолиту пролину (Ozturk et al., 2021; Du et al., 2023). Как видно из рисунка 4.3, в норме содержание пролина в растениях различалось в зависимости от сорта и их принадлежности к экотипам: проростки устойчивых сортов отличались изначально более высоким содержанием этой аминокислоты (рис. 4.3а,б), чем проростки чувствительных сортов (рис. 4.3в,г). Водный дефицит приводил к транзиторному накоплению пролина во всех растениях, однако, амплитуда колебаний и скорость ответа была достоверно выше у растений сортов Салават Юлаев и Омская35 (рис. 4.3), что свидетельствует о большей их чувствительности к обезвоживанию и согласуется с их адаптивными стратегиями.

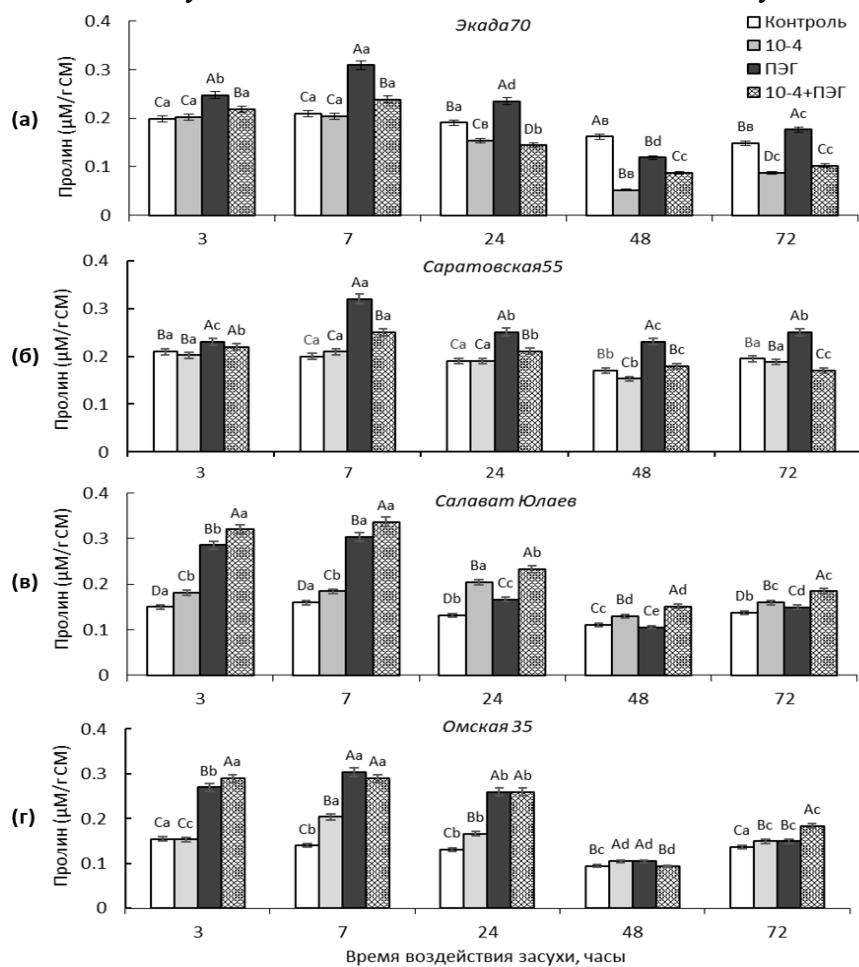


Рис. 4.3. Влияние инокуляции семян *B. subtilis* 10-4 на концентрацию пролина в проростках пшеницы (4–6-сут) сортов Экада70 (а), Саратовская55 (б), Салават Юлаев (в), Омская35 (г) в норме и в условиях дефицита влаги, моделированном 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ)

Инокуляция предотвращала стресс-индуцированное накопление пролина у проростков сортов Экада70 и Саратовская 55 (рис. 4.3а,б); у проростков сорта Омская35 зафиксирован повышенный уровень (рис. 4.3г), а у проростков сорта Салават Юлаев — дополнительное накопление пролина (рис. 4.3в), что, по-видимому, вносит вклад в стабилизацию работы антиоксидантной системы, предотвращая нарушения структур и проницаемости клеточных мембран компартментов клеток растений при стрессе. Действительно, инокуляция снижала в 1,4–1,8 раза уровень вызываемого стрессом ПОЛ и экзоосмоса электролитов (ВЭ) с максимальным эффектом у проростков устойчивых сортов Саратовская55, Экада70 (табл. 4.1).

Таблица 4.1. - Влияние ПЭГ-индуцированного дефицита влаги на уровень ПОЛ (МДА) и выход электролитов (ВЭ) инокулированных и неинокулированных *B. subtilis* 10-4 проростков пшеницы (6-сут)

Сорт пшеницы	МДА, нмоль/г сырой массы				ВЭ, µS/г сырой массы			
	Контроль	10-4	ПЭГ	10-4 + ПЭГ	Контроль	10-4	ПЭГ	10-4 + ПЭГ
Экада70	6,2±0,4	7,3±0,6	19,1±0,5	11,0±0,3	30,3±0,7	32,8±0,4	42,8±0,5	31,3±0,6
Саратовская55	6,0±0,2	6,9±0,5	18,0±0,4	7,9±0,8	30,9±0,6	31,7±0,2	41,2±0,8	32,0±0,3
Салават Юлаев	6,5±0,2	7,9±0,7	25,2±1,2	17,8±0,7	34,2±0,9	34,4±0,6	47,6±0,7	36,6±0,1
Омская35	6,4±0,6	7,0±0,6	23,3±0,9	14,9±0,7	32,1±0,7	33,0±0,3	45,7±1,2	34,3±0,8

Влияние эндофитов *B. subtilis* на водоудерживающую способность (ВС) растений пшеницы при обезвоживании. Как видно из рисунка 4.4, дефицит влаги снижал в 2–2,5 раза ВС листьев растений сортов Омская35, Салават Юлаев (рис. 4.4б) и практически не влиял на этот показатель у растений сортов Саратовская55, Экада70 (рис. 4.4а). Предобработка *B. subtilis* 10-4 и 26Д повышала ВС листьев в норме (кроме растений сорта Салават Юлаев) (рис. 4.4) и практически полностью предотвращала стресс-индуцированное падение этого показателя. Причем при стрессе инокулированные растения сорта Саратовская55 характеризовались значениями ВС, превышающими контроль (рис. 4.4а).

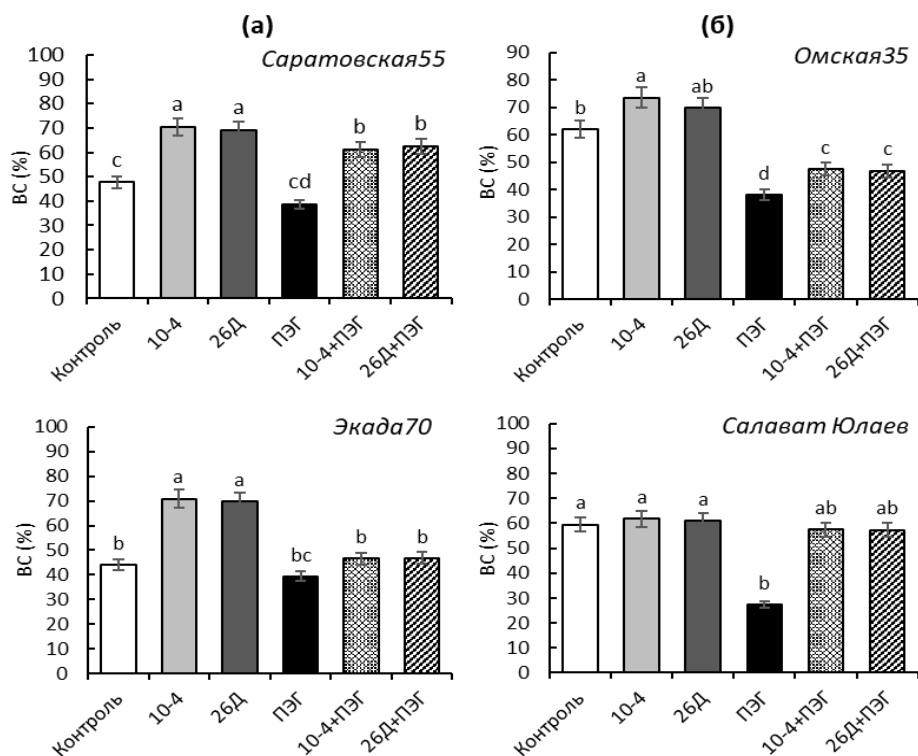


Рис. 4.4. Влияние *B. subtilis* (10-4, 26Д) на водоудерживающую способность (ВС) листьев 21-сут растений пшеницы сортов Саратовская55, Экада70 (а) и Омская35, Салават Юлаев (б) в нормальных условиях произрастания и при воздействии дефицита влаги (12% ПЭГ-6000). Время воздействия стресса 16 сут

Таким образом, совокупность полученных данных демонстрирует, что инокуляция *B. subtilis* повышала устойчивость проростков пшеницы к водному дефициту на начальных этапах онтогенеза с максимальным протекторным эффектом на сортах СВ экотипа (Экада70, Саратовская55), как на уровне клеток (табл. 4.1, рис. 4.4), так и целого организма (без торможения ростовых процессов растений) (рис. 4.1, рис. 4.2). Выявленные межсортные различия в реакции на инокуляцию (рис. 4.1, 4.2), вероятно, обусловлены контрастными адаптивными стратегиями изученных растений. У чувствительных сортов ЛСЗ экотипа, для которых характерны замедленные темпы раннего развития и кущения (что позволяет им хорошо переносить весеннюю засуху) инокуляция может модулировать эти эволюционно сложившиеся программы, что объясняет отсутствие выраженного защитного эффекта в условиях обезвоживания. Напротив, у устойчивых проростков СВ экотипа, запрограммированных на интенсивный стартовый рост, инокуляция синергически усиливала этот процесс, обеспечивая улучшение ростовых параметров в стрессовых условиях. При этом на биохимическом и клеточном уровнях (стабильность мембран, содержание хлорофиллов, ВС листьев) протекторное действие *B. subtilis* проявлялось у растений обоих экотипов (табл. 4.1, рис. 4.4, рис. 6.1). Вместе с тем, выявленные различия в модуляции накопления пролина указывают на способность одного и того же бактериального штамма задействовать различные биохимические пути в зависимости от генетического контекста растения-хозяина. Следовательно, понимание механизмов взаимодействия эндофитных *B. subtilis* с растениями пшеницы с контрастными стратегиями засухоустойчивости является чрезвычайно важным.

ГЛАВА 5. ВКЛАД ГОРМОНАЛЬНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОФИТНЫХ *B. subtilis* НА КОНТРАСТНЫЕ ПО СТРАТЕГИИ АДАПТАЦИИ К ЗАСУХЕ РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ

Роль эндогенных АБК, ИУК и ЦК в *B. subtilis*-опосредованной устойчивости контрастных по адаптивным стратегиям пшеницы при дефиците влаги. Ростстимулирующий и защитный эффект PGP-бактерий может быть обусловлен их влиянием на гормональную систему растений, которая играет лидирующую роль в регуляции роста, развития и стресс-адаптации (Shakirova et al., 2010; 2012; Backer et al., 2018). В нашем исследовании анализ эндогенных АБК, ИУК и ЦК у двух сортов пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями при водном дефиците выявил более высокие исходные уровни ЦК и АБК у проростков сорта Экада70 по сравнению с Салават Юлаев, тогда как уровни ИУК оставались сходными у проростков обоих сортов на протяжении всего эксперимента (рис. 5.1). Очевидно, эти различия в гормональном статусе могут определять, как устойчивость растений к стрессам, так чувствительность к продуцируемым бактериями фитогормональным соединениям.

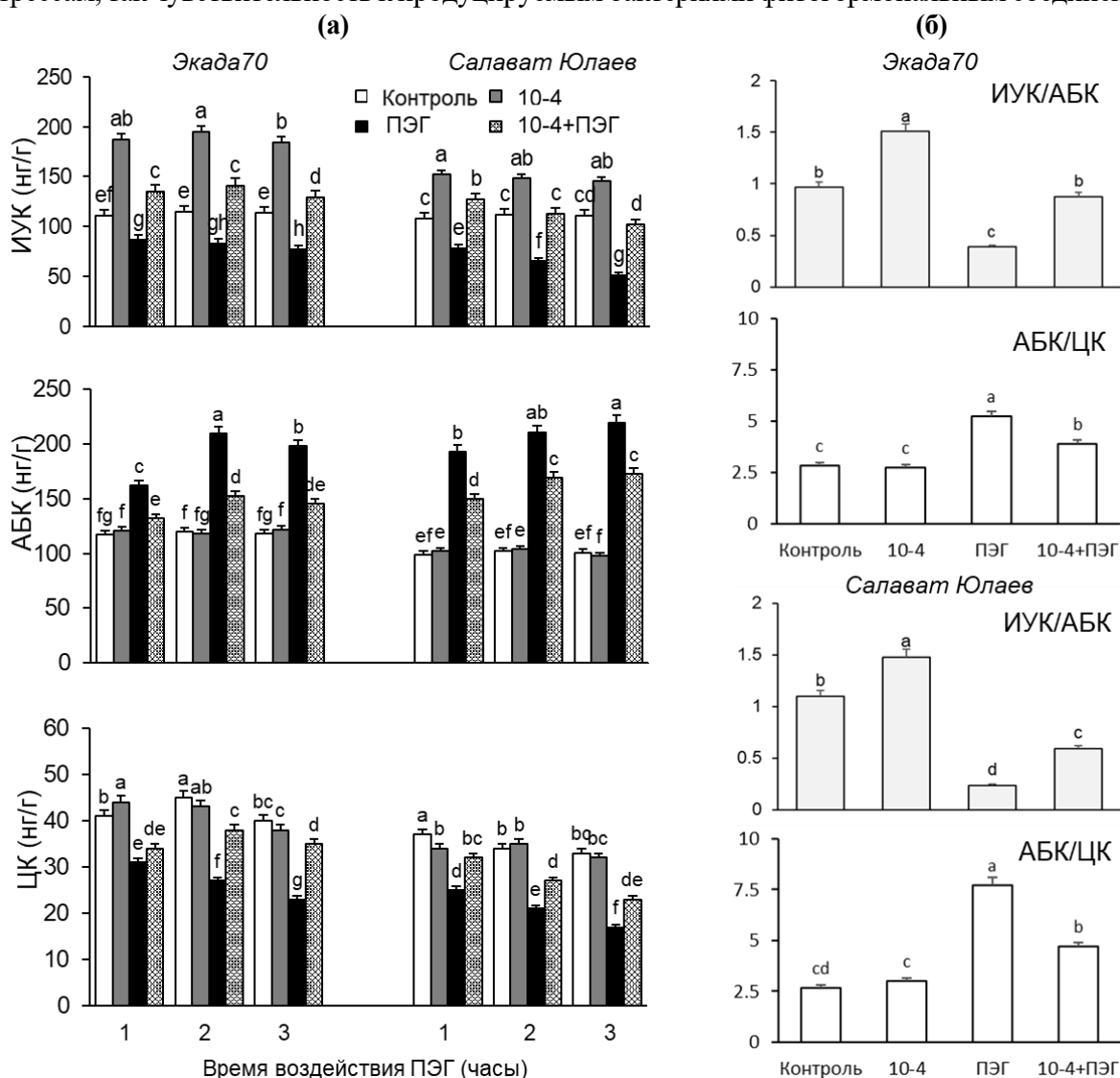


Рис. 5.1. Динамика содержания ИУК, АБК и ЦК (а) и изменение коэффициентов отношения ИУК/АБК и АБК/ЦК (б) в инокулированных и неинокулированных *B. subtilis* 10-4 проростках пшеницы (4-сут) сортов Экада70 и Салават Юлаев при дефиците влаги (ПЭГ) в течение 3 ч

Установлено, что в нормальных условиях произрастания стимуляция роста инокулированных растений обоих сортов пшеницы (рис. 4.2) связана с тонкой перестройкой гормонального баланса в сторону накопления ИУК (рис. 5.1). Так, инокуляция приводила к 1,5-

кратному (Салават Юлаев) и 2-кратному (Экада70) увеличению содержания ИУК (рис. 5.1а), в то время как уровни АБК и ЦК оставались относительно стабильными (рис. 5.1б,в). Более значительное усиление ростовых процессов растений сорта Экада70 (по сравнению с растениями сорта Салават Юлаев) (рис. 4.2), по-видимому, обусловлено более выраженным увеличением пула ИУК. При дефиците воды у контрольных растений наблюдался характерный гормональный дисбаланс: резкое увеличение АБК (особенно у растений сорта Салават Юлаев) (рис. 5.1б) на фоне снижения уровней ИУК (рис. 5.1а) и ЦК (рис. 5.1в), что коррелировало с угнетением роста (рис. 4.2). Эти изменения согласуются с типичным стресс-ответом растений, описанным в литературе (Llanes et al., 2016; Rowe et al., 2016). Инокуляция оказала выраженный протекторный эффект, особенно у растений сорта Экада70, смягчив стресс-индуцированные гормональные сдвиги. У инокулированных растений отмечено поддержание уровня ИУК близким к контролю (рис. 5.1 а), менее значительное стресс-индуцированное накопление АБК (рис. 5.1б) и минимальное снижение уровня ЦК (рис. 5.1в), что отразилось в нормализации роста (рис. 4.2).

Полученные данные позволяют заключить, что повышение устойчивости растений к обезвоживанию связано со стабилизацией фитогормонального гомеостаза и поддержанием активности синтетических процессов на высоком уровне, обеспечивающих нормальное развитие проростков в условиях стресса. Вместе с тем, результаты указывают на потенциальное участие ЦК в механизме устойчивости, о чем свидетельствует более высокий нативный их уровень у проростков сорта Экада70 (рис. 5.1в). Однако, эндогенные ЦК, по-видимому, не опосредуют прямое физиологическое действие *B. subtilis* 10-4, поскольку значимых изменений в их содержании у инокулированных проростков в норме не выявлено, а при стрессе отмечено снижение ЦК (рис. 5.1в) на фоне выраженной (выше контроля) аккумуляции ИУК (рис. 5.1а). Это может быть обусловлено тем, что штамм 10-4, как было установлено нами ранее (Lastochkina et al., 2023b), продуцирует в основном ауксины, а не ЦК. По-видимому, способность *B. subtilis* 10-4 к продукции ИУК и АБК играет значительную роль в реализации ростстимулирующего и антистрессового эффектов соответственно, которые осуществляются через модуляцию фитогормонального баланса (рис. 5.1). Подтверждением этому служат данные полногеномного секвенирования, выявившие у штамма 10-4 наличие генов (*trpA-F*, *dhaS*, *epsN*), ассоциированных с метаболизмом ауксинов (см. главу 9).

