

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ УФИМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УФИМСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ НАУКИ И ТЕХНОЛОГИЙ»

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Уфа – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	9
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	24
1.1. Проблема устойчивости растений к абиотическим стрессам.....	24
1.2. Роль PGP-бактерий в повышении устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам среды.....	32
1.2.1. Эндофитные PGP-бактерии: распространение, разнообразие, колонизация и физиологические функции в растениях.....	36
1.2.2. <i>Bacillus</i> spp. – типичные представители эндофитных PGP-бактерий	46
1.2.3. Роль <i>Bacillus</i> spp. в микроб-индуцированной системной устойчивости растений к абиотическим стрессам.....	49
1.2.3.1. Стимулирование роста растений.....	53
1.2.3.2. Модификация архитектуры корней, повышение доступности воды, макро-/микроэлементов в стрессовых условиях.....	57
1.2.3.3. Продукция фитогормонов и регуляция их уровня в растениях	59
1.2.3.4. Модуляция процессов фотосинтеза.....	66
1.2.3.5. Регуляция синтеза антиоксидантов и снижение окислительного стресса.....	67
1.2.3.6. Регуляция процессов водного обмена, продукция осмолитов и снижение осмотического стресса.....	69
1.2.3.7. Продукция биологически активных метаболитов и перепрограммирование метаболических и молекулярных механизмов во время стрессовых воздействий.....	72
1.3. Факторы эффективного взаимодействия растений с PGP-бактериями в условиях абиотических стрессов.....	79
1.3.1. Генотипическая и экотипическая специфичность действия.....	79
1.3.2. Стресс-толерантные штаммы PGP-бактерий и их роль в устойчивости растений <i>in planta</i>	83

1.3.3. Прогнозирование эффективности взаимодействия растений с RGP-бактериями в стрессовых условиях произрастания: роль геномного анализа..	84
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	89
2.1. Объекты исследований.....	89
2.2. Идентификация <i>B. subtilis</i> , полногеномное секвенирование и анализ физико-химических свойств, ассоциированных с ростстимуляцией и антистрессовым эффектом на растения.....	90
2.2.1. Морфолого-культуральная идентификация.....	90
2.2.2. Выделение бактериальной ДНК и молекулярно-генетическая идентификация по 16S рРНК.....	91
2.2.3. Полногеномное секвенирование <i>B. subtilis</i>	91
2.2.4. Построение филогеномного древа.....	92
2.2.5. Оценка основных физико-химических и ростстимулирующих свойств.....	92
2.2.6. Оценка <i>in vitro</i> антагонистической активности.....	92
2.2.7. Оценка стресс-толерантности <i>B. subtilis</i>	93
2.2.8. Оценка фитотоксичности для высших однодольных и двудольных растений.....	93
2.3. Функциональная аннотация и биоинформатический анализ полного генома <i>B. subtilis</i> с помощью инструментов <i>in silico</i> (RAST, antiSMASH, CARD, KEEG).....	94
2.4. Приготовление бактериального инокулюма и обработка семян.....	94
2.5. Постановка экспериментов с растениями и условия их выращивания.....	94
2.6. Анализ прорастания и роста растений при воздействии абиотических стрессов.....	96
2.7. Оценка способности <i>B. subtilis</i> колонизировать внутренние ткани растений (эндофитность).....	97
2.8. Определение содержания фитогормонов ИУК, АБК и ЦК.....	98
2.9. Определение содержания СК методом ВЭЖХ.....	100