Влияние эндофитных *B. subtilis* на компоненты клеточных стенок корней (лигнин, суберин). Усиление синтеза лигнина, суберина и их отложения в оболочках клеток вносит важный вклад в формирование стресс-устойчивости растений (Moura et al., 2010; Nedukha, 2022; Choi et al., 2023; Riaz et al., 2023). Учитывая способность *B. subtilis* 10-4 повышать (в разной степени) устойчивость к водному дефициту у растений обоих экотипов пшеницы на уровне клеток, одновременно увеличивая содержание эндогенной АБК, представляло интерес изучение влияния инокуляции на отложение в корнях пшеницы лигнина как АБК-регулируемого биохимического компонента клеток, вносящего важный вклад в формирование стресс-устойчивости растений. При дефиците воды лигнификация клеточных стенок снижает потерю влаги, поддерживая осмотический баланс клетки, а суберин формирует гидрофобный барьер, что в совокупности повышает выживаемость растений (Liu et al., 2018; Choi et al., 2023). Следует отметить, что к моменту начала нашей работы в литературе отсутствовала информация о влиянии эндофитных PGP-бактерий на лигнификацию и суберинизацию растений, включая генотипы пшеницы с контрастными стратегиями ответа на дефицит влаги. В связи с этим, далее была изучена взаимосвязь между колонизацией растений эндофитом *B. subtilis* 10-4, синтезом лигнина, суберина и их отложением в оболочках клеток. Методами световой и конфокальной микроскопии выявлено, что после 24 ч инкубации проростков в ПЭГ усиливалось отложение лигнина в корнях пшеницы, преимущественно в клеточных стенках центрального цилиндра и слабее - в клетках перидикла и первичной коры (рис. 5.2.1).

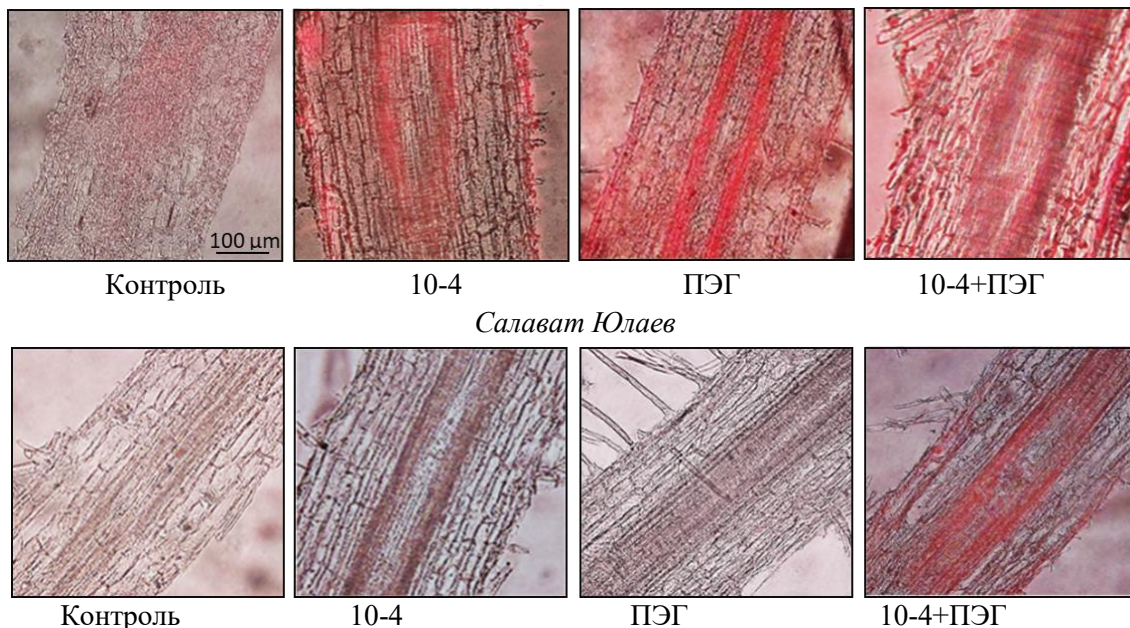


Рис. 5.2.1. Влияние *B. subtilis* 10-4 на отложение лигнина в базальной части корней проростков пшеницы в норме и при дефиците влаги (ПЭГ) (окрашивание по Фурсту). Время воздействия стресса – 24 ч (4-сут проростки, выращенные в нормальных условиях, были пересажены в раствор 12% ПЭГ-6000 на 24 ч)

Как видно (рис. 5.2.1), интенсивность лигнификации была выше у растений сорта Экада70, особенно в клетках центрального цилиндра и первичной коры, что может отражать генетическую их стресс-адаптивность на ранних этапах онтогенеза. Примечательно, что в нормальных условиях произрастания растения сорта Экада70 также демонстрировали более активное накопление лигнина в базальной части корней, чем растения сорта Салават Юлаев, у которых отложение было минимальным. Это, вероятно, связано с изначально меньшей стресс-устойчивостью второго сорта. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении суберина (рис. 5.2.2, 5.2.3). Несмотря на способность некоторых эндофитных *Bacillus* spp. разлагать лигнин растений (Abd-Elsalam, El-Hanafy, 2009), инокуляция *B. subtilis* 10-4 стимулировала его накопление в клеточных стенках корней до стресса и дополнительно усиливала при обезвоживании (особенно для сорта Экада70) (рис. 5.2.1, рис. 5.2.2а).

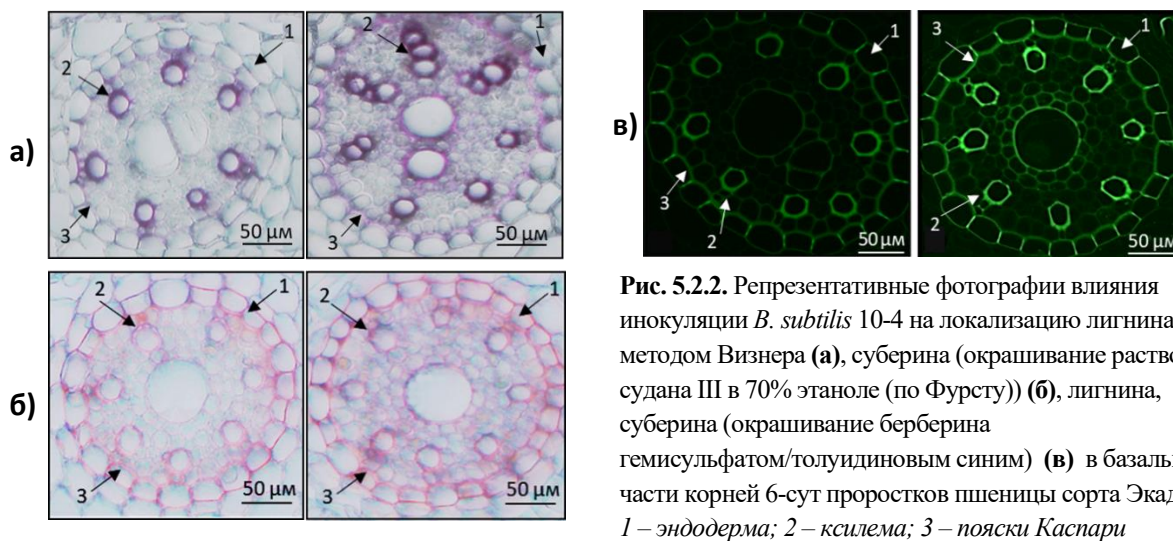


Рис. 5.2.2. Репрезентативные фотографии влияния инокуляции *B. subtilis* 10-4 на локализацию лигнина методом Визнера (а), суберина (окрашивание раствором судана III в 70% этаноле (по Фурсту)) (б), лигнина, суберина (окрашивание берберина гемисульфатом/толуидиновым синим) (в) в базальной части корней 6-сут проростков пшеницы сорта Экада70. 1 – эндодерма; 2 – ксилема; 3 – пояски Каспари

Наблюдалось повышение лигнификации сосудов ксилемы, метаксилемы и U-образных клеточных стенок эндодермы 6-сут инокулированных проростков по сравнению с контролем, а также ускорение дифференцировки тканей в базальной зоне корня (рис. 5.2.1, рис. 5.2.2а).

Кроме того, *B. subtilis* 10-4 стимулировал отложение суберина в сосудах ксилемы, метаксилемы и паренхимных клетках центрального цилиндра (рис. 5.2.26).

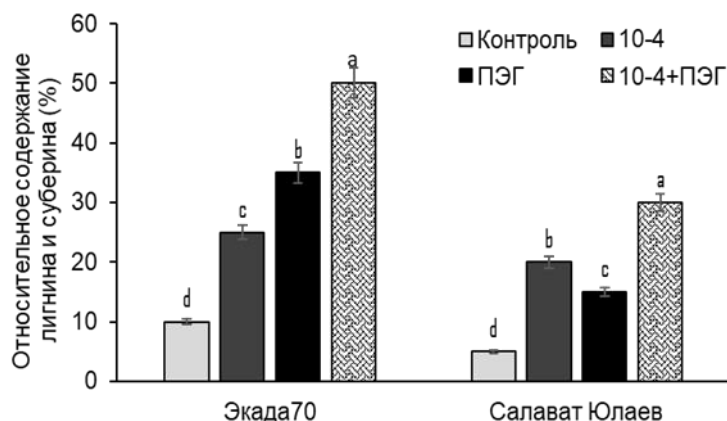


Рис. 5.2.3. Локализация лигнина и суберина в центральном цилиндре базальной части корней 6-сут проростков пшеницы, окрашенных берберина гемисульфатом/толуидиновым синим при инокуляции *B. subtilis* 10-4 в норме и при 24 ч воздействии ПЭГ. Количественная оценка визуального эффекта с помощью ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>)

Полученные результаты подчеркивают значительную роль эндогенной АБК в регуляции *Bacillus*-опосредованного ускорения отложения лигнина и суберина в клетках корней (рис. 5.2.3), что способствует укреплению барьерных свойств клеточных стенок и снижает повреждающее действие дефицита влаги, формируя адаптационную устойчивость растений. В пользу этого указывают данные об ослаблении развития ПЭГ-индуцированного окислительного и осмотического стрессов в инокулированных растениях (табл. 4.1, рис. 4.3). Важно отметить, что выявленное эндофит-индуцированное накопление лигнина (рис. 5.2.1, рис. 5.2.2а) не препятствовало ростстимулирующему эффекту (рис. 5.2), вероятно, из-за способности бактерий продуцировать ИУК (Lastochkina et al., 2023b) и модулировать уровни эндогенного его содержания в растениях (рис. 5.1а), а также синтезировать другие метаболиты с рострегулирующими свойствами (см. главу 9).

Ингибиторный анализ роли СК в *Bacillus*-опосредованных защитных реакциях проростков пшеницы в условиях водного дефицита. СК является ключевым сигналом для защиты растений от биотрофных патогенов, однако, многие RGP-бактерии, колонизируя ризосферу, незначительно повреждают корень и выделяют особые молекулы (MAMPs – микробно-ассоциированные молекулярные паттерны), распознаваемые растениями как «сигнал тревоги», что приводит к локальному всплеску синтеза СК в корнях и к запуску каскада защитных реакций, ведущих к системной устойчивости. Отдельного внимания заслуживает выявленная нами продукция эндофитом *B. subtilis* 10-4 (52 нг/мл) СК – важного фитогормона в регуляции роста/развития растений и растительно-микробных взаимодействий. Современные данные демонстрируют способность СК напрямую влиять на состав корневого микробиома, регулируя колонизацию определенными бактериальными таксонами (Lebeis et al., 2015). Различные штаммы бактерий используют СК по-разному: как сигнал роста или как источник углерода (Lebeis et al., 2015). Однако неясно, какую роль СК играет в опосредованной эндофитами засухоустойчивости пшеницы и каким путем вырабатывается СК в этих условиях.

Обнаружено, что в нормальных условиях произрастания у растений устойчивых сортов Экада70, Саратовская55 содержание эндогенной СК существенно выше (400 нг/г сырой массы), чем у растений чувствительных сортов Салават Юлаев и Омская35 (50 нг/г сырой массы) (рис. 5.3.1а). Инокуляция повышала в 1,3–3 раза уровень эндогенной СК во всех вариантах (рис. 5.3.1) с максимальными значениями у растений устойчивых сортов (рис. 5.3.1а) (Lastochkina et al., 2020a), что коррелирует с показателями роста (рис. 4.2) и ВС листьев (рис. 4.3). Это сопровождалось усилением транскрипционной активности гена *PR-1* (признанного маркера развития салицилатного сигнального пути защиты) с максимальными значениями для устойчивых растений (рис. 5.3.1b) и с минимальными – для чувствительных растений (рис. 5.3.1b). (Lastochkina et al., 2020a).

Установлено сорт-зависимое накопление эндогенной СК в ответ на инокуляцию *B. subtilis* 10-4: проростки сорта Экада70 имели более быструю реакцию, в отличие от запоздалой у сорта Салават Юлаев. В условиях стресса инокуляция снижала стресс-

индуцированное накопление СК (рис. 5.3.3), что, в целом было сопоставимо с данными о влиянии на рост растений при стрессе (рис. 4.2). Выявленная связь параметров роста с ВС, накоплением эндогенной СК и транскриптов *PR-I* гена под влиянием *B. subtilis* свидетельствуют в пользу участия этого фитогормона в эндофит-индуцированной системной устойчивости растений к водному дефициту.

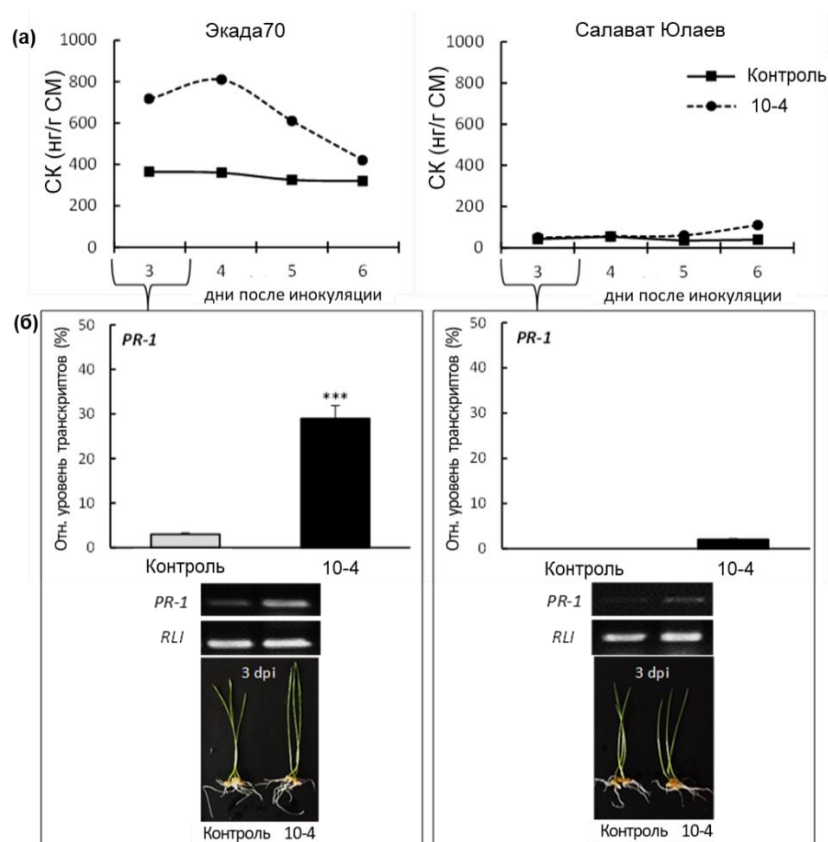


Рис. 5.3.2. Влияние ингибитора биосинтеза СК 1-аминобензотриазола (ABT) (100 мМ) на способность *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани 3-сут проростков пшеницы. Красные стрелки указывают на рост *B. subtilis* вокруг сегментов проростков

Для проверки этого предположения нами был проведен анализ влияния ингибитора биосинтеза СК 1-аминобензотриазола (ABT) (100 мМ) на эндогенный уровень СК в инокулированных *B. subtilis* 10-4 и подвергнутых водному дефициту проростках пшеницы СВ и ЛЗС экотипов (Lastochkina et al., 2022b) в сочетании с параметрами устойчивости на клеточном (МДА, пролин) и организменном (рост) уровнях. Следует отметить, что применение ABT не предотвращало способности *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани проростков обоих сортов пшеницы (рис. 5.3.2), но снижало индуцируемую этими бактериями эндогенную СК до уровня контрольных вариантов (рис. 5.3.3). Это сопровождалось предотвращением ростстимулирующего и защитного эффекта бактерий на эти растения при стрессе (рис. 5.3.4). В частности, при совместном применении *B. subtilis* 10-4 и ABT рост растений (рис. 5.3.4а–г), ВС листьев (рис. 5.3.4з), уровень МДА (рис. 5.3.4д) и содержание

пролина (рис. 5.3.4ж) были сопоставимы с контролем. Эти данные указывают на то, что эндогенная СК выступает гормональным интермедиатом в реализации антистрессового эффекта *B. subtilis* 10-4 у контрастных по стратегии засухоустойчивости растений пшеницы. Кроме того, результаты указывают на индукцию системной устойчивости растений при инокуляции *B. subtilis* 10-4 (или MIST) через СК-зависимый сигнальный каскад.

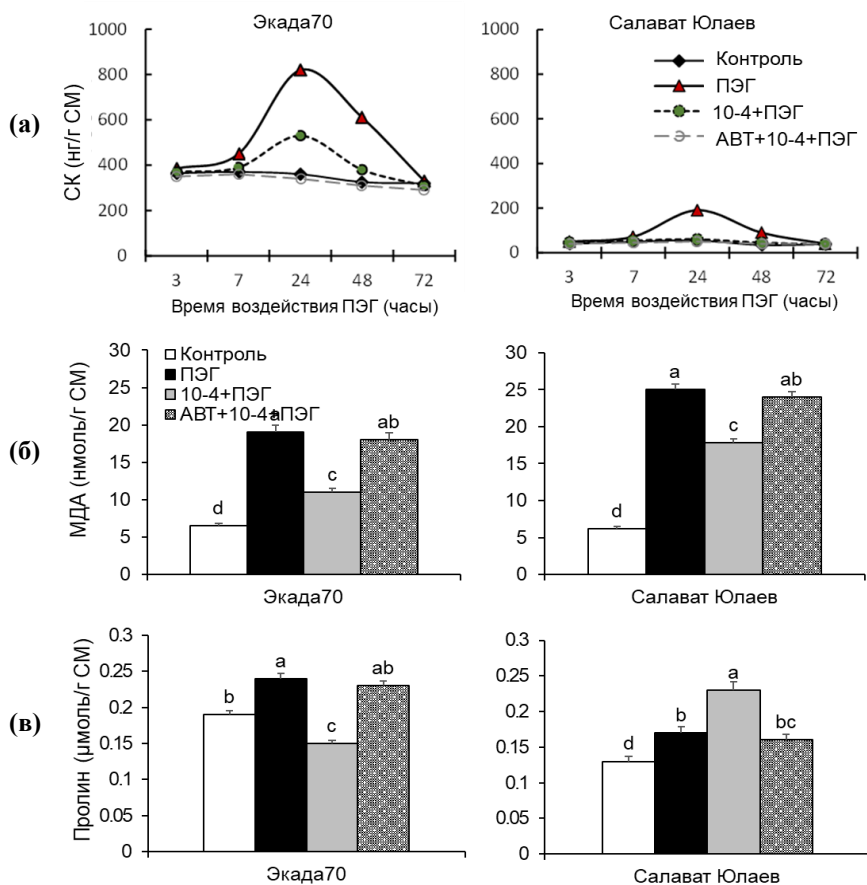


Рис. 5.3.3. Влияние ингибитора биосинтеза СК (АВТ, 100 мМ) на накопление эндогенной СК (а), МДА (б) и пролина (в) в инокулированных *B. subtilis* 10-4 проростках пшеницы при водном дефиците (ПЭГ). 3-сут проростки перемещались в 12%ПЭГ-6000 на 24 ч (МДА, пролин), 72 ч (СК)

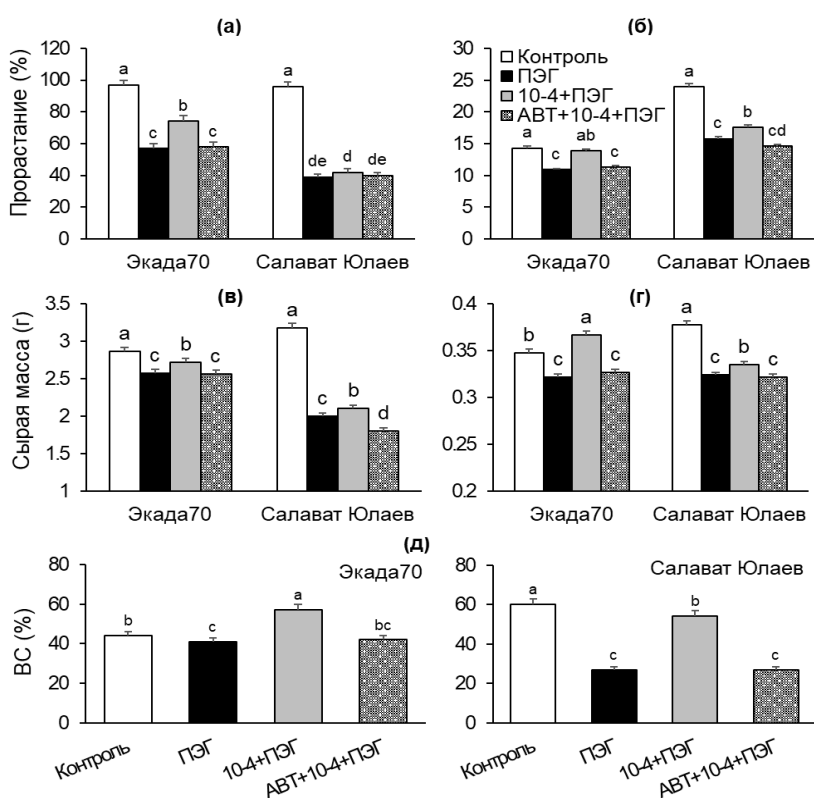


Рис. 5.3.4. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 совместно с ингибитором биосинтеза СК (АВТ, 100 мМ) на прорастание семян (а), длину проростков (б), их сырую (в) и сухую массу (г), и водоудерживающую способность листьев (BC) (д) пшеницы сортов Экада70 (устойчивый) и Салават Юлаев (чувствительный), подвергнутых 24 ч воздействию 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ)

Суммирование полученных в данной главе данных позволяет заключить, что эндофитный штамм *B. subtilis* 10-4 в оптимальной для стимуляции роста концентрации 10^5 КОЕ/мл оказывает дифференцированный защитный эффект на растения пшеницы устойчивых (Экада70, Саратовская55; СВ экотип) и чувствительных (Салават Юлаев, Омская35; ЛЗС экотип) сортов, обусловленный сдвигами в состоянии гормональной системы в ходе инокуляции. Ростстимулирующий эффект обусловлен быстрым 1,5-кратным (Салават Юлаев) и 2-кратным (Экада70) накоплением ИУК на фоне отсутствия изменений в концентрации ЦК и АБК, тогда как антистрессовый эффект – с предотвращением стресс-индуцированного падения ИУК и уменьшением амплитуды сдвигов в уровне АБК и ЦК, а также модуляцией биосинтеза эндогенной СК. Ингибиторный анализ позволил получить экспериментальные доводы в пользу выполнения эндогенной СК роли гормонального интермедиата в реализации предадаптирующего и защитного действия *B. subtilis* 10-4 на растения с контрастными стратегиями засухоустойчивости, тогда как ИУК обеспечивает поддержку роста, нивелируя возможные негативные эффекты усиленной лигнификации. Таким образом, наблюдаемые процессы регулируются комплексным взаимодействием гормональных сигналов (АБК, СК, ИУК), где АБК доминирует в структурной адаптации, а СК и ИУК опосредуют системные и ростовые реакции. Полученные сведения углубляют понимание ранних реакций у контрастных по стратегии адаптации к засухе экотипов пшеницы на инокуляцию эндофитными *B. subtilis*. Установленная взаимосвязь между эндофит-опосредованной гормональной сигнализацией (СК, АБК), усилением барьерных функций тканей (синтез лигнина, суберина) и устойчивостью к обезвоживанию открывает перспективы для разработки стратегий выращивания злаковых культур в нестабильных условиях.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ И КЛЕТОК ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *B. subtilis* НА СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У КОНТРАСТНЫХ ПО АДАПТИВНЫМ СТРАТЕГИЯМ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

Анализ содержания фотосинтетических пигментов в листьях инокулированных *B. subtilis* проростков пшеницы при водном дефиците. Фотосинтез (ФС) является одним из основных процессов первичного метаболизма растений, непосредственно связанных с их продуктивностью и чувствительностью к стрессам (Ahmad et al., 2018; Todorova et al., 2022). Воздействие ПЭГ-индуцированного дефицита влаги в течение 24 ч снижало содержание Хл а, Хл b и Кар в 6-сут проростках пшеницы обоих сортов (рис. 6.1). Инокуляция не только препятствовала деградации ФС пигментов при стрессе, но и увеличивала их содержание в проростках устойчивого сорта Экада70.

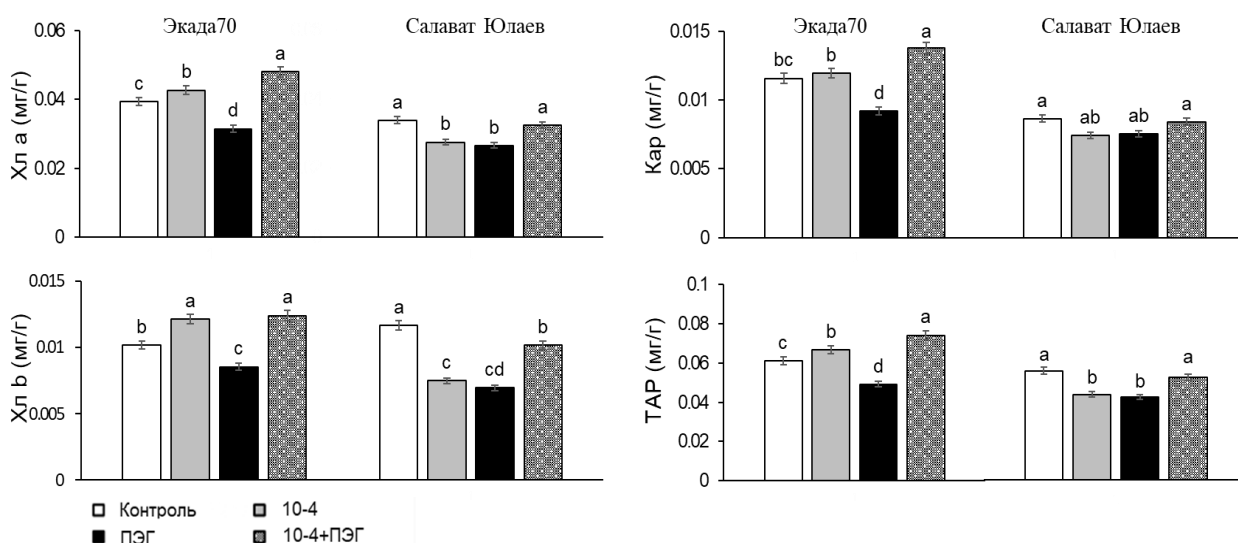


Рис. 6.1. Влияние эндофитных *B. subtilis* (10-4, 26Д) и дефицита влаги (ПЭГ) на содержание фотосинтетических пигментов хлорофилла (Хл) а, Хл b, каротиноидов (Кар) и общее количество пигментов (ТАР) в листьях 6-сут проростков пшеницы. Время воздействия стресса – 24 ч

В норме содержание ФС пигментов у инокулированных 6-сут проростков сорта Экада70 увеличивалось в 1,1–1,2 раза; тогда как у проростков сорта Салават Юлаев было ниже в 1,2–1,3 раза (рис. 6.1), что может указывать на временную физиологическую перестройку их метаболизма (перераспределение ресурсов) и являться частью адаптивной стратегии, на что указывает повышенный уровень Хл а, Хл b и Кар в инокулированных 16-сут растениях сорта Салават Юлаев (рис. 8.3). В целом, результаты свидетельствуют о более быстрой адаптации инокулированных 6-сут проростков сорта Экада70 к стрессу, в сравнении с таковыми сорта Салават Юлаев, демонстрирующему запоздалые и менее выраженные защитные реакции в ранние стадии онтогенеза.

Влияние инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) на параметры фотосистемы II (ФСII) растений пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями при дефиците воды. Эффективность работы ФСII является интегральным показателем стресс-реакции, а усиление регулируемой тепловой диссипации световой энергии (Y(NPQ)) ФСII – важным механизмом защиты ФСII от повреждений (Ruban, 2016). Установлено, что инокуляция эндофитами *B. subtilis* (10-4, 26Д) оказывала стресс-протекторный эффект на фотохимическую активность ФСII у обоих исследуемых сортов пшеницы на ранних этапах онтогенеза (рис. 6.2).

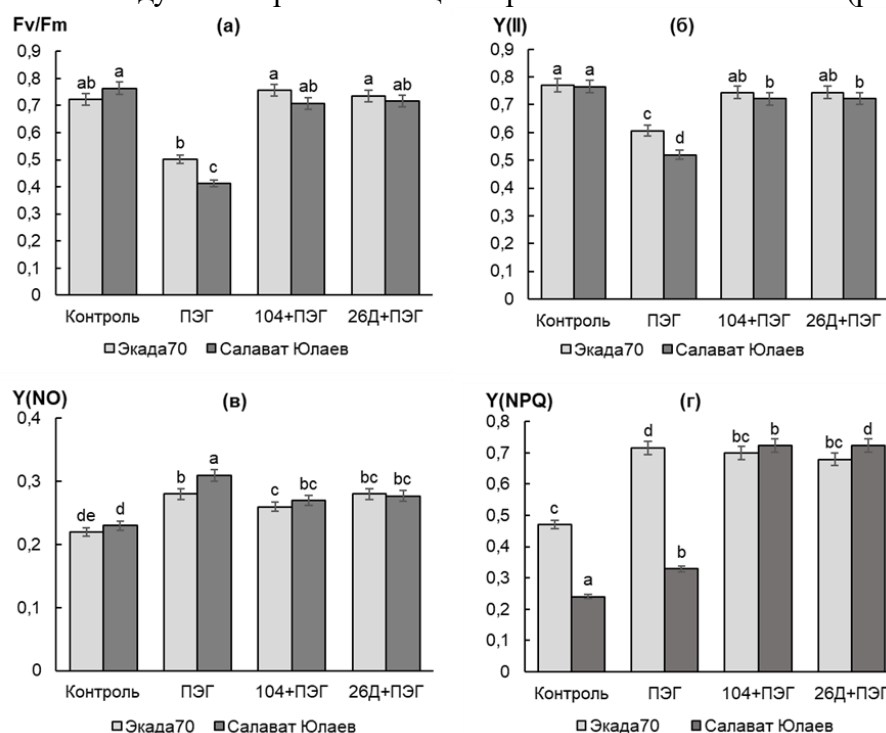


Рис. 6.2. Влияние инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) и дефицита влаги (ПЭГ) на флуоресцентные параметры фотосистемы II: максимальная фотохимическая эффективность Fv/Fm (а), эффективный квантовый выход Y(II) (б), квантовый выход нерегулируемой Y(NO) (в) и регулируемой диссипации световой энергии (Y(NPQ)) (г) в листьях 10-сут проростков пшеницы (время воздействия стресса – 6 сут)

Инокуляция повышала (относительно контроля) максимальный (Fv/Fm) (рис. 6.2а) и эффективный Y(II) квантовые выходы (рис. 6.2б), снижала квантовый выход нерегулируемой диссипации энергии (Y(NO)) ФСII (рис. 6.2в). Воздействие стресса снижало показатель Fv/Fm (рис. 6.2а) и повышало Y(NO) (рис. 6.2б), что полностью согласуется с общепринятой моделью, согласно которой окислительный стресс приводит к повреждению реакционных центров ФСII, в частности, деградации ключевого белка D1 (Huseynova et al., 2007; Khalvandi et al., 2021), а также к нарушению липидного бислоя тилакоидных мембран. Причем максимальная амплитуда этих изменений отмечена для проростков сорта Салават Юлаев, очевидно, вследствие их генетически обусловленной чувствительности к засухе в начальные стадии развития (рис. 4.1). Поддержание функциональной активности ФСII при стрессе может быть обусловлено задержкой (препятствованием) эндофитами деградации основных фотосинтетических пигментов (рис. 6.1). Кроме того, на этапе стресса наблюдалось увеличение Кар в инокулированных растениях (рис. 6.1), что может повышать клеточный антиоксидантный потенциал, понижая тем самым интенсивность вызываемого водным дефицитом окислительного стресса (табл. 4.1). Так как известно, что Кар нейтрализуют синглетный кислород и подавляют образование свободных

радикалов приводя к снижению уровня ПОЛ. Выявленное снижение окислительных повреждений ФСII может быть результатом как предотвращения образования АФК за счет высокого NPQ, так и их нейтрализации за счет антиоксидантов, что рассмотрено в главе 7.

Влияние инокуляции *B. subtilis* на морфометрические характеристики устьиц проростков пшеницы с разными адаптивными стратегиями при дефиците воды. Ключевым механизмом долгосрочной адаптации растений к абиотическим стрессам является морфологическая перестройка устьичного аппарата (изменение плотности и размеров устьиц), направленная на установление баланса между поглощением CO₂ для фотосинтеза и минимизацией потерь воды (Marček et al., 2019; Mickky et al., 2020). Микроскопический анализ продемонстрировал (рис. 6.4) выраженные межсортовые различия в организации устьичного аппарата: у проростков сорта Экада70 наблюдались более мелкие и компактные устьица, тогда как у проростков сорта Салават Юлаев преобладал удлиненный тип устьиц с более развитыми замыкающими клетками (рис. 6.3а,б). Компактные устьица оптимизируют водопользование, ограничивая транспирацию без критического снижения поглощения CO₂, а крупные устьица обеспечивают интенсивный газообмен в благоприятных условиях, но повышают риск обезвоживания при стрессе из-за увеличенной площади устьичной щели (Hetherington, Woodward, 2003; Tatar et al., 2023). При инокуляции в нормальных условиях произрастания выявлена тенденция к увеличению (на 10–23%) плотности устьиц у обоих сортов (рис. 6.4).

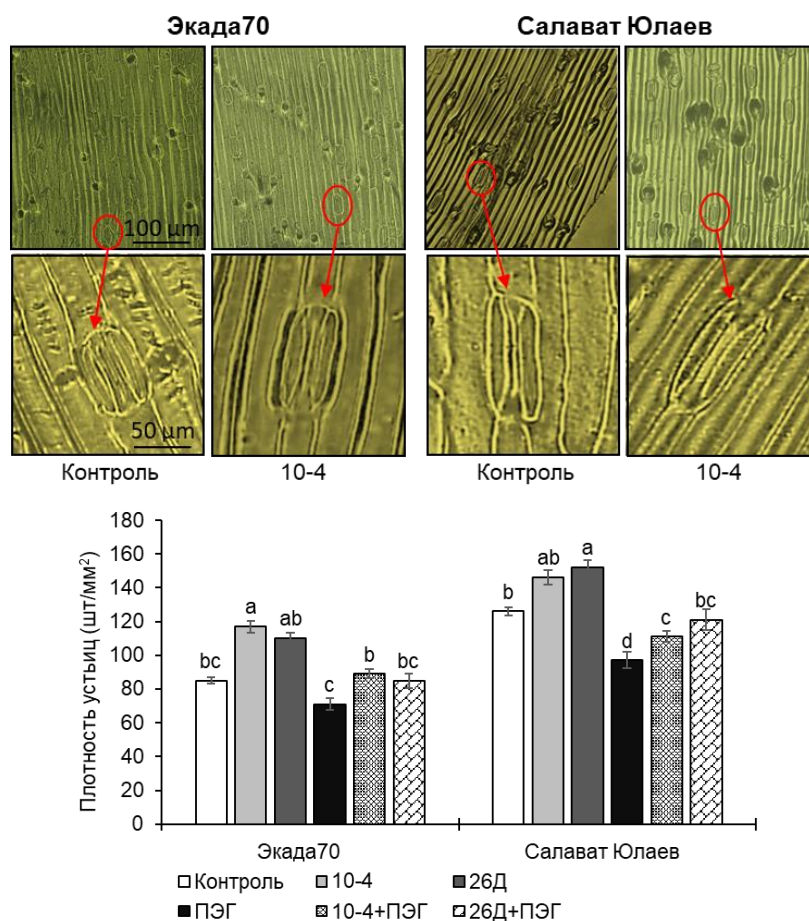


Рис. 6.3. Репрезентативные фотографии эпидермальных отпечатков поверхности листьев 5-сут проростков пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев с использованием бесцветного лака и визуализацией на электронном микроскопе Biozero. Красными стрелками отмечены отдельные устьица

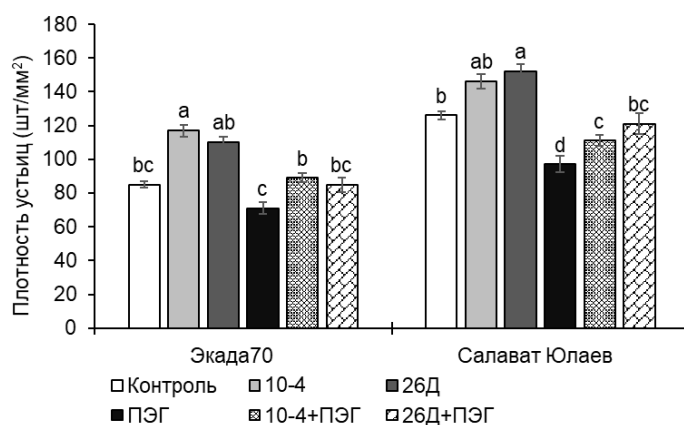


Рис. 6.4. Изменение плотности устьиц у растений пшеницы при инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) и воздействии ПЭГ-индуцированного дефицита воды (10 сут проростки, время воздействия стресса – 6 сут)

Воздействие дефицита воды снижало плотность устьиц, особенно у растений чувствительного сорта. Инокуляция препятствовала стресс-индуцированному снижению плотности устьиц и их закрытию, с выраженным эффектом для проростков сорта Экада70, где картина была сопоставима с контролем (рис. 6.4), свидетельствуя об их повышенной устойчивости к обезвоживанию. Результаты о состоянии устьиц согласуются с адаптационными стратегиями развития исследуемых сортов и данными по ВС листьев (рис. 4.4), параметрами водного обмена (повышенного уровня транспирации (ТИ), относительного содержания воды (ОСВ) и

осмотического потенциала клеточного сока) (Lubyanova et al., 2023), а инокуляция демонстрирует «перепрограммирование» устьичной реакции чувствительного сорта, приближая их к устойчивым; тогда как устойчивые сорта сохраняют/усиливают преимущества.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о стресс-протекторном эффекте эндофитных *B. subtilis* на параметры фотосинтеза (включая предотвращение деградации хлорофиллов и регуляцию фотохимической активности ФСII) растений пшеницы с контрастными стратегиями адаптации при водном дефиците посредством повышения максимального (F_v/F_m) и эффективного $Y(II)$ квантовых выходов, снижения квантового выхода нерегулируемой диссипации энергии ($Y(NO)$) ФСII. В основе этого эффекта могут лежать антиоксидантные свойства эндофитов и их способность защищать ФС пигменты, оптимизировать работу устьиц и эффективность водопользования при водном дефиците.