2.10. Определение содержания фотосинтетических пигментов, площади листьев и морфометрических характеристик устьиц.....	101
2.11. Оценка фотохимической активности фотосинтетического аппарата с помощью импульсного флуориметра IMAGING-PAM-MAXI.....	101
2.12. Определение параметров водного баланса и водоудерживающей способности растений.....	102
2.13. Определение уровня развития окислительного стресса.....	102
2.14. Определение активности антиоксидантных ферментов	103
2.15. Определение содержания неферментативных антиоксидантов.....	104
2.16. Определение концентрации пролина.....	105
2.17. Определение содержания эндогенной ГАМК.....	105
2.18. Оценка отложения и локализации лигнина и суберина в корнях.....	106
2.19. Выделение РНК и определение относительного уровня экспрессии генов защитных белков.....	108
2.20. Анализ элементов структуры урожая, биохимического состава и качества зерна.....	109
2.21. Статистическая обработка результатов.....	110
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	111
ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, РОСТСТМУЛИРУЮЩИЕ И АНТИСТРЕССОВЫЕ СВОЙСТВА <i>B. subtilis</i> 10-4 НА РАЗЛИЧНЫЕ РАСТЕНИЯ.....	111
3.1. Морфолого-культуральные свойства, идентификация, антагонистическая активность <i>B. subtilis</i> 10-4.....	111
3.2. Ростстимулирующие и физико-химические свойства <i>B. subtilis</i> 10-4....	115
3.3. Оценка фитотоксичности клеток <i>B. subtilis</i> 10-4 в отношении высших однодольных и двудольных растений.....	121
3.4. Анализ влияния инокуляции семян клетками штамма <i>B. subtilis</i> 10-4 в разных концентрациях на рост растений пшеницы.....	121

3.5. Анализ эндифитности штамма <i>B. subtilis</i> 10-4 на растениях пшеницы, фасоли и картофеля.....	124
3.6. Оценка толерантности клеток <i>B. subtilis</i> 10-4 к экстремальным условиям культивирования <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	126
3.7. Морфифизиологические параметры и устойчивость различных растений к стрессовым факторам среды под влиянием эндифитных штаммов <i>B. subtilis</i>	132
ГЛАВА 4. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ИНОКУЛИРОВАННЫХ ЭНДОФИТНЫМИ <i>B. subtilis</i> РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ С РАЗНЫМИ СТРАТЕГИЯМИ АДАПТАЦИИ ПРИ ОБЕЗВОЖИВАНИИ.....	156
4.1. Инокуляция эндифитными <i>B. subtilis</i> по-разному модулирует прорастание семян и рост проростков пшеницы с разными стратегиями адаптации в условиях дефицита воды на ранних этапах онтогенеза	156
4.2. Анализ влияния эндифитных бактерий <i>B. subtilis</i> на концентрацию пролина в растениях пшеницы с разными адаптивными стратегиями при дефиците влаги.....	161
4.3. Влияние инокуляции семян эндифитными <i>B. subtilis</i> на проницаемость и целостность мембранных структур клеток пшеницы с разными адаптивными стратегиями в условиях недостатка воды	163
4.4. Влияния бактерий <i>B. subtilis</i> на водоудерживающую способность растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при обезвоживании.....	164
ГЛАВА 5. ВКЛАД ГОРМОНАЛЬНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОФИТНЫХ <i>B. subtilis</i> НА РАЗЛИЧАЮЩИЕСЯ ПО СТРАТЕГИИ АДАПТАЦИИ К ЗАСУХЕ РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ.....	167
5.1. Роль эндогенных АБК, ИУК и ЦК в <i>B. subtilis</i> -опосредованной устойчивости различающихся по адаптивным стратегиям пшеницы при дефиците влаги.....	167