ГЛАВА 7. ВКЛАД КОМПОНЕНТОВ ASA-GSH КОМПЛЕКСА В ВЫЗЫВАЕМУЮ ЭНДОФИТНЫМИ *B. subtilis* СТАБИЛИЗАЦИЮ РЕДОКС-СТАТУСА У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ С КОНТРАСТНЫМИ СТРАТЕГИЯМИ АДАПТАЦИИ ПРИ ОБЕЗВОЖИВАНИИ

Баланс между окислительными и восстановительными процессами в клетке (редокс-гомеостаз) имеет важное значение для нормального функционирования и выживаемости растений при стрессе (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020). Ключевая роль в стабилизации редокс-статуса отводится AsA-GSH циклу, где наиболее важными участниками в прямой нейтрализации избыточных АФК являются неферментативные антиоксиданты AsA и GSH. Несмотря на способность PGP-бактерий снижать окислительные стрессы, в литературе в основном встречаются сведения об их влиянии на содержание таких антиоксидантных ферментов, как СОД, КАТ, ПО. Однако неясно, как именно они влияют на метаболизм AsA-GSH и каков их вклад в эндофит-опосредованную устойчивость пшеницы с различными стратегиями адаптации к обезвоживанию. В связи с этим нами была проведена оценка влияния инокуляции *B. subtilis* 10⁻⁴ на окислительный статус (МДА, H₂O₂) и компоненты AsA-GSH комплекса (AsA, GSH, GSSG, APX, GR) у подвергнутых водному дефициту растений пшеницы с контрастными стратегиями засухоустойчивости на ранних стадиях онтогенеза.

Оценка уровня генерации H₂O₂ и перекисного окисления липидов (ПОЛ). Водный дефицит резко увеличивал генерацию H₂O₂ (в 1,3–3 раза) (рис. 7.1а,б), коррелируя с накоплением МДА (рис. 7.1в) и ВЭ (табл. 4.1), и приводил к истощению AsA и GSH (рис. 7.2а–г), особенно в проростках чувствительного сорта Салават Юлаев (рис. 7.2б,г), сопровождаясь активацией APX и GR (рис. 7.3б,г).

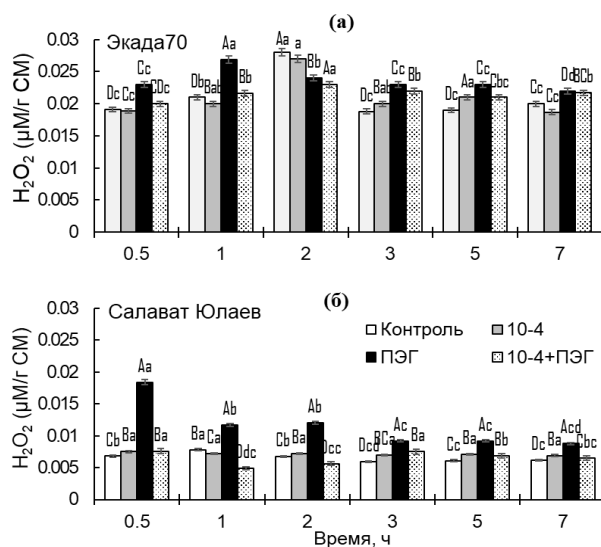
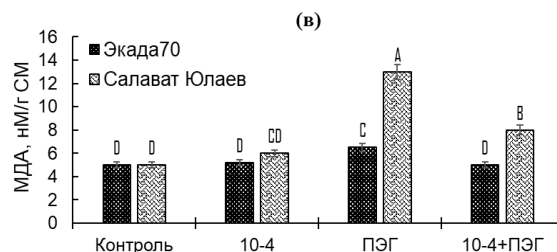


Рис. 7.1. Влияние эндофита *B. subtilis* 10⁻⁴ на уровни пероксида водорода (H₂O₂) (а,б) и МДА (в) в проростках пшеницы в норме и при водном дефиците (ПЭГ)



Инокуляция оказывала защитный эффект от окислительных повреждений, на что указывает снижение в растениях обоих сортов уровня H₂O₂ и ПОЛ (рис. 7.1), как результат нейтрализации избытков АФК при стрессе и сохранение целостности мембран клеток (табл. 4.1), что проявляется в улучшении роста (рис. 4.2). Примечательно, что в норме (до стресса) концентрация H₂O₂ была выше у проростков сорта Экада70 (рис. 7.1а) по сравнению с

проростками сорта Салават Юлаев (рис. 7.1б), а инокуляция незначительно увеличивала уровень H_2O_2 , что может играть важную роль в биохимических процессах, связанных с биосинтезом суберина и лигнина (рис. 5.2.1, рис. 5.2.2) (Cabane et al., 2012).

Анализ содержания аскорбата (AsA) и глутатиона (GSH). Впервые выявлено различие в содержании AsA и GSH у контрастных по стратегиям засухоустойчивости проростков пшеницы на начальных стадиях онтогенеза (рис. 7.2). В норме содержание GSH (рис. 7.2в) было достоверно выше (на 124%) у проростков сорта Экада70 по сравнению с проростками сорта Салават Юлаев (рис. 7.2г), которые, в свою очередь, характеризовались повышенным (на 160%) содержанием AsA (рис. 7.2б). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 индуцировала аккумуляцию AsA в проростках обоих сортов в норме (рис. 7.2а,б), наиболее выраженную у проростков устойчивого сорта Экада70 (до 150% от контроля) (рис. 7.2а). При этом значимых изменений в пуле GSH, а также уровне его окисленной формы (GSSG) не обнаружено (рис. 7.2д,е), что указывает об отсутствии негативного воздействия бактерий на редокс-статус проростков.

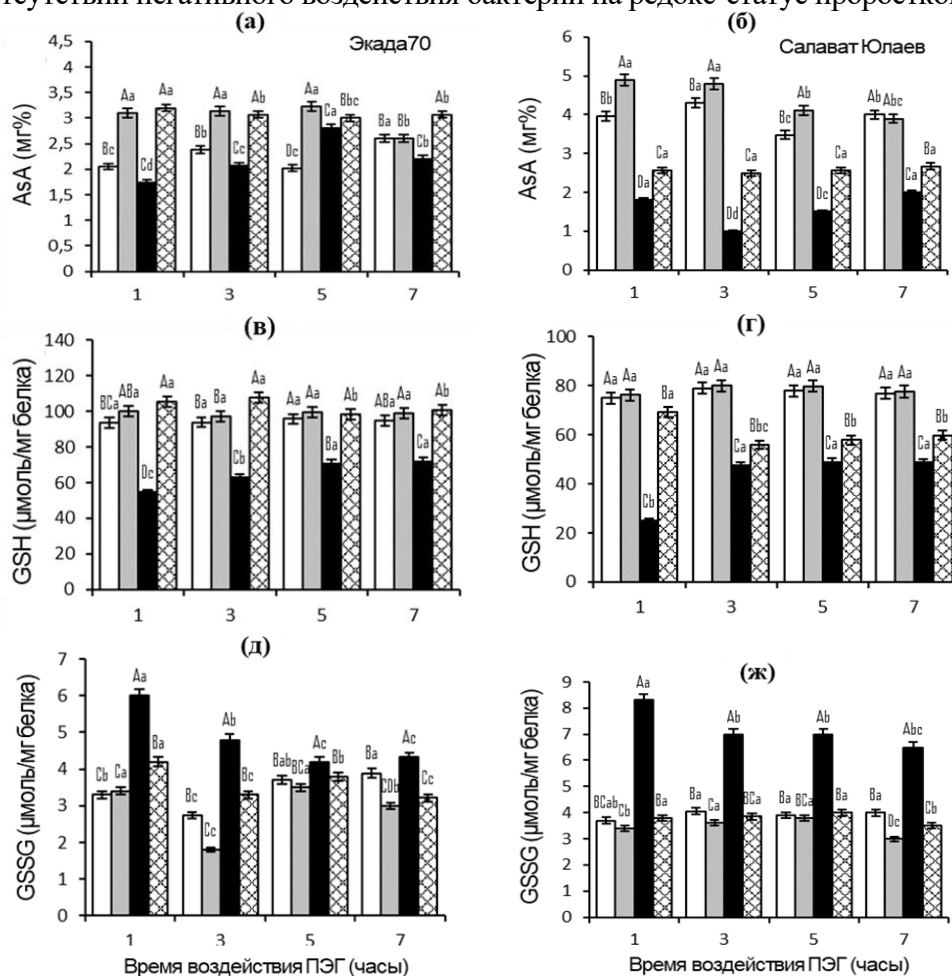
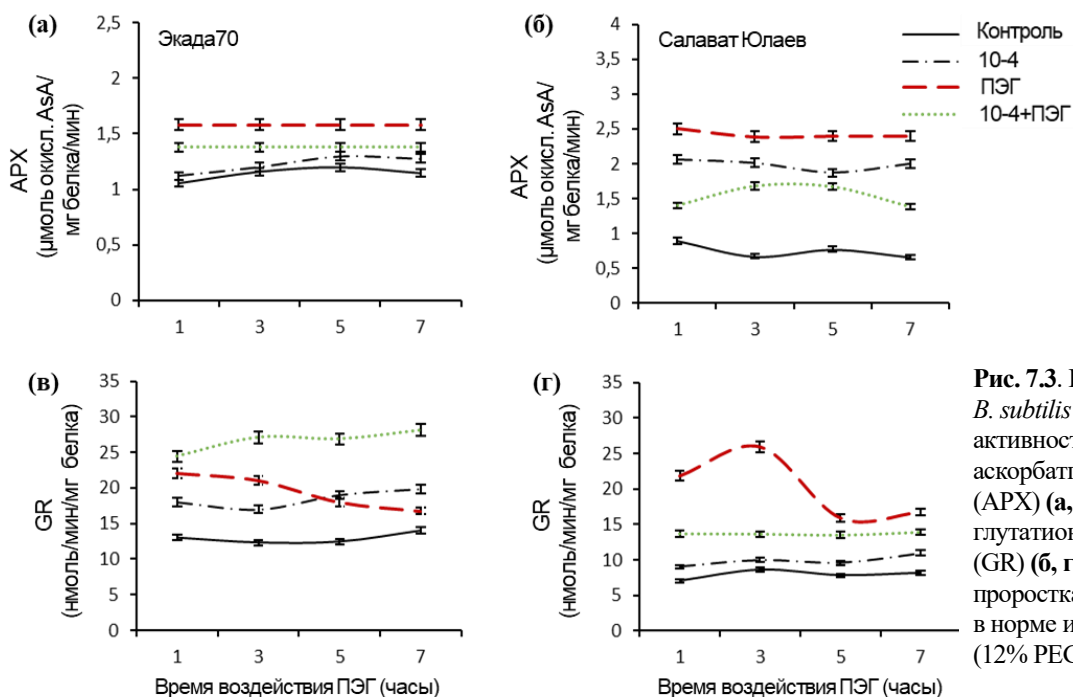


Рис. 7.2. Влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 на содержание неферментативных антиоксидантов аскорбата (AsA) (а, б), восстановленного глутатиона (GSH) (в, г) и окисленного глутатиона GSH (GSSG) (д, е) в 4-сут проростках пшеницы сортов Экада70 (а, в, д); и Салават Юлаев (б, г, е) в норме и при водном дефиците (ПЭГ)

Водный дефицит вызывал значительный окислительный дисбаланс у проростков чувствительного сорта Салават Юлаев, что выразилось в резком снижении AsA (в 2 раза) (рис. 6.2б) и GSH (в 3 раза) (рис. 7.2г) при одновременном росте GSSG (рис. 7.2е). У проростков устойчивого сорта Экада70 стресс-индуцированное снижение AsA (рис. 7.2а) и GSH (рис. 7.2в) было менее выраженным. У проростков сорта Салават Юлаев инокуляция оказала протекторное действие способствуя поддержанию повышенного уровня AsA (130–250% от контроля) (рис. 7.2а) и восстановление пула GSH (рис. 7.2г) и GSSG до контрольных значений (рис. 7.2е). У проростков сорта Экада70 инокуляция оказала стабилизирующий эффект, предотвратив вызванное стрессом падение AsA и GSH (рис. 7.2а,в).

Оценка активности аскорбат пероксидазы (APX) и глутатион редуктазы (GR). Водный дефицит приводил к выраженной активации ключевых ферментов AsA-GSH цикла – APX (в 1,5–3 раза) и GR (в 1,2–2 раза) у проростков обоих сортов (рис. 7.3). При этом стрессовый

отклик был более выражен у проростков чувствительного сорта (рис. 7.3б,г), чем у устойчивого сорта (рис. 7.3а,в). В норме инокуляция повышала активность обоих ферментов у исследуемых растений (рис. 6.3), тогда как при стрессе оказывала сорт-специфическое действие: нивелировала избыточную активацию APX (рис. 7.3б) и GR (рис. 7.3г) у проростков сорта Салават Юлаев, и, напротив, у проростков сорта Экада70 поддерживала высокую активность GR (рис. 7.3в) и сдерживала рост активности APX (рис. 7.3а).



Полученные результаты позволяют заключить, что защитное действие *B. subtilis* 10-4 на растения пшеницы при водном дефиците обусловлено сорт-специфической регуляцией компонентов AsA-GSH цикла. Ключевым звеном у проростков устойчивого сорта Экада70 выступает AsA, а у проростков чувствительного сорта Салават Юлаев – GSH, что обеспечивает снижение окислительных повреждений мембран и улучшение роста пшеницы при стрессе.

ГЛАВА 8. РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ *B. subtilis* В ПРОЛОНГИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДНОГО ПРЕССИНГА И ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ

Данная глава посвящена изучению роли эндофитных *B. subtilis* в формировании долгосрочной адаптации растений пшеницы с контрастными стратегиями засухоустойчивости в условиях комбинированного стресса (гербицид+почвенная засуха, ГбЗ). Впервые комплексно оценено влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на морфофизиологические, биохимические показатели роста, устойчивости, продукционные параметры и качество зерна в вегетационных экспериментах в контролируемых и полевых условиях.

Фенотипическая и ростовая реакция инокулированных эндофитными *B. subtilis* растений пшеницы при комбинированном стрессе (ГбЗ) и репарации в контролируемых вегетационных экспериментах. Установлено, что в норме инокуляция повышала интенсивность ростовых процессов (на 10–50%) на протяжении всего периода вегетации, что проявлялось в увеличении длины наземной части и корней, а также сырой и сухой биомассы растений (рис. 8.1, рис. 8.2). Воздействие ГбЗ вызывало типичные фенотипические изменения: замедляло рост побегов и корней (на 25–40%), снижало их сырую (на 30–60%) и сухую биомассу (на 30–50%) с максимальной амплитудой у растений чувствительного сорта Салават Юлаев. Инокуляция штаммами *B. subtilis* 10-4 и 26Д, проявляющими *in vitro* толерантность к Гб и ПЭГ, оказывала пролонгированный эффект защиты на растения пшеницы. Выявленный на стадии

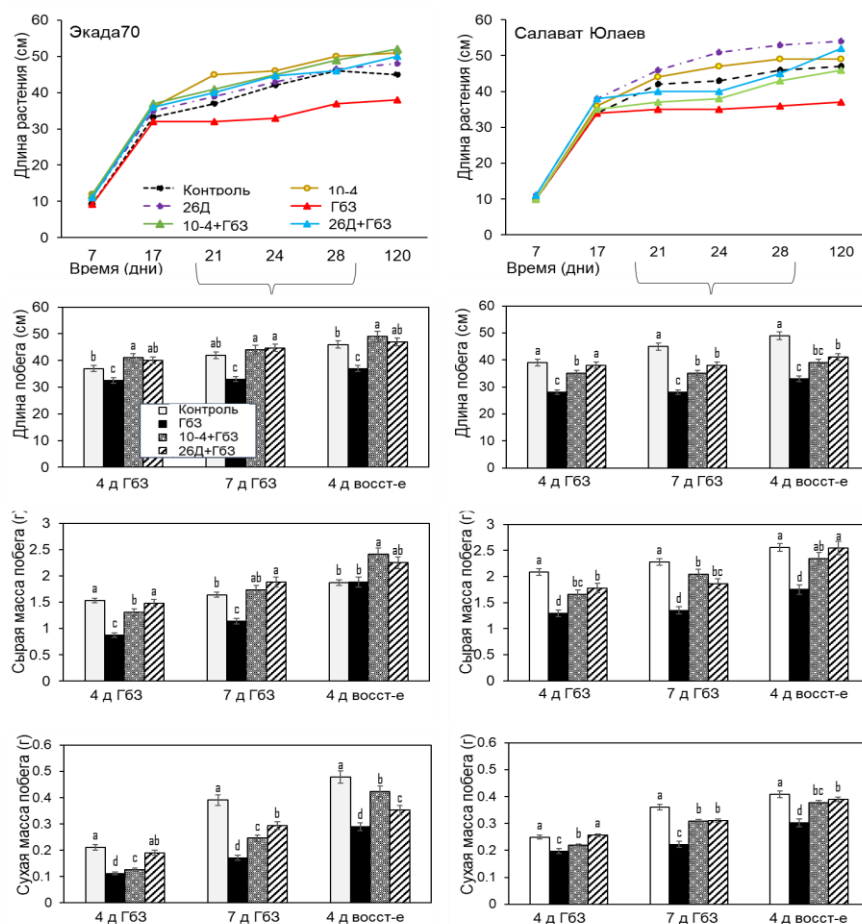
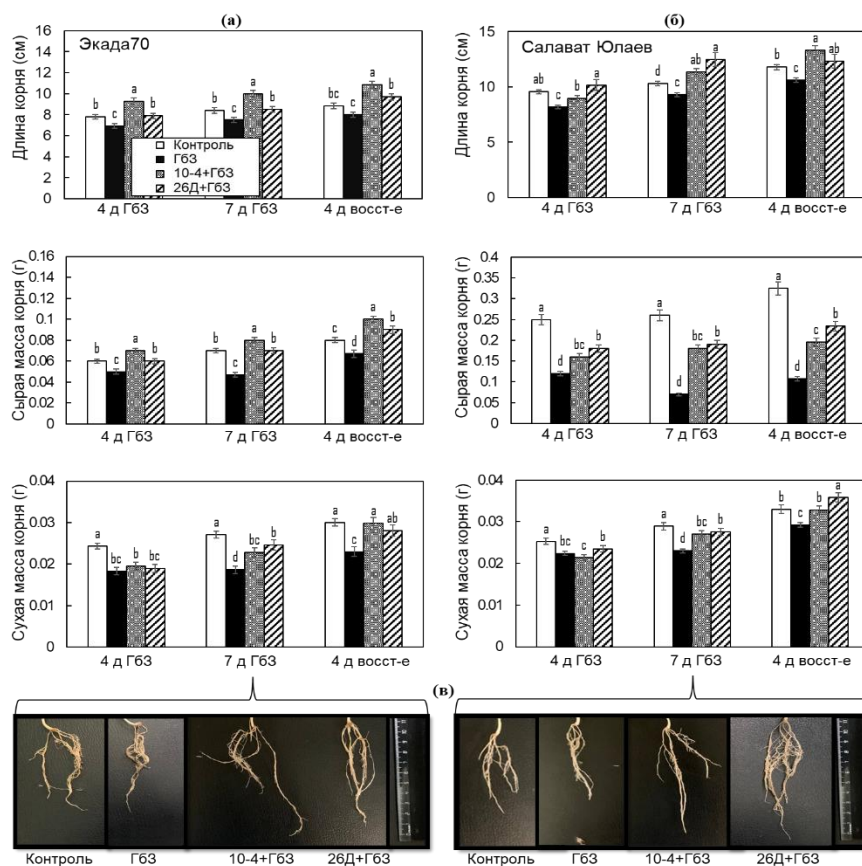


Рис. 8.1. Влияние *B. subtilis* 10-4 и 26Д на параметры роста растений пшеницы при комбинированном воздействии гербицида и почвенной засухи (Г63), а также в пост-стрессовый период (4 дня восстановления)



прорастания семян и раннего роста эффект инокуляции сохранялся и на поздних стадиях развития, существенно (на 40–50%) ослабляя негативное воздействие Г63 на рост растений обоих сортов и ускоряя их восстановление при репарации (рис. 8.1, рис. 8.2). К концу вегетации инокулированные и подвергнутые стрессу растения превосходили по длине надземной части варианты без инокуляции. Максимальный положительный отклик наблюдался у растений сорта Экада70 при инокуляции 10-4, а у растений сорта Салават Юлаев – 26Д. Полученные результаты о модификации эндوفитами архитектуры корневой системы и стимуляции роста корней (рис. 8.2), свидетельствуют о повышении эффективности взаимодействия растений с почвой, что играет важную роль в обеспечении их водой и элементами минерального питания в условиях стресса.