5.1.1. Влияние эндофитных <i>B. subtilis</i> на компоненты клеточных стенок корней (лигнин, суберин).....	172
5.2. Оценка роли СК в <i>B. subtilis</i> -опосредованных защитных реакциях проростков пшеницы в условиях засухи с использованием 1-аминобензотриазола (АВТ).....	177
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ И КЛЕТОК ЭНДОФИТНЫХ <i>B. subtilis</i> НА СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У РАСТЕНИЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО АДАПТИВНЫМ СТРАТЕГИЯМ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ.....	187
6.1. Изменение содержания фотосинтетических пигментов в листьях инокулированных <i>B. subtilis</i> проростков пшеницы с разными адаптивными стратегиями при ПЭГ-индуцированном дефиците воды.....	187
6.2. Влияние инокуляции <i>B. subtilis</i> (10-4, 26Д) и дефицита влаги (ПЭГ) на параметры фотосистемы II растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при дефиците воды.....	190
6.3. Влияние инокуляции <i>B. subtilis</i> на морфометрические характеристики устьиц проростков пшеницы с разными адаптивными стратегиями при дефиците влаги.....	192
ГЛАВА 7. ВКЛАД КОМПОНЕНТОВ ASA-GSH КОМПЛЕКСА В ВЫЗЫВАЕМУЮ ЭНДОФИТНЫМИ <i>B. subtilis</i> СТАБИЛИЗАЦИЮ РЕДОКС-СТАТУСА У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ С РАЗНЫМИ СТРАТЕГИЯМИ АДАПТАЦИИ ПРИ ОБЕЗВОЖИВАНИИ.....	197
7.1. Оценка уровня генерации пероксида водорода (H ₂ O ₂) и перекисного окисления липидов у различающихся по стратегии адаптации к обезвоживанию экотипов пшеницы в условиях дефицита влаги.....	199
7.2. Влияние инокуляции семян <i>B. subtilis</i> 10-4 на содержание аскорбата (AsA) и глутатиона (GSH) у различающихся по стратегии адаптации к обезвоживанию экотипов пшеницы в условиях дефицита влаги	202
7.3. Влияние инокуляции <i>B. subtilis</i> 10-4 на активность аскорбат	

пероксидазы (APX) и глутатион редуктазы (GR) у различающихся по стратегии адаптации к обезвоживанию экотипов пшеницы в условиях дефицита влаги	204
ГЛАВА 8. РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ <i>B. subtilis</i> В ПРОЛОНГИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДНОГО ПРЕССИНГА И ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ.....	209
8.1. Фенотипическая и ростовая реакция инокулированных эндофитными <i>B. subtilis</i> растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями в условиях комбинированного воздействия гербицида и почвенной засухи (ГБЗ) в вегетационных экспериментах.....	212
8.2. Влияние инокуляции <i>B. subtilis</i> на содержание фотосинтетических пигментов хлорофиллов и площадь листьев растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при комбинированном стрессе и в пост-стрессовый период.....	217
8.3. Анализ окислительного и осмотического статуса инокулированных эндофитными <i>B. subtilis</i> растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при комбинированном стрессе и в пост-стрессовый период.....	219
8.4. Вовлечение эндогенной ГАМК в процессы <i>B. subtilis</i> -опосредованной адаптации пшеницы с разными адаптивными стратегиями в условиях ГБЗ.....	227
8.5. Анализ влияния предпосевной инокуляции эндофитными <i>B. subtilis</i> на формирование элементов структуры урожая, биохимический состав и качество зерна пшеницы с контрастными стратегиями адаптации к обезвоживанию.....	231
ГЛАВА 9. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И АНТИСТРЕССОВОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОФИТА <i>B. subtilis</i> 10-4 НА РАСТЕНИЯ.....	239
9.1. Полногеномное секвенирование <i>B. subtilis</i> 10-4.....	239

9.2. Функциональная аннотация и биоинформатический анализ генома <i>B. subtilis</i> 10-4.....	241
9.2.1. Гены <i>B. subtilis</i> 10-4, участвующие в колонизации и взаимодействии растениями.....	246
9.2.2. Метаболические пути <i>B. subtilis</i> 10-4, лежащие в основе ростстимулирующей и антистрессовой активностей на растения.....	247
9.2.3. Гены биосинтеза вторичных метаболитов в геноме <i>B. subtilis</i> 10-4	255
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	267
ВЫВОДЫ.....	271
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	274
Приложение.....	339

СПИСОК НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АВТ – 1-аминобензотриазол

АФК – активные формы кислорода

ВС – водоудерживающая способность

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГБЗ – комбинированное воздействие гербицида и почвенной засухи

ЖК – жасмоновая кислота

МДА – малоновый диальдегид

СК – салициловая кислота

O_2^- – супероксидный анион-радикал

H_2O_2 – пероксид водорода

СОД – супероксиддисмутаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

МДА – малоновый диальдегид

Хл – хлорофилл

ПЭГ – полиэтиленгликоль-6000

AsA – аскорбат

APX – аскорбатпероксидаза

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

ISR – induced systemic resistance (индуцированная системная устойчивость)

MIST – microbe induced systemic tolerance (микроб индуцированная системная устойчивость)

PGP-бактерии – ростстимулирующие бактерии (plant growth-promoting bacteria)

PR-белки – pathogenesis-related proteins

NaCl – хлорид натрия

WGS – whole genome sequencing (полногеномное секвенирование)

GPX – глутатионпероксидаза

GR – глутатионредуктаза

GSH и GSSG – восстановленная и окисленная формы глутатиона

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Растения во всем мире подвергаются различным абиотическим стрессам, таким как засуха, засоление, экстремальные температуры, негативно влияющим на рост, развитие и продуктивность агрокультур, приводя к значительным потерям урожая и качества продукции (Kosova et al., 2015; Lesk et al., 2016; Benedetto et al., 2017; Ojuederie et al., 2019; FAO, 2016; 2021; 2022; Farooqi et al., 2020; Zandalinas et al., 2021; 2022; Zhang et al., 2022; dos Santos et al., 2022), что наносит значительный ущерб сельскому хозяйству, пищевой промышленности и экономике в целом (Asseng et al., 2019; Todorova et al., 2021; 2022). Эти стрессы зачастую взаимосвязаны и активируют общие сигнальные пути регуляции клеточных реакций, направленных на адаптацию, и, следовательно, вызывают сходные морфофизиологические, биохимические и молекулярно-генетические изменения у растений (Munns, Tester, 2008; Huang et al., 2008; Potters et al., 2009; dos Santos et al., 2022; Jiang et al., 2025). Нарушая метаболизм растений на физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях, абиотические стрессы препятствует 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 растений (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020; Ahmad et al., 2018; Jiang et al., 2025). Хотя растения и обладают широким спектром защитно-приспособительных механизмов, их часто оказывается недостаточно для противодействия стрессам, частота и интенсивность которых в условиях глобального изменения климата неуклонно растет (FAO, 2016; 2021; 2022; Farooqi et al., 2020). В связи с этим проблема устойчивости растений многие годы остается одной из центральных в физиологии и биохимии растений.

Среди абиотических стресс-факторов, засуха является наиболее серьезной проблемой, особенно в условиях глобального потепления климата (Asseng et al., 2019; Ozturk et al., 2021). Засушливые и полужасушливые земли занимают около 40% площади суши, а дефицит воды может снижать урожайность культур на 50–80% ежегодно (Zhang et al., 2018). Наиболее широко культивируемым злаком (наряду с рисом и кукурузой),

подверженным воздействию дефицита воды, является пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важнейшая продовольственная культура, обеспечивающая более 50% потребности человека в пищевой энергии (FAO, 2016; 2021; 2022; Benedetto et al., 2017; Ahmad et al., 2018) и основной источник питательных веществ для 40% населения земного шара (Asseng et al., 2019). Согласно данным Международного совета по зерну (International Grains Council, IGC; <https://www.igc.int/en/default.aspx>) мировое производство пшеницы в 2021/2022 году составило 781 млн тонн при посевной площади около 220 млн га, что составляет 30% от общего объема производства зерновых культур. Почти 70% урожая пшеницы потребляется непосредственно в продовольственных целях, тогда как оставшиеся 30% приходятся на кормовые нужды животноводства и промышленную переработку. В целом, на долю этой культуры приходится 20% от общего количества пищевых калорий и 25% растительных белков, потребляемых в мире, что делает её ключевым компонентом продовольственной безопасности (IGC, 2022). Поскольку ожидается, что к 2050 году население земли превысит 10 млрд человек (<https://www.fao.org/home/en>) для обеспечения потребностей человека в питательных веществах мировой спрос на пшеницу должен увеличиться примерно на 70% (Benedetto et al., 2017; Zhang et al., 2018; Ahmad et al., 2018; FAO, 2021; 2022; Zandalinas et al., 2021). Мета-анализ данных показывает, что засуха заметно снижает агрономические характеристики (высоту растений, биомассу, урожайность и компоненты урожайности) пшеницы, и будущие засухи могут привести к еще более значительным потерям урожая. Более 60% всех посевных площадей пшеницы расположены в районах с недостаточным и нестабильным увлажнением (Benedetto et al., 2017; Ahmad et al., 2018; FAO, 2021; 2022).