Рис. 8.2. Влияние *B. subtilis* 10-4 и 26Д на параметры роста растений пшеницы сортов Экада70 (а) и Салават Юлаев (б) при комбинированном воздействии гербицида и почвенной засухи (Г63), а также в пост-стрессовый период (4 дня восстановления)

Анализ динамики содержания ФС пигментов хлорофиллов и площадь листьев инокулированных эндофитными *B. subtilis* растений пшеницы при комбинированном стрессе (ГБЗ) и в пост-стрессовый период. Аналогично данным, полученным на проростках (6-сут) в ранние стадии развития (прорастание-всходы) в условиях ПЭГ-индуцированного

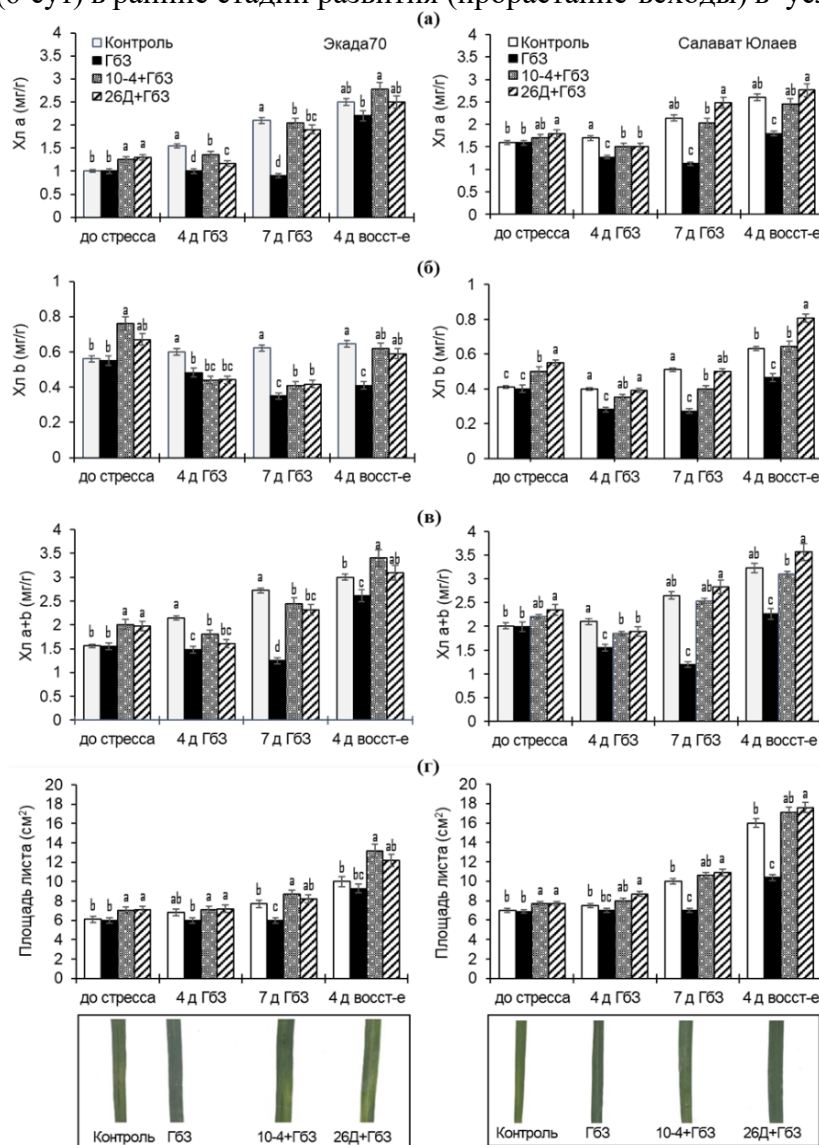


Рис. 8.3. Влияние *B. subtilis* 10-4 и 26Д на фотосинтетические пигменты Хл а (а), Хл b (б), Хл а+b (в) и площадь листьев (г) растений пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев при комбинированном воздействии гербицида и почвенной засуха (ГБЗ), а также в пост-стрессовый период (восстановление) через 4 дня после возобновления полива

Анализ окислительного и осмотического статуса инокулированных эндофитными *B. subtilis* растений пшеницы при комбинированном стрессе (ГБЗ) и репарации. Установлено, что воздействие ГБЗ вызывало у растений обоих изучаемых сортов значительное усиление генерации АФК (O_2^- , H_2O_2), интенсификацию ПОЛ (МДА) (рис. 8.4) и накопление осмолита/неферментативного антиоксиданта пролина (рис. 8.6в). Параллельно отмечалось снижение активности антиоксидантных (АОС) ферментов (СОД, КАТ, АРХ) (рис. 8.5) и значительное истощение пула неферментативных антиоксидантов (AsA, GSH) (рис. 8.6а,б), что было наиболее выражено у растений чувствительного сорта Салават Юлаев. Эти данные свидетельствуют об интенсивном развитии окислительных и осмотических повреждений растений, а также снижении их устойчивости к ГБЗ с большей амплитудой колебаний у растений сорта Салават Юлаев. Инокуляция значительно снижала индуцированную ГБЗ генерацию АФК (O_2^- , H_2O_2) и содержание МДА у растений обоих сортов (рис. 8.4в), что свидетельствует о защищенности этих растений от окислительных повреждений. При репарации у инокулированных растений, особенно у сорта Экада70,

водного дефицита (глава 4), воздействие ГБЗ в период кущения значительно снижало содержание хлорофиллов (рис. 8.3а-в). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 и 26Д препятствовала индуцированной стрессом деградации хлорофиллов и приводила к более быстрому восстановлению их содержания до уровня контрольных растений при репарации. Площадь листьев изменялась сходным образом (рис. 8.3г). Результаты свидетельствуют о долговременном эффекте инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) в защите фотосинтетического аппарата растений пшеницы обоих сортов от повреждений при ГБЗ. Такой эффект может быть связан с более высокой доступностью и усвоением питательных веществ из ризосферы, модуляцией фитогормонов, что способствует поддержанию роста растений при возникновении стрессовых ситуаций.

отмечалось более быстрое восстановление уровня пролина и МДА до контрольных значений (рис. 8.4в), что указывает на ускоренную стабилизацию редокс-гомеостаза и повышение адаптивного потенциала под влиянием эндофитов.

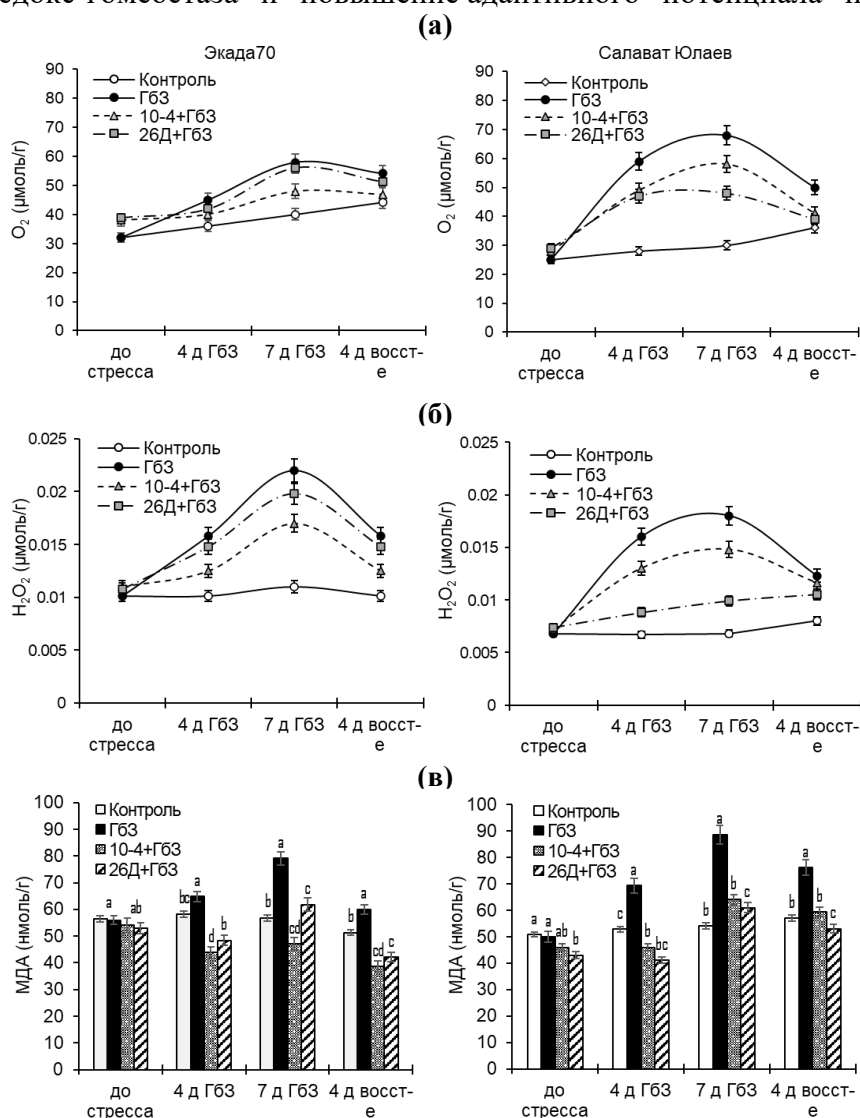


Рис. 8.5. Влияние инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) на содержание биомаркеров стресса – АФК супероксид анион радикала (O_2^-) (а), пероксида водорода (H_2O_2) (б) и уровень перекисного окисления липидов (МДА) (в) у растений пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев при комбинированном воздействии гербицида и почвенной засухи (Гб3) в течение 7 дней, а также в пост-стрессовый период (4-дневное восстановление)

защиту и АОС потенциал. В пост-стрессовый период у инокулированных растений, особенно сорта Экада70, отмечалось ускоренное снижение уровня пролина до контрольных значений (рис. 8.6в). Полученные данные указывают, что повышение устойчивости при инокуляции основано на сбалансированной перестройке ключевых звеньев AsA-GSH цикла и осморегуляции. Протекторный эффект инокуляции в значительной мере реализуется через поддержание функциональности глутатионového звена, в частности, за счет сохранения активности GR, что обеспечивает восстановление пула GSH и редокс-гомеостаз.

Участие эндогенной ГАМК в эндофит-индуцированной устойчивости пшеницы к комбинированному стрессу (Гб3). Помимо классических компонентов антиоксидантной защиты и осморегуляции, важную роль в стресс-адаптации играют сигнальные метаболиты. Впервые методом ВЭЖХ исследовано влияние эндофитных *B. subtilis* 10-4 на динамику содержания эндогенной ГАМК у контрастных по засухоустойчивости растений пшеницы, произрастающих в нормальных условиях, при комбинированном стрессе (Гб3) и репарации.

Инокуляция снижала индуцированную Гб3 гиперактивацию АОС ферментов СОД, КАТ и АРХ у растений обоих сортов при поддержании восстановительного потенциала ключевого фермента регенерации глутатиона (GSH) – GR (рис. 8.5г). Интересно, что штамм 10-4 более эффективно поддерживал пул AsA и GSH у растений сорта Экада70, тогда как штамм 26Д в большей степени предотвращал истощение GSH у растений сорта Салават Юлаев и способствовал его восстановлению в пост-стрессовый период (рис. 8.6а,б). Необходимо отметить сорт-зависимую модуляцию накопления пролина: наблюдалось снижение Гб3-индуцированного его повышения у растений сорта Экада70 и дополнительное увеличение у растений сорта Салават Юлаев в течение 7 дней воздействия Гб3 (рис. 8.6в), что, вероятно, усиливало осмотическую

Работа восполняет пробел в знаниях, поскольку роль ГАМК в растительно-микробных взаимодействиях при стрессах оставалась неизученной. Установлено, что воздействие комбинированного стресса (ГБЗ) вызывало значительное (в 1,5–2 раза) накопление ГАМК у растений обоих сортов, причем у растений устойчивого сорта Экада70 аккумуляция начиналась раньше. У растений сорта Экада70 инокуляция способствовала дополнительному накоплению ГАМК на пике стресса (7-сут) (рис. 8.7а), тогда как у растений сорта Салават Юлаев снижала стресс-индуцированный уровень этой аминокислоты (рис. 8.7б). Вероятно, это может быть связано с вовлечением ГАМК, помимо его сигнальной функции, в поддержание осмотического и окислительного статуса растений, в частности, через координацию накопления осмолитов (пролина) (рис. 8.6в) (Kolupaev et al., 2023) и регуляцию работы устьиц (рис. 6.3) (Mekonnen et al., 2016; Hasan et al., 2021). Полученные данные свидетельствуют о том, что выявленные *B. subtilis*-индуцированные изменения в пуле ГАМК представляет собой новый физиологический механизм стресс-устойчивости, интегрированный с поддержанием окислительного и осмотического гомеостаза. Выявленные сорт-зависимые различия в реакции растений пшеницы, по-видимому, отражают их генетически-детерминированные адаптивные стратегии.

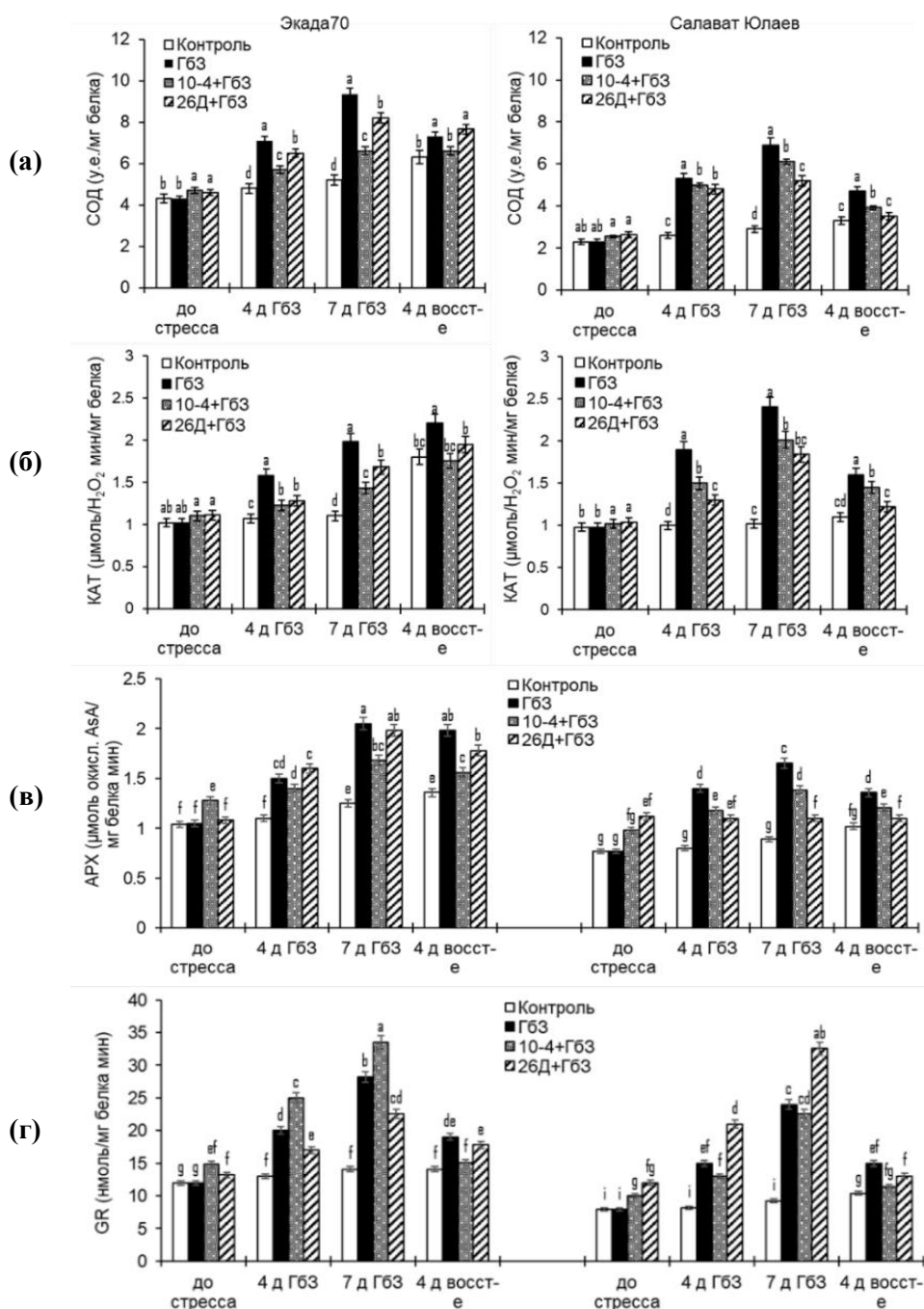


Рис. 8.5. Влияние предпосевной инокуляции семян *B. subtilis* 10-4 и 26Д на содержание антиоксидантных ферментов СОД (а), КАТ (б), АРХ (в) и GR (г) в растениях пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев в условиях комбинированного воздействия гербицида и засухи (ГБЗ), а также в пост-стрессовый период (репарация)