На протяжении всего жизненного цикла растения живут в тесной связи с разнообразной микробиотой (Compant et al., 2019). Современная наука определяет растения как холобионты – единую систему с микроорганизмами, функционирующие как целое и эволюционирующие совместно (Compant et al., 2019; Галиева и др., 2023; Mukherjee et al., 2025). Поддержание баланса такой сложной системы (названной «экосистемой на поводке» (Foster et al., 2017)) критически важно для ее устойчивости и реализации взаимовыгодных отношений. В условиях стресса (засухи) растения направленно отбирают микроорганизмы, синтезирующие фитогормоны, осмолиты и

антиоксиданты. Эти бактерии не только стимулируют рост корневой системы, улучшая поглощение воды, но и «кооперируются» друг с другом, чтобы усилить стрессоустойчивость холобионта. Такой симбиоз превращается в стратегию выживания, где микробный компонент холобионта выступает ключевым звеном в его адаптации к экстремальным условиям. Применение полезных ростстимулирующих бактерий (PGP-бактерий, Plant Growth-Promoting Bacteria) рассматривается как природная стратегия повышения адаптивного потенциала и стресс-устойчивости растений (Максимов и др., 2011; 2018; Abd El-Daim et al., 2019; Fadiji et al., 2020; Awan et al., 2020; Glick, 2020; Velloso et al., 2021; Oyedoh et al., 2025). Эндофитные PGP-бактерии колонизируют внутренние ткани растений и их экологические ниши отличаются повышенной стабильностью (в отличие от других ассоциированных с растениями микроорганизмов): они защищены от резких колебаний влажности, УФ-излучения и дефицита питательных веществ, что делает их ключевыми «игроками» в долгосрочной адаптации к экстремальным условиям (Галиева и др., 2023). Эндофиты эволюционировали как промежуточная группа между сапрофитными бактериями и фитопатогенами, и любой из 300 000 видов растений, существующих в мире, может быть хозяином одного или нескольких видов эндофитов (Redman et al., 2011). Растение может легче адаптироваться к стрессу вместе с различными бактериальными популяциями (Chebotar et al., 2015; Szymańska et al., 2018). Поэтому эндофиты можно использовать в качестве биоудобрений, смягчающих стрессы из-за их прямого взаимодействия с растением-хозяином, что приводит к меньшей конкуренции с другими микробами (Glick, 2014; Vaishnav et al., 2019; Naveed et al., 2022).

В литературе имеется немало данных о повышении под влиянием PGP-бактерий устойчивости различных культур к широкому спектру стрессовых воздействий (Максимов и др., 2011; 2020; Sood et al., 2020; Yarullina et al., 2020; 2023; Lyu et al., 2021; Sorokan et al., 2021; Rashid et al., 2022; Kuramshina et al., 2023; Anand et al., 2023; Chebotar et al., 2024; Oyedoh et al., 2025). Результатам изучения разнообразных механизмов микроб-индуцированной устойчивости (MIST, Microbe Induced Systemic Tolerance) растений посвящены многочисленные экспериментальные работы, целый ряд обзорных статей. Их анализ показывает, что PGP-бактерии колонизируя внешние (ризобактерии) 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., 2011; Chebotar et al., 2016; Miljakovic et al., 2020; Deniz et al., 2025), улучшать поглощение растениями воды и минеральное питание (Khan et al., 2009; Palaniappan et al., 2010; Sessitsch et al., 2012; Бровко и др., 2014; Чеботарь и др., 2016; Danish et al., 2019; Hussain et al., 2020), фотосинтез и водный обмен (Naqqash et al., 2020), синтезировать широкий спектр различных биоактивных компонентов и защитных соединений с антибиотическими, фитогормон-подобными, осморегуляторными, антиоксидантными свойствами (Dobbelaere et al., 1999; Cassan et al., 2001; Arkhipova et al., 2005; 2007; Dodd et al., 2010; Malfanova et al., 2011; 2012; Saha et al., 2016; Çakmakçı et al., 2017; Kudoyarova et al., 2019; Ilyas et al., 2020; Cherepanova et al., 2021; Rashid et al., 2021; Martynenko et al., 2022; Akhtyamova et al., 2024; Chebotar et al., 2024); все это приводит к индукции каскада защитных реакций растений и формированию системной стресс-устойчивости (Van Loon, 2007; Pieterse et al., 2014; Bukhat et al., 2020; Rashid et al., 2021; Blake et al., 2021; Lyu et al., 2021; Anand et al., 2023; Veselova et al., 2024). Вышеупомянутые эффекты регулируются сложным набором специфичных, множественных и взаимосвязанных механизмов, многие из которых остаются неясными и нуждаются в раскрытии (Niu et al., 2011; Berg et al., 2013; Rolli et al., 2014; Pandey et al., 2017; Anand et al., 2023). Вместе с тем эффективность действия PGP-бактерий варьируется в зависимости от множества факторов (включая спектр синтезируемых ими соединений, виды растений, их эколого-географическое происхождение, генетические и сортовые особенности, виды стрессов и др.) (Mađruy et al., 2013; Volis et al., 2015; Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Пусенкова и др., 2020; Маркова и др., 2023; Kolesnikov et al., 2023), чем ограничивается их внедрение в практику. Предполагается, что при долгосрочных стрессовых воздействиях более эффективными могут являться эндофитные спорообразующие PGP-бактерии *Bacillus subtilis* способные колонизировать внутренние ткани растений и положительно влиять на общий метаболизм изнутри (Chebotar et al., 2015; 2024), к тому же они общепризнаны как безопасные (GRAS, Generally Recognized as Safe) для применения в 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 PGP-бактерий, включая эндофитные *B. subtilis*, как воспроизводимого подхода необходимо развить 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 стрессам, включая растения пшеницы лесостепного западносибирского и степного волжского 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 разные сорта культурных растений, в т.ч. при абиотических стрессах (Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Маркова и др., 2023), сведения по сходству и различиям действия эндофитных *B. subtilis* на растения пшеницы с различными стратегиями адаптации к засухе отсутствовали к моменту начала нашей работы, а 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. фотохимическая активность, параметры флуоресценции хлорофилла, состояние устьиц) а также 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 придание им стресс-толерантных свойств в неблагоприятных условиях произрастания.

Неизученным является участие ГАМК как возможной сигнальной молекулы в индуцированной эндофитными PGP-бактериями адаптации и устойчивости растений. Мало что известно о влиянии эндофитных *B. subtilis* на качество (биохимический состав) получаемой продукции питания, что также требует пристального внимания.

За последнее десятилетие подход к секвенированию генома начал широко применяться для изучения молекулярных механизмов устойчивости бактерий к стрессам, однако в отношении раскрытия фундаментальных основ, лежащих в основе эффективного взаимодействия растений и PGP-бактерий при стрессах все еще находится на начальной стадии (Rodríguez et al., 2022; Afordoanyi et al., 2023; Narayanasamy et al., 2023), и многие вопросы остаются открытыми и требуют дальнейших исследований. Полный анализ последовательности геномов PGP-бактерий и их функциональная аннотация могут внести важный вклад в понимание механизмов стимулирования роста и стресс-устойчивости растений, а также оценки возможности прогнозирования эффективности новых изолятов для таргетного использования на растениях в экстремальных условиях произрастания. Четкое понимание механизмов, используемых эндофитными PGP-бактериями, чрезвычайно важно для полного использования их потенциала в качестве биоинокулянтов, обеспечивающих устойчивую продуктивность растениеводства и защиту агрокультур от доминирующих стрессовых факторов среды, в большинстве случаев, вызывающих обезвоживание, что особенно актуально в условиях меняющегося климата. Таким образом, запланированные в настоящей работе исследования лежат в русле современных мировых тенденций, в ней впервые изучено влияние эндофитных *B. subtilis* на ранее не исследованные физиолого-биохимические и молекулярные механизмы адаптации и устойчивости растений, в т.ч. различающихся по стратегии адаптации к обезвоживанию пшеницы, а также оценено проявление заложенных в геноме бактерий функционально-полезных свойств на уровне фенотипа разных растений-хозяев в норме и в 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.