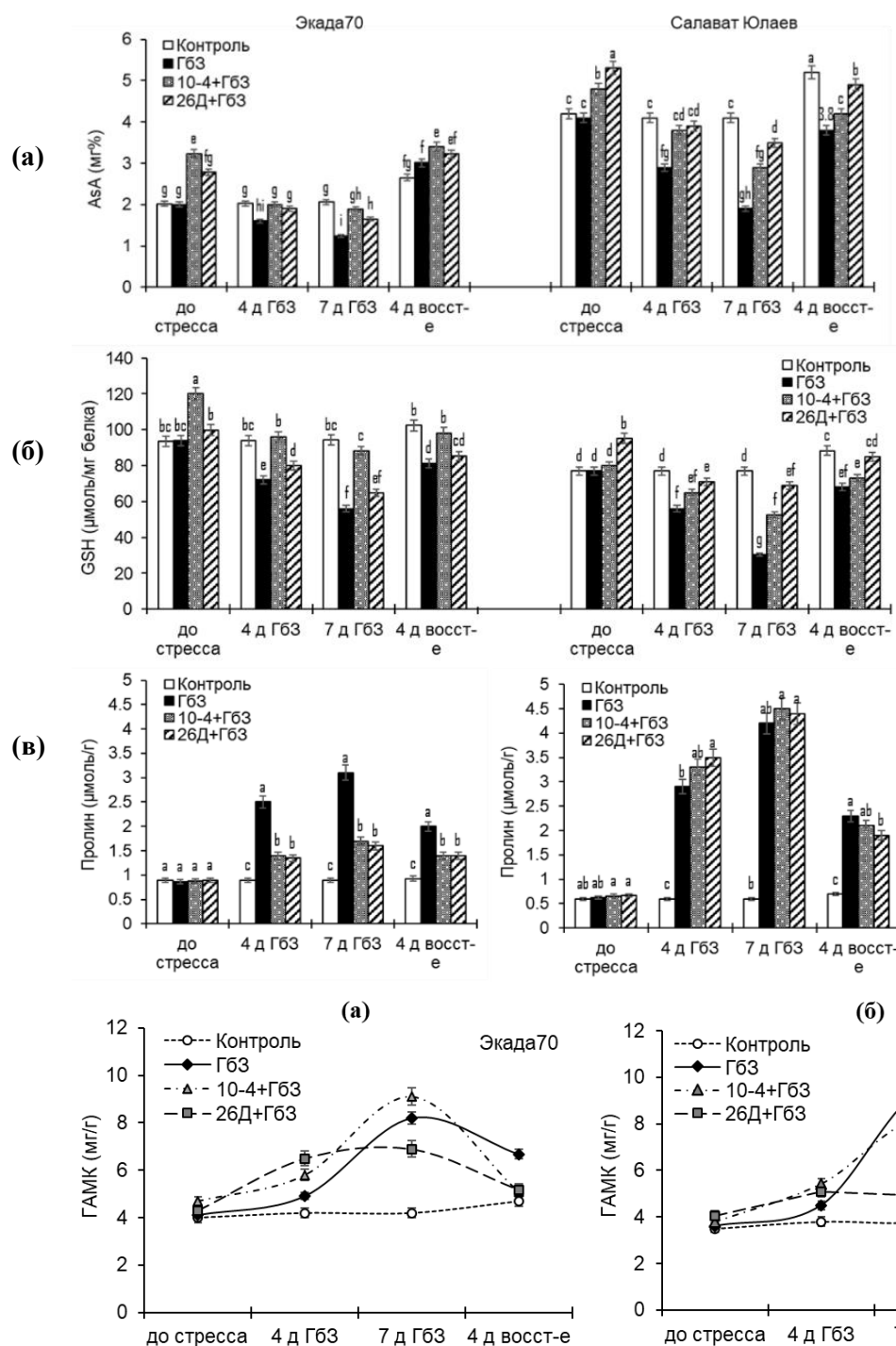


Рис. 8.7. Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* 10-4 на содержание эндогенной ГАМК в растениях пшеницы сортов Экада70 (а) и Салават Юлаев (б) в норме (16-сут растения, до стресса) в условиях 4- и 7-сут воздействия ГБЗ (24-сут и 28-сут растения) и после 4 сут репарации (32-сут растения)

Анализ элементов структуры урожая и качества зерна. Интегральным показателем эффективности выявленных адаптивных физиолого-биохимических изменений, индуцируемых эндофитами, является продуктивность растений. В связи с этим было оценено влияние предпосевной инокуляции на формирование элементов структуры урожая и качество зерна пшеницы. Установлено, что воздействие комбинированного стресса (ГБЗ) достоверно снижало длину колоса и массу 1000 зерен. Инокуляция *B. subtilis* (10-4, 26Д) существенно (на 20–50%) смягчала это негативное воздействие, способствуя увеличению количества зерен в колосе (Табл. 8.1). У инокулированных растений также отсутствовали наблюдаемые при стрессовом воздействии (ГБЗ) деформации колоса и невыполненность зерна, а фазы колошения и физиологической спелости наступали на 4–5 дней раньше.

Таблица 8.1 – Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* 10-4 и 26Д на формирование элементов урожайности пшеницы в норме и при комбинированном стрессе (Г63) в контролируемых условиях произрастания

Вариант	Высота растений (см)	Длина колосьев (см)	Количество зерен в колосе	Масса 1000 зерен (г)	Урожайность зерна (г/растение)
Экада70					
Контроль	45±1,1 ^d	4,8±0,7 ^b	8,1±0,3 ^d	23,7±2,7 ^c	0,19±0,03 ^c
10-4	51±0,3 ^a	5,0±0,9 ^a	11,7±0,5 ^a	25,6±1,3 ^a	0,30±0,02 ^a
26Д	48±0,6 ^{bc}	4,9±0,7 ^a	10,8±0,4 ^b	24,4±1,5 ^b	0,26±0,04 ^b
Г63	38±0,9 ^c	4,1*±0,4 ^d	6,3±0,3 ^c	15,1±2,6 ^c	0,11±0,06 ^f
10-4+Г63	52±0,7 ^a	4,7±0,3 ^{bc}	10,2±0,6 ^b	23,5±1,9 ^c	0,24±0,04 ^c
26Д+Г63	50±0,8 ^b	4,5±0,6 ^c	9,9±0,7 ^c	22,3±2,1 ^d	0,22±0,03 ^d
Салават Юлаев					
Контроль	47±0,8 ^d	5,6±1,3 ^c	6,2±1,7 ^d	21,2±1,6 ^c	0,13±0,02 ^c
10-4	49±0,9 ^c	5,7±0,9 ^b	7,1±1,1 ^b	22,4±0,6 ^b	0,16±0,01 ^b
26Д	54±0,4 ^a	5,9±0,6 ^a	8,4±1,9 ^a	23,6±1,3 ^a	0,20±0,02 ^a
Г63	37±0,7 ^c	3,4*±1,3 ^f	3,5±0,7 ^f	14,2±1,5 ^f	0,05±0,03 ^c
10-4+Г63	46±0,6 ^d	4,5±0,9 ^c	5,6±1,0 ^c	17,2±0,7 ^{de}	0,10±0,01 ^d
26Д+Г63	52±0,2 ^b	5,4±1,2 ^d	6,7±1,5 ^c	18,3±0,3 ^d	0,13±0,01 ^c

*На некоторых колосьях не формировались зерна, наблюдалось наличие деформированных колосьев

В полевых условиях подтверждено положительное влияние инокуляции на урожайность, наиболее выраженное у устойчивого сорта Экада70 (рис. 8.8а). Впервые показано, что инокуляция эндофитом приводит к качественной перестройке биохимического состава зерна пшеницы: обогащению аминокислотного профиля (в т.ч. увеличению доли незаменимых аминокислот валина, лизина, треонина, фенилаланина, гистидина, триптофана, лейцина+изолейцина) (рис. 8.8б) и минералами (N, P, K, Fe, Cu, Zn) (рис. 8.8в); улучшению некоторых хлебопекарных показателей (ИДК, число падения).

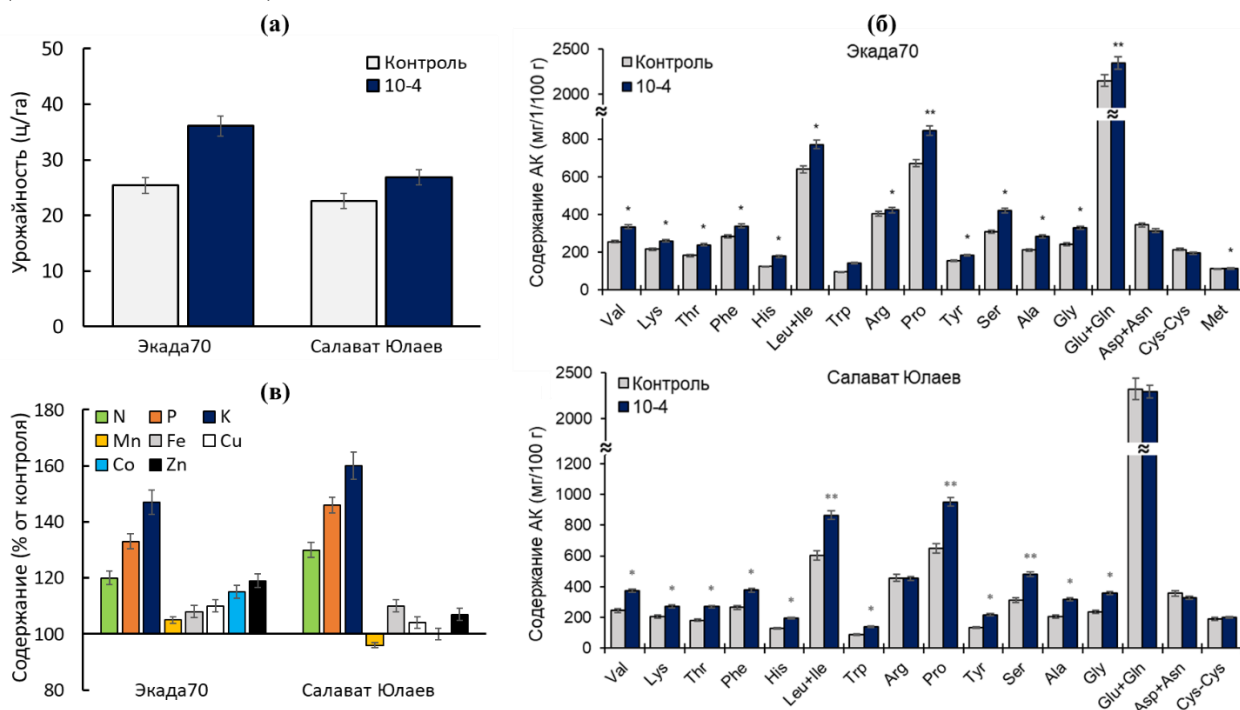


Рис. 8.8. Влияние предпосевной инокуляции эндофитом *B. subtilis* 10-4 на урожайность (а), изменение аминокислотного профиля (б) и содержание минералов (в) в зерне контрастных по стратегии засухоустойчивости растений пшеницы (устойчивый сорт Экада70, чувствительный сорт Салават Юлаев) (2022 г., полевые опыты)

Совокупность полученных данных демонстрирует, что предпосевная инокуляция эндофитными бактериями *B. subtilis* (10-4, 26Д) оказывает пролонгированный ростстимулирующий и протекторный эффект на растения изученных сортов (экотипов) пшеницы, как в норме, так и в условиях комбинированного стресса, способствуя ускоренному восстановлению в пост-стрессовый

период, что в итоге положительно отражается на формировании урожая и качестве зерна. Результаты указывают на синергическое взаимодействие эндофитных PGP-бактерий *B. subtilis* с генетической программой растений, усиливающее «врожденную» адаптацию устойчивого сорта (Экада70, СВ экотип) и компенсаторные реакции чувствительного сорта (Салават Юлаев, ЛЗС экотип) (Рис. 8.9). Выявленные механизмы создают основу для оптимизации и целенаправленного использования PGP-бактерий *B. subtilis* для повышения урожайности и качества зерна контрастных по стратегии засухоустойчивости экотипов пшеницы в условиях комплексных стрессовых воздействий.

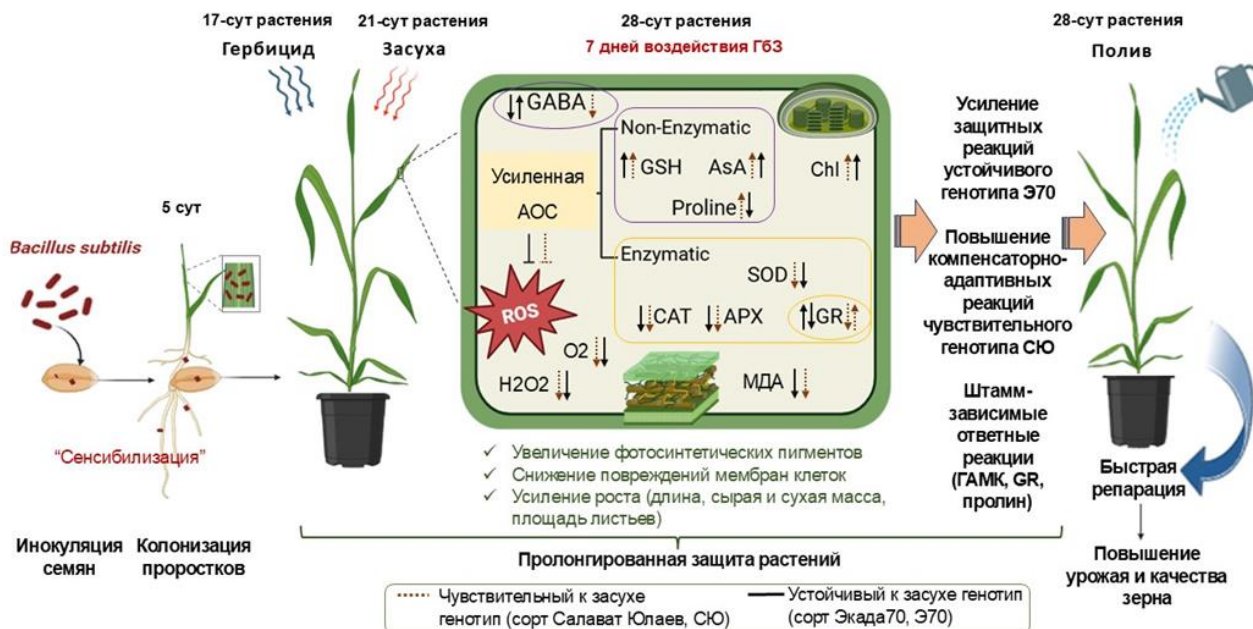


Рис. 8.9. Схематическое представление пролонгированной эндофит (*B. subtilis*)-опосредованной устойчивости растений пшеницы с контрастными стратегиями засухоустойчивости в условиях комбинированного стресса (гербицид+почвенная засуха)

ГЛАВА 9. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И АНТИСТРЕССОВОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОФИТА *B. subtilis* 10-4 НА РАСТЕНИЯ

Настоящий раздел раскрывает генетические основы физиолого-биохимических эффектов штамма *B. subtilis* 10-4, описанных в главах 3–8. Для раскрытия молекулярных основ и генетических детерминант эффекта инокуляции было проведено полногеномное секвенирование штамма *B. subtilis* 10-4 с использованием платформы Illumina в сочетании с биоинформационным анализом генов, ответственных за взаимодействие с растениями, стимуляцию роста и стресс-устойчивость. Выявлено, что геном *B. subtilis* 10-4 имеет длину 4 278 582 п.н., 19 контигов длиннее 500 п.н. Значение N50: 496887, L50: 3, GC-состав: 43,5%, среднее покрытие: 99,0х. Общее количество генов составляет 4476, из них 4314 – белок-кодирующие. Количество генов РНК: 53, псевдогенов: 109, рРНК: 6 (1, 3, 2 (5S, 16S, 23S)), тРНК: 42. Аннотированная последовательность гена 16S показала совпадение с организмом *Bacillus subtilis* (100%). Полногеномная последовательность депонирована в NCBI DDBJ/ENA/GenBank (рег. номер: JAVHXX0000000000, геномный проект ID: PRJNA1008864).

Высокое сходство по ANI (average nucleotide identity) с референсным лабораторным штаммом *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, а также качество сборки генома (полнота 97,74%, контаминация 1,99%, по данным CheckM) позволяют отнести штамм 10-4 к виду *B. subtilis*. Данный вывод подтверждается результатами филогеномного анализа (сервер TYGS, алгоритм GBDP), согласно которым штамм 10-4 формирует устойчивую кладу с референсными штаммами *B. subtilis*, включая лабораторный штамм 168 и природные изоляты ATCC 6051 и NCIB 3610 (рис. 3.1, глава 3). Размер генома *B. subtilis* 10-4 соответствует типичному диапазону для штаммов *B. subtilis* с свойствами биоконтроля и ростстимуляции (Lastochkina, Pusenkova, 2025).

С использованием сервиса RAST в геноме *B. subtilis* 10-4 детектирована 331 категория подсистем – групп белков, обеспечивающих реализацию определенных биологических процессов (рис. 9.1). Общее количество функций подсистем – 1668. Среди них наиболее представлены

подсистемы с функциями метаболизма аминокислот (281) (16,9%), углеводов (247) (14,9%), белков (165) (9,9%), что свидетельствует о широком метаболическом потенциале штамма 10-4 и способности эффективного взаимодействия с растениями в норме и при стрессе.

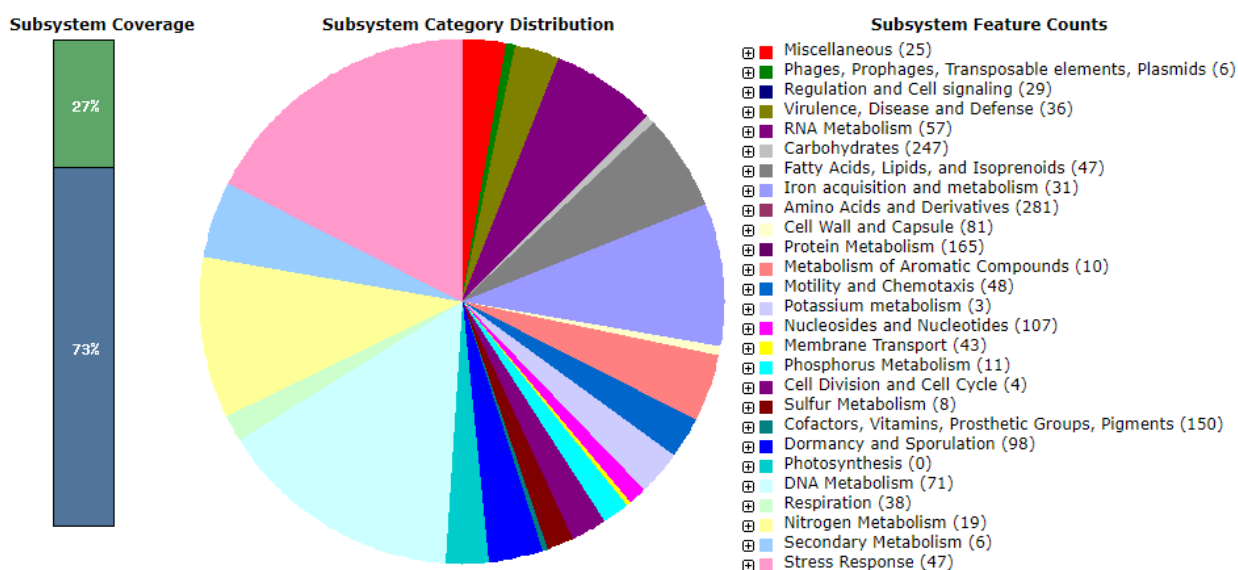


Рис. 9.1. Функциональная аннотация генов *B. subtilis* 10-4, определенных с помощью веб-сервиса RAST (<https://rast.nmpdr.org>). Круговая диаграмма представляет % содержание белков для каждой категории подсистем (перечислены в легенде сверху вниз согласно направлению движения по круговой диаграмме по часовой стрелке). Цифры в скобках – число метаболических путей в соответствующей категории подсистемы. Покрываемость подсистемы – соотношение известных белков, которые могут быть помещены в существующие подсистемы (зеленый цвет) (27%), и неизвестных белков, которые не могут быть помещены ни в одну существующую подсистему (синий цвет) (73%)

В геноме *B. subtilis* 10-4 выявлены гены, участвующие в метаболизме глутамина, глутамата, аспартата, аспарагина и в усвоении аммиака, ароматических аминокислот, гистидина, пролина и 4-гидроксипролина, аланина, серина, глицина, аргинина, мочевины, полиаминов, аминокислот с разветвленной цепью, лизина, треонина, метионина и цистеина (рис. 9.1). Вероятно, что выявленное при инокуляции *B. subtilis* 10-4 увеличение в зерне пшеницы ряда аминокислот (рис. 8.8б) связано с наличием генов, ответственных за их синтез в бактериальном геноме. Обнаружен ряд генов, предположительно участвующих в синтезе продуктов, обеспечивающих механизмы стимуляции роста и стресс-устойчивости растений, а также колонизации бактериями растительных тканей и их выживаемость в агрессивных условиях среды (покой, споруляция, стрессовая реакция и др.).

Гены, ассоциированные с колонизацией и взаимодействием с растением-хозяином.

Результаты *in silico* анализа показали, что геном *B. subtilis* 10-4 содержит полный набор генов, необходимых для формирования биопленок и активной подвижности. Обнаружены ключевые опероны, кодирующие основной экзополисахарид (альгинатный) (EPS, *epsA-O*) и пектинподобный полисахарид (PEL, гены *pel*, *pelB*), что обеспечивает структурную целостность и адгезию. Способность к прочному формированию биопленки, опосредованная генами *eps* и *pel*, очевидно, является ключевым фактором, позволяющим штамму 10-4 закрепляться на поверхности растений и формировать микроколонии. Выявлен комплекс генов, ассоциированных с сборкой и подвижностью жгутиков (*FlaA*, *FlgB*, *FlgE*, *PomA* и др.) и ответственных за хемотаксис и активное движение бактерий, что является важнейшим первым шагом в установлении успешного их взаимодействия с растениями и эффективной колонизации корней. Наличие этих генетических систем, очевидно, обуславливает способность штамма 10-4 колонизировать растения (рис. 3.4, глава 3).

Стимуляция роста и минеральное питание. В геноме штамма 10-4 идентифицированы ключевые гены, обеспечивающие его ростстимулирующие свойства. К ним относятся: 1) практически полный путь биосинтеза триптофана (основного предшественника ИУК) и гены альтернативных путей синтеза ИУК (индол-3-пируватного, индол-3-ацетамидного и индол-3-ацетальдегидного); 2) гены, вовлеченные в улучшение минерального питания растений: метаболизм азота (*glnA*, *nas*-, *nar*-опероны), фосфора (*pstA*, *pstB*, *pstC*, *pstS*), калия и серы, синтеза сидерофоров и усвоения железа (*dhb*-, *feu*-опероны). Присутствие этих генетических систем коррелирует с

установленной способностью штамма 10-4 к азотфиксации, что было показано методами газовой хроматографии и при выращивании бактерий на безазотистой среде Эшби (Lastochkina et al., 2017; 2021), и объясняет его положительное влияние на минеральное питание, рост, урожайность (рис. 8.8а, табл. 8.1, глава 8), а также накопление минералов в зерне пшеницы (рис. 8.8в, глава 8).

Гены, ассоциированные со стресс-устойчивостью. Результаты показали, что *B. subtilis* 10-4 обладает мощным генетическим арсеналом, обеспечивающим высокую стресс-устойчивость, адаптацию и конкурентные преимущества. Выявлено 47 категорий подсистем, ответственных за стресс-реакции. Ключевые из них включают: защиту от оксидативного стресса (14 категорий, включая гены детоксикации АФК СОД, пероксидазы (*sodB*, *sodC*, *SodMn*, *PerR*, *Osmcl*, *OsmclR*, *AhpC*, *NsrR*, *FUR*), глутатиона (*GloA*, *GPX*); защиту от осмотического стресса (15 категорий, включая осморегуляцию и синтез осмопротекторов, поглощение холина (*opuBD*, *puBC*, *opuBB*, *opuBA1*) и биосинтез бетаина (*OpuD*, *OpuBA*, *GbsB*, *OpuAC*, *opuCD*, *opuCC*, *opuCB*, *opuCA*, *OpuAA*, *OpuBC*, *OpuBB*, *OpuBD*, *OpuAB*, *BetB*); общий стресс-ответ, регулируемый системой SigmaB (*RsbR*, *RsbS*, *RsbT*, *RsbU*, *RsbV*, *RsbW*), а также гены, кодирующие белки холодового шока (*cspD*, *cspC*, *cspB*), теолпероксидазу (*tpx*), полиамин спермидин (*speG*, *paiA*, *bltD*, *speE*). Идентифицированы системы, связанные с ключевыми адаптационными функциями: регуляция и передача сигналов (29 категорий, включая гены покоя и спорообразования), процесс споруляции (98 подсистем с ключевыми регуляторами *spo0A*, *sigF*, *sigG*), биосинтез клеточной стенки и капсулы (81 подсистема, включая гены синтеза тейхоевых кислот, D-аланилирования и ЭПС), а также факторы вирулентности и защиты (36 подсистем, включая системы резистентности к антимикробным пептидам *bce* и *lia*). Присутствие полноценного жгутикового аппарата и систем хемотаксиса (*fla*, *flg*, *fli*, *che*) указывает на способность штамма 10-4 к активному движению в ответ на корневые экссудаты, что критически важно для колонизации ризосферы и реализации потенциала PGP-бактерий (Xu et al., 2022).

В геноме *B. subtilis* 10-4 выявлен ряд уникальных генетических детерминант, связанных с высокой адаптивностью и эффективным взаимодействием с растениями. В частности, установлено наличие гена *pchA*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза СК (изохоризматсинтазу), что указывает на способность штамма 10-4 к синтезу этого фитогормона и, по-видимому, обуславливает выявленную его способность регулировать накопление эндогенной СК в растениях и индуцировать системную устойчивость (рис. 5.3.1, рис. 5.3.3, глава 5). Выявлены гены синтеза летучих органических соединений (ЛОС) 2,3-бутандиола и ацетона (*bdhA*, *alsD*, *alsS*), которые участвуют в подавлении фитопатогенов, в индукции роста и системной устойчивости растений. Обнаружены гены, участвующие в синтезе полиаминов (*speE*), молекулярных шаперонов, а также ГАМК (*gltA*, *gltB*, *fpgS*, *gabD*, *gabR*, *epsN*, *pdxT*, *pdxS*), что может объяснять регуляцию ее накопления в инокулированных растениях (рис. 8.7). Таким образом, интеграция генетических модулей для синтеза фитогормонов, стресс-протекторных метаболитов, антиоксидантов и ЛОС формирует у штамма 10-4 многокомпонентный механизм, обеспечивающий его выживание в ризосфере и реализацию ростстимулирующих и протекторных функций на растения в стрессовых условиях.

Гены, ассоциированные с синтезом вторичных метаболитов (биоконтроль). Анализ вторичных метаболитов генома *B. subtilis* 10-4 с использованием программы anti-SMASH предсказал наличие широкого спектра генов, кодирующих антимикробные активные соединения, включая поликетиды типа III (ТЗРКС), нерибосомные пептид-синтетазы (NRPS), бета-лактоны, сактипептиды (субтилозин А), рантипептиды, нерибосомные пептидные металлофоры (NRP-металлофоры), трансАТ-поликетидсинтетазы (трансАТ-PKS) и терпены. 5 биосинтетических кластеров продемонстрировали 100% сходство с известными путями синтеза бациллена, субтилозина А, бацилизина, бациллизина и фактора подавления споруляции. Кластеры сурфактина и фенгицина показали 82% и 80% сходства соответственно, что указывает на их возможную структурную вариативность. Сходство других кластеров варьировалось от 46% (плипастантин) до 13% (1-карбапен-2-ем-3-карбоновая кислота), демонстрируя широкую вариативность. Обнаружен уникальный терпеновый генный кластер в регионе 9, не имеющий аналогов в базах данных, что предполагает его новизну (Lastochkina, Pusenkova, 2025). С использованием RAST подтверждено наличие генов, кодирующих соединения с антимикробной активностью в геноме *B. subtilis* 10-4, включая субъединицы сурфактин-синтазы 1, 2, 3 (*surfAA*, *surfAB*, *surfAC*, *surfAD*), β -глюканазу (*bgIS*), эндоглюканазу (*eglS*), различные протеазы (*ClpX*, *lon*, *ycdP*, *YRAAA*, *gpr*, *gluP*, *prsW*, *htpX*, *wprA*, *bepA*, *aprX*). Действительно, была показана способность *B. subtilis* 10-4 продуцировать сурфактины (C13–15) (Lastochkina et al., 2020), регулировать активность амилаз и протеаз в растениях, повышая их

устойчивость к фитопатогенам (Пусенкова и др., 2015; Ласточкина и др., 2018; Lastochkina et al., 2020). При помощи базы данных CARD у *B. subtilis* 10-4 предсказан широкий спектр генов антимикробной устойчивости (AMR) к различным классам антибиотиков (аминогликозидным, фениколовым, тетрациклиновым) и дезинфектантов через механизмы инактивации, эффлюкса (выведения из клетки), изменения мишени. Выявленное разнообразие механизмов устойчивости и генов резистентности к антибиотикам, токсичным соединениям, агрессивным условиям среды (высокие температуры, концентрации солей и т.д.) у *B. subtilis* 10-4 свидетельствует о мощном арсенале средств, которые этот штамм может задействовать как для самосохранения, так и повышения стресс-устойчивости растений.

Таким образом, полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ генома штамма *B. subtilis* 10-4 позволили установить комплексные генетические основы его физиолого-биохимических эффектов на растения-хозяева, представленных в главах 3–8. Идентифицированы ключевые гены, включая уникальные (СК, ГАМК, спермидин, ЛОС, терпены), детерминирующие колонизацию и взаимодействие с растением-хозяином, стимуляцию роста и минеральное питание, факторы устойчивости к стрессам, включая синтез осмопротекторов, антиоксидантов. Полученные данные предоставляют молекулярно-генетическую основу для выявленных эффектов инокуляции на уровне фенотипа растений-хозяев и формируют фундамент для целенаправленного применения *B. subtilis* 10-4 в экологически-ориентированных технологиях возделывания агрокультур, включая пшеницу с разными адаптивными стратегиями, в условиях абиотических стрессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммирование полученных данных позволяет заключить, что эндофитные бактерии *B. subtilis* 10-4 обладая комплексом ростстимулирующих и антистрессовых свойств (включая продукцию ИУК, сидерофоров, азотфиксацию, синтез СК, АБК, толерантность к осмотическому стрессу, засолению, тяжелым металлам, пестицидам, *in vitro* антагонизм против фитопатогенов) при предпосевной инокуляции повышают ростовые процессы и устойчивость агрокультур к разнообразным по природе стресс-факторам и их комбинациям. Универсальные защитные реакции инокулированных растений в стрессовых условиях обусловлены эффективной их колонизацией эндофитными *B. subtilis*, снижением уровня ПОЛ, модуляцией уровня пролина и повышенной фотосинтетической активностью, что отражается в улучшении интегральных показателей роста и продукционных параметров.

Эффективность инокуляции варьирует в зависимости от стратегии засухоустойчивости растений пшеницы: наиболее выраженный защитный эффект в условиях водного дефицита проявляется на устойчивых сортах степного экотипа (в сравнении с чувствительными сортами лесостепного экотипа), обусловленный различным уровнем накопления пролина, сдвигами в состоянии гормональной системы, оптимизацией работы ФСII фотосинтетического аппарата, водного баланса, редокс-гомеостаза. Ростстимулирующий эффект обусловлен быстрым накоплением ИУК; антистрессовый – с предотвращением стресс-индуцированного снижения ИУК и уменьшением амплитуды сдвигов в балансе АБК/ЦК, а также усилением синтеза лигнина и суберина в корнях с максимальными значениями у растений устойчивого экотипа. Использование ингибиторного анализа позволило получить экспериментальные доводы в пользу выполнения эндогенной СК роли интермедиата в проявлении предадаптирующего и протекторного действия эндофита *B. subtilis* 10-4 на растения пшеницы при водном дефиците. Установлено, что ключевую роль в реализации эндофит-индуцированного снижения окислительных повреждений и стабилизации редокс-статуса растений чувствительного и устойчивого сортов в ранние стадии онтогенеза играют AsA и GSH, соответственно; в более поздние стадии – GR для обоих сортов. Результаты вегетационных экспериментов свидетельствуют о пролонгированном защитном эффекте эндофитных *B. subtilis* (10-4, 26Д) при предпосевной обработке на рост и биохимические показатели (поддержание фотосинтеза, снижение окислительных, осмотических повреждений) у контрастных по стратегии засухоустойчивости растений при комбинированном стрессе (гербицид+засуха) и ускоренном восстановлении их роста и фотосинтеза (до контрольных значений) в пост-стрессовый период, приводя формированию повышенного урожая зерна (особенно у устойчивого сорта) с улучшенным аминокислотным, минеральным составом и хлебопекарными показателями. Повышение ГАМК в инокулированных растениях (до стресса) и быстрое накопление при стрессе (гербицид+засуха) свидетельствует о возможном участии ГАМК в реализации

защитного эффекта эндофитов на контрастные по стратегии засухоустойчивости растения. Выявленная цепь событий включает следующее: инокуляция эндофитными *B. subtilis* «сенситизирует» растения (повышение базового уровня ИУК, СК, ГАМК, антиоксидантных резервов) с максимальными значениями для устойчивых растений степного экотипа; при возникновении стресса приводит к быстрому накоплению ГАМК и ускоренной перестройке растительного метаболизма, ведущей к формированию долговременной устойчивости, включая гормональные перестройки, накопление СК, биохимических компонентов лигнина и суберина, что отражается в эффективной регуляции работы устьиц, водного и редокс-статусов, поддержании фотосинтетической активности, что отражается в улучшении роста и продукционных параметров. Причем, у устойчивого экотипа инокуляция усиливает защитные механизмы, у чувствительного – компенсирует недостающие.

Анализ генома *B. subtilis* 10-4 позволил впервые выявить функционально-важные свойства и ключевые гены, включая уникальные, ответственные за проявление этой бактерией на уровне фенотипа растений-хозяев антифунгальной, рострегулирующей и антистрессовой активностей. Полученные данные свидетельствуют о широком метаболическом потенциале *B. subtilis* 10-4 и способности эффективного взаимодействия с растениями в оптимальных и стрессовых условиях, что подтверждается данными о влиянии этого штамма на рост и устойчивость агрокультур на клеточном и организменном уровнях. Следовательно, данные о полных геномах бактерий являются эффективным предсказательным инструментом для подбора наиболее подходящих областей их применения и прогнозирования эффективности в практике в экологически-ориентированных технологиях возделывания агрокультур. Выявленные механизмы могут служить основой для разработки биопрепаратов, эффективных не только в моделях «растение-моноизolat», но и в условиях комплексных микробных сообществ. Дальнейшее изучение эндофитных штаммов *B. subtilis* в контексте холобионта, включая их взаимодействие с ризосферными микробиоценозами и влияние на метагеномный профиль, представляет значительный интерес.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что *B. subtilis* 10-4 обладает комплексом свойств, присущих ростстимулирующим бактериям: (а) продукция ИУК, СК, АБК и сидерофоров; (б) фиксация атмосферного азота; (в) толерантность к имитирующему засуху осмотическому стрессу, засолению, тяжелым металлам, пестицидам; (г) отсутствие фитотоксичности в отношении однодольных и двудольных растений; (д) ингибирование роста фитопатогенов-возбудителей экономически опасных заболеваний растений *in vitro*, включая *Fusarium* spp., *A. alternata*, *Ph. infestans*; (е) ростстимулирующий и протекторный эффект на агрокультуры (пшеница, сахарная свекла, картофель, горох, фасоль) на клеточном и организменном уровнях в стрессовых условиях.

2. Установлено, что общие (универсальные) защитные реакции растений, индуцируемые эндофитными *B. subtilis* в условиях разных по природе стрессов (водного дефицита, засоления, Cd стресса, комбинации фузариоз+засуха, гербицид+засуха) включают в себя эффективную колонизацию внутренних тканей растений, снижение уровня перекисного окисления липидов, регуляцию уровня пролина и поддержание повышенной фотосинтетической активности, что проявляется в снижении степени повреждающего эффекта стрессов на растительные организмы, и, в конечном итоге предотвращает потери урожая.

3. Выявлено разнонаправленное влияние *B. subtilis* на устойчивость растений пшеницы двух контрастных по стратегии адаптации к засухе экотипов (лесостепного западносибирского и степного волжского) в условиях водного дефицита на начальных этапах онтогенеза. Наиболее выраженный защитный эффект на уровне клеток и целого организма проявлялся при применении *B. subtilis* на устойчивых сортах степного экотипа. Различия в накоплении пролина под влиянием эндофитов в разных экотипах свидетельствуют о способности *B. subtilis* задействовать разные пути защиты.

4. Установлено, что опосредованная эндофитом *B. subtilis* 10-4 устойчивость различающихся по адаптивным стратегиям растений пшеницы в условиях дефицита влаги на ранних стадиях онтогенеза связана с предотвращением резкого сдвига в балансе ИУК/АБК, вызываемого стрессом и поддержанием повышенного уровня ЦК: (а) ростстимулирующий эффект обусловлен быстрым 1,5–2-кратным накоплением ИУК на фоне отсутствия изменений в концентрации ЦК и АБК; (б) антистрессовый – с предотвращением вызываемого стрессом падения

ИУК и уменьшением амплитуды сдвигов в балансе АБК/ЦК, а также с усилением синтеза лигнина и суберина в корнях с максимальными значениями для устойчивого сорта пшеницы.

5. Впервые в мире продемонстрирована ключевая роль вызываемого эндофитом *B. subtilis* 10-4 накопления эндогенной СК в растениях как гормонального интермедиата в реализации антистрессового эффекта этих бактерий на растения пшеницы с контрастными стратегиями адаптации к засухе в начальных стадиях вегетации.

6. Впервые показано, что эндофитные *B. subtilis* оказывают стресс-протекторный эффект на интегральные ростовые показатели и фотохимическую активность ФСII пшеницы с контрастными стратегиями адаптации к засухе. Защитное действие эндофитов при водном дефиците проявляется в повышении максимального (F_v/F_m) и эффективного $Y(II)$ квантовых выходов, и снижении квантового выхода нерегулируемой диссипации энергии ($Y(NO)$) ФСII, что в конечном итоге способствует поддержанию повышенной фотосинтетической активности в стрессовых условиях, а в пост-стрессовый период – быстрому восстановлению до контрольных значений.

7. Впервые установлено, что ключевую роль в реализации вызываемого эндофитом *B. subtilis* снижения окислительных повреждений клеток и стабилизации редокс-статуса растений пшеницы на ранних этапах онтогенеза (прорастание-всходы) играют аскорбат для устойчивого сорта и глутатион для чувствительного сорта; на более поздних стадиях развития (кущение) – глутатион редуктаза для обоих сортов.

8. Выявлено, что предпосевная инокуляция семян *B. subtilis* (10-4, 26Д) оказывает пролонгированный защитный эффект на рост и биохимические показатели (содержание хлорофиллов, пролина, редокс-статус) контрастных по стратегии засухоустойчивости экотипы пшеницы при комбинированном стрессе (гербицид+засуха) и способствует ускоренному их восстановлению в пост-стрессовый период.

9. Впервые выявлено участие эндогенной ГАМК в опосредованной эндофитными *B. subtilis* адаптации и устойчивости к комбинированному воздействию засухи и гербицидного прессинга растений пшеницы, различающихся (контрастных) по стратегии адаптации к обезвоживанию. Колонизация растений эндофитными *B. subtilis* способствует повышению базового уровня ГАМК (до стресса) и быстрому накоплению при возникновении стресса в сравнении с контролем.

10. Установлено, что у устойчивого экотипа пшеницы инокуляция усиливает генетически заложенные защитные механизмы, у чувствительного – компенсирует недостающие, что отражается в повышении урожайности зерна с улучшением аминокислотного профиля (включая увеличение доли незаменимых аминокислот валина, лизина, треонина, фенилаланина, гистидина, триптофана, лейцина+изолейцина), минерального комплекса (N, P, K, Fe, Cu, Zn) и хлебопекарных показателей (ИДК, число падения).

11. Впервые с помощью полногеномного секвенирования и функциональной аннотации генома *B. subtilis* 10-4 выявлены функционально-важные свойства и ключевые гены, ассоциированные с проявлением ростостимулирующих и антистрессовых свойств эндофита на различные растения и при разных стрессах, что подтверждается данными о влиянии бактерии на растения-хозяева на клеточном и организменном уровнях. Эти гены связаны с: (а) колонизацией (подвижность, хемотаксис, адгезия, формирование биопленок, синтез ЭПС); (б) усвоением питательных элементов (N, P, K, S, Fe); (в) синтезом сидерофоров, фитогормонов (ауксины, СК) и других биоактивных соединений (витамин B6, летучие вещества ацетон, 2,3-бутандиол); (г) биоконтролем (NRPS-кластеры бацитилина, бациллаена, субтилозина А, бациллибактина, сурфактина, фенгицина, пилипастатина, уникальный терпеновый кластер, сакти- и рантипептиды, протеазы, глюканазы); (д) устойчивостью к абиотическим стрессам, включая гены синтеза осмопротекторов (пролин, глицин бетаин, ГАМК), полиамина спермидина, детоксикации АФК (СОД, глутатион); (е) регуляцией общих стресс-реакций и клеточной сигнализации, устойчивости к агрессивным условиям среды и мн.др..

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных изданиях из Перечня российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук:

1. Ласточкина, О.В. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* 26Д на засухоустойчивость растений яровой мягкой пшеницы сортов лесостепного западносибирского и степного волжского

экотипов на начальных этапах онтогенеза / О.В. Ласточкина, Р.А. Юлдашев, Л.И. Пусенкова // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. – 2017. – Т. 3. – № 1. – С. 99–102.

2. Пусенкова, Л.И. Повышение адаптивного потенциала посевов сахарной свеклы микробными биопрепаратами в условиях биотических и абиотических стрессов / Л.И. Пусенкова, Е.Ю. Ильясова, И.В. Максимов, **О.В. Ласточкина** // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 1. – С. 115–123.

Публикации в научных изданиях из Перечня отечественных изданий, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (ВАК-МБД):

3. Пусенкова, Л.И. Изменение видового состава микрофлоры ризосферы и филлосферы сахарной свеклы под влиянием биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и их метаболитов / Л.И. Пусенкова, Е.Ю. Ильясова, **О.В. Ласточкина**, И.В. Максимов, С.А. Леонова // Почвоведение. – 2016. – Т. 10. – С. 1205–1213.

4. **Ласточкина, О.В.** Физиолого-биохимические ответы растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), зараженных грибом *Alternaria alternata*, на применение микробных препаратов на основе *Bacillus subtilis* / **О.В. Ласточкина**, Л.И. Пусенкова, Р.А. Юлдашев, Е.Ю. Ильясова, С. Алиниэфард // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 5. – С. 958–968.

5. Гарипова, С.Р. Влияние инокуляции растений фасоли эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* на рост проростков в модельных опытах и продуктивность в условиях Южного Предуралья / С.Р. Гарипова, А.С. Шаяхметова, **О.В. Ласточкина**, К.А. Федорова, Л.И. Пусенкова // Агрохимический вестник. – 2020. – Т. 6. – С. 48–53.

6. **Ласточкина, О.В.** Адаптация и устойчивость растений пшеницы к засухе, опосредованная природными регуляторами роста *Bacillus* spp.: механизмы реализации и практическая значимость // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 5. – С. 843–867.

7. **Ласточкина, О.В.** Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на рост проростков и лигнификацию корней *Pisum sativum* L. в норме и в условиях натрий-хлоридного засоления / **О.В. Ласточкина**, С.Р. Гарипова, Л.И. Пусенкова, Д. Гаршина. Ан.Х. Баймиев, И.С. Коряков // Физиология растений. – 2023. – Т. 70. – № 5. – С. 514–525.

8. **Ласточкина, О.В.** Механизмы рост-стимулирующего и защитного действия эндофитных PGP-бактерий в растениях пшеницы при воздействии засухи (обзор) / **О.В. Ласточкина**, Ч.Р. Аллагулова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – 59. – № 1. – С. 17–37.

9. Гарипова, С.Р. Влияние состава питательной среды для культивирования бактерий и дозы препарата *Bacillus subtilis* 10-4 на ростовые показатели и продуктивность растений пшеницы / С.Р. Гарипова, Л.И. Пусенкова, **О.В. Ласточкина**, К.А. Федорова, М.А. Дедова, О.В. Маркова, В.Д. Матюнина, Р.А. Юлдашев // Агрохимия. – 2023. – Т. 3. – С. 60–69.

10. Пусенкова, Л.И. Предпосадочная инокуляция эндофитами как способ управления семенной продуктивностью и качеством оздоровленных клубней картофеля / Л.И. Пусенкова, С.Р. Гарипова, **О.В. Ласточкина**, В.А. Валиева, А.В. Чистоедова, В.Д. Матюнина // Агрохимический Вестник. – 2024. – Т. 5. – С. 78–86.

11. Авальбаев, А.М. Анализ засухоустойчивости различающихся по стратегии адаптации к засухе растений пшеницы *Triticum aestivum* L. на начальном этапе онтогенеза / А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ч.Р. Аллагулова, А.А. Плотников, **О.В. Ласточкина** // Сельскохозяйственная биология. – 2024. – Т. 59. – № 1. – С. 131–141.

Публикации в изданиях, включенных в международные базы данных Web of Science, Scopus:

12. **Lastochkina, O.** Whole-genome analysis of PGP endophytic *Bacillus subtilis* 10-4: Unraveling molecular insights into plant growth and stress resilience / **O. Lastochkina**, L. Pusenkova // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – V. 26(24). – Art. 11904. Doi: 10.3390/ijms262411904.

13. Pusenkova, L.I. Enhancing disease resistance in plants and stored potato tubers through inoculation of seed tubers with the endophyte *Bacillus subtilis* 10-4 and genomic analysis of its antimicrobial properties / L.I. Pusenkova, **O.V. Lastochkina** // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2024. – V. 60. – № 6. – P. 1338–1350. Doi: 10.1134/S0003683824605304.

14. Markova, O. Predicting field effectiveness of endophytic *Bacillus subtilis* inoculants for common bean using morphometric and biochemical markers / O. Markova, S. Garipova, A. Chistoedova,

- V. Matyunina, A. Lubyanova, **Lastochkina O.**, A. Garipov, I. Shpimaya, L. Pusenkova // Plants. – 2024. – V. 13(13). – Art. 1769. Doi: 10.3390/plants 13131769.
15. **Lastochkina, O.** Effect of seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* on some physiobiochemical parameters of two wheat varieties exposed to drought after selective herbicide application / **O. Lastochkina**, A. Yakupova, I. Avtushenko, A. Lastochkin, R. Yuldashev // Plants. – 2023. – V. 12(8). – Art. 1724. Doi: 10.3390/plants 12081724.
16. Maslennikova, D. Endophytic plant growth-promoting bacterium *Bacillus subtilis* reduces the toxic effect of cadmium on wheat plants / D. Maslennikova, I. Koryakov, R. Yuldashev, I. Avtushenko, A. Yakupova, **O. Lastochkina** // Microorganisms. – 2023. – V. 11(7). – Art. 1653. Doi: 10.3390/microorganisms 11071653.
17. Lubyanova, A.R. The effects of seed pretreatment with endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on the water balance of spring and winter wheat seedlings under short-time water deficit / A.R. Lubyanova, C.R. Allagulova, **O.V. Lastochkina** // Plants. – 2023. – V. 12. – Art. 2684. Doi: 10.3390/plants12142684.
18. **Lastochkina, O.** The contribution of hormonal changes to the protective effect of endophytic bacterium *Bacillus subtilis* on two wheat genotypes with contrasting drought sensitivities under osmotic stress / **O. Lastochkina**, R. Yuldashev, A. Avalbaev, C. Allagulova, S. Veselova // Microorganisms. – 2023. – V. 11(12). – Art. 2955. Doi: 10.3390/microorganisms11122955.
19. **Lastochkina, O.** Potential roles for endophytic plant growth-promoting microbes in wheat adaptation and tolerance under herbicide and drought stresses combination / **O. Lastochkina**, M. Bosacchi // Turkish Journal of Agriculture and Forestry. – 2023. – V. 47(5). – P. 688–712. Doi: 10.55730/1300-011X.3121.
20. Pusenkova, L. The potential of hydroponic seed minituber enrichment with the endophyte *Bacillus subtilis* for improving the yield components and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) / L. Pusenkova, **O. Lastochkina**, S. Ercişli // Agriculture. – 2023. – V. 13(8). – Art. 1626. Doi: 10.3390/agriculture 13081626.
21. **Lastochkina, O.** Role of endogenous salicylic acid as a hormonal intermediate in the bacterial endophyte *Bacillus subtilis*-induced protection of wheat genotypes contrasting in drought susceptibility under dehydration / **O. Lastochkina**, S. Ivanov, S. Petrova, D. Garshina, A. Lubyanova, R. Yuldashev, B. Kuluev, E. Zaikina, D. Maslennikova, C. Allagulova, I. Avtushenko, A. Yakupova, R. Farkhutdinov // Plants. – 2022. – V. 11. – Art. 3365. Doi: 10.3390/plants 11233365.
22. **Lastochkina, O.** Novel approaches for sustainable horticultural crop production: advances and prospects / **O. Lastochkina**, S. Aliniaiefard, M. SeifiKalhor, M. Bosacchi, D. Maslennikova, A. Lubyanova // Horticulturae. – 2022. – V. 8(10). – Art. 910. Doi: 10.3390/horticulturae8100910.
23. Garipova, S.R. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria // S.R. Garipova, O.V. Markova, K.A. Fedorova, M.A. Dedova, M.A. Iksanova, A.A. Kamaletdinova, **O.V. Lastochkina**, L.I. Pusenkova // Acta Physiologiae Plantarum. – 2022. – V. 44. – Art. 89. Doi: 10.1007/s11738-022-03427-1.
24. **Lastochkina, O.** Improving the biocontrol potential of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* with salicylic acid against *Phytophthora infestans*-caused postharvest potato tuber late blight and impact on stored tubers quality / **O. Lastochkina**, L. Pusenkova, D. Garshina, C. Kasnak, R. Palamutoglu, I. Shpimaya, I. Mardanshin, I. Maksimov // Horticulturae. – 2022. – V. 8(2). – Art. 117. Doi: 10.3390/horticulturae8020117.
25. **Lastochkina, O.** Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages / **O. Lastochkina**, S. Aliniaiefard, D. Garshina, S. Garipova, L. Pusenkova, Ch. Allagulova, K. Fedorova, A. Baymiev, I. Koryakov, M. Sobhani // Journal of Plant Physiology. – 2021. – V. 263. – Art. 153462. Doi: 10.1016/j.jplph.2021.153462.
26. Maslennikova, D. Contribution of ascorbate and glutathione in endobacteria *Bacillus subtilis* mediated drought tolerance in two *Triticum aestivum* L. genotypes contrasting in drought sensitivity / D. Maslennikova, **O. Lastochkina** // Plants. – 2021. – V. 10(12). – Art. 2557. Doi: 10.3390/plants10122557.
27. **Lastochkina, O.** Potential aspects of plant growth promoting bacteria to improve horticultural crop production / **O. Lastochkina**, D. Garshina, Ch. Allagulova, L. Pusenkova, S. Garipova, D. Maslennikova, K. Fedorova, I. Shpimaya, A. Ibragimov, I. Koryakov, A. Sakhapova, G. Yuldasbaeva, A. Dmitrieva, M. Sobhani, S. Aliniaiefard // Int. J. Hortic. Sci. Techn. – 2021. – V. 8(2). – P. 103–122. Doi: 10.22059/ijhst.2020.314562.422.

28. **Lastochkina, O.** Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* modulates physiological responses of two different *Triticum aestivum* L. cultivars under drought stress / **O. Lastochkina**, D. Garshina, S. Ivanov, R. Yuldashev, R. Khafizova, Ch. Allagulova, K. Fedorova, A. Avalbaev, D. Maslennikova, M. Bosacchi // Plants. – 2020. – V. 9(12). – Art. 1810. Doi: 10.3390/plants9121810.

29. **Lastochkina, O.** Application of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid to improve wheat growth and tolerance under combined drought and Fusarium root rot stresses / **O. Lastochkina**, D. Garshina, C. Allagulova, K. Fedorova, I. Koryakov, A. Vladimirova // Agronomy. – 2020. – V. 10. – Art. 1343. Doi: 10.3390/agronomy10091343.

30. **Lastochkina, O.** Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers / **O. Lastochkina**, A. Baymiev, A. Shayahmetova, D. Garshina, I. Koryakov, I. Shpimaya, L. Pusenkova, I. Mardanshin, C. Kasnak, R. Palamutoglu // Plants. – 2020. – V. 9. – Art. 76. Doi: 10.3390/plants9010076.

31. **Lastochkina, O.** The effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and salicylic acid on some resistance and quality traits of stored *Solanum tuberosum* L. tubers infected with fusarium dry rot / **O. Lastochkina**, L. Pusenkova, D. Garshina, R. Yuldashev, I. Shpimaya, C. Kasnak, R. Palamutoglu, I. Mardanshin, S. Garipova, M. Sobhani, S. Aliniaiefard // Plants. – 2020. – V. 9(6). – Art. 738. Doi: 10.3390/plants9060738.

32. Seifikalhor, M. Diverse role of γ -aminobutyric acid in dynamic plant cell responses / M. Seifikalhor, S. Aliniaiefard, B. Hassani, V. Niknam, **O. Lastochkina** // Plant Cell Reports. – 2019. – V. 38(8). – P. 847–867. Doi: 10.1007/s00299-019-02396-z.

33. **Lastochkina, O.** *Bacillus* spp.: Efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables / **O. Lastochkina**, M. Seifi Kalhor, S. Aliniaiefard, An. Baymiev, L. Pusenkova, S. Garipova, D. Kulabuhova, I. Maksimov // Plants. – 2019. – V. 8(4). – Art. 97. Doi: 10.3390/plants8040097.

34. **Lastochkina, O.** Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity / **O. Lastochkina**, L. Pusenkova, R. Yuldashev, M. Babaev, S. Garipova, D. Blagova, R. Khairullin, S. Aliniaiefard // Plant Physiology and Biochemistry. – 2017. – V. 121. – P. 80–88. Doi: 10.1016/j.plaphy.2017.10.020.

Публикации в изданиях, входящих в базу РИНЦ:

35. Аллагулова Ч.Р. Влияние *Bacillus subtilis* 10-4 на гормональную систему и показатели водного режима растений пшеницы при обезвоживании / Авальбаев А.М., Лубянова А.Р., Р.А. Юлдашев, **О.В. Ласточкина** // Биомика. – 2023. – Т. 15. – № 1. – С. 33–40.

36. Аллагулова, Ч.Р. Снижение уровня окислительного стресса в растениях пшеницы под влиянием эндофитных бактерий в условиях засухи / Ч.Р. Аллагулова, **О.В. Ласточкина** // Экобиотех. – 2020. – Т. 3. – № 2. – С. 129–134.

37. Пусенкова, Л.И. Эффективность инокуляции яровой пшеницы эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д / Л.И. Пусенкова, С.Р. Гарипова, **О.В. Ласточкина**, Р.А. Юлдашев // Проблемы агрохимии и экологии. – 2020. – Т. 3. – С. 56–64.

Главы в монографиях:

38. **Lastochkina, O.** *Bacillus subtilis*-mediated abiotic stress tolerance in plants // *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*, In: M.T. Islam, M.M. Rahman, P. Pandey, M.H. Boehme, G. Haesaert (eds.) – Springer Nature. Switzerland AG. 2020. – Doi: 10.1007/978-3-030-15175-1_6.

39. **Lastochkina, O.** Plant growth promoting bacteria – biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat / **O. Lastochkina**, Aliniaiefard S., Kalhor M.S., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. – Wheat Production in Changing Environments: Management Adaptation and Tolerance, In: Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain A. (eds.) – Springer. 2019. Doi: 10.1007/978-981-13-6883-7_23.



Подписано в печать 06.07.2026 г.
Бумага офсетная. Формат 210х297.
Отпечатано на цифровом оборудовании в типографии ООО «Принт+»,
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71.
Заказ № 018. Тираж 100 экз.