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 предадаптирующего 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 F_v/F_m , $Y(II)$), 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 бацилизина, бациллаена, субтилозина А, бациллибактина, сурфактина, фенгицина, пилипастатина, уникальный терпеновый кластер, сакти- и рантипептиды, протеазы, глюканы); с устойчивостью к абиотическим стрессам, включая гены синтеза осмопротекторов

(пролин, глицин бетаин), ГАМК, полиамина спермидина, детоксикации АФК (СОД, глутатион); с регуляцией общих стресс-реакций, передачи сигналов клетками и устойчивостью к агрессивным условиям среды.

Научная новизна:

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 экотипов 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 бацилизина, бациллаена, субтилозина А, бациллибактина, сурфактина, фенгицина, пилипастатина, уникальный терпеновый кластер, сакти- и рантипептиды, протеазы, глюканыазы); 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 работы:

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: JAVHKX000000000, геномный проект ID: PRJNA1008864).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Проблема устойчивости растений к абиотическим стрессам

В связи с прикреплённостью к месту обитания растительные организмы в естественной среде обитания часто подвержены различным абиотическим стрессам (засоление, засуха, экстремальные температуры, тяжелые металлы, пестициды и др.) (Kosova et al., 2015; Benedetto et al., 2017; Ojuederie et al., 2019; FAO 2016; 2021; Asseng et al., 2019), которые приводят к сходным повреждающим морфофизиологическим, биохимическим и молекулярным изменениям значительно ограничивая рост и общую урожайность сельскохозяйственных растений (Abd El-Daim et al., 2019; Farooqi et al., 2020; Zandalinas et al., 2021; 2022; dos Santos et al., 2022; Zhang et al., 2022; 2023; Kiang et al., 2025). В большинстве случаев абиотические стрессы вызывают дефицит воды и изменяют диффузию питательных веществ, снижают содержание хлорофилла и приводят к избыточной генерации активных форм кислорода (АФК), тем самым повреждая нуклеиновые кислоты, белки и липиды (Kaur, Asthir, 2017; Ahmad et al., 2018; Farooqi et al., 2020). Кроме того, некоторые абиотические стрессы вызывают и дополнительные повреждающие эффекты, в частности, засоление снижает рост и продуктивность растений за счет специфической ионной токсичности и осмотических эффектов (Mansour, 2000; dos Santos et al., 2022; Zhang et al., 2022), тяжелые металлы оказывают аналогичное воздействие на растения: они попадают в почву, воду и атмосферу в результате различной антропогенной деятельности (индустриализация, горнодобывающая и сельскохозяйственная деятельность, в т.ч. использование фунгицидов, пестицидов и удобрений) (Varshney et al., 2012; Radchenko et al., 2021; Todorova et al., 2022; Sharma et al., 2022). Экстремальные температуры (высоко- и низкотемпературный стресс) значительно снижают функционирование ферментов, деление клеток, приводят к чрезмерной денатурации мембранных белков, вызывая гибель клеток при длительных воздействиях (Allen, Ort, 2001; Anjum et al., 2011; Zandalinas et al., 2018; Guo et al., 2018).

Среди абиотических стрессов, засуха является одним из основных лимитирующих факторов роста и продуктивности сельскохозяйственных культур во

всем мире (Ahmad et al., 2018; Asseng et al., 2019; Farooqi et al., 2020). За последние десятилетия деятельность человека и чрезмерное использование природных ресурсов негативно повлияли на экосистемы и биоразнообразие Земли, вызвав глобальное потепление, изменение климата и антропогенное загрязнение (Pascual et al., 2022). Во многих регионах мира, включая Россию, отмечается устойчивая тенденция к увеличению частоты возникновения и продолжительности засух (Asseng et al., 2019). Важные для сельского и лесного хозяйства климатические изменения отслеживаются Центрами мониторинга засухи, расположенными в разных точках мира (в т.ч. Центр мониторинга засухи Межгосударственного совета по гидрометеорологии стран СНГ (Россия)). Согласно отчетам Организации Объединенных Наций (<https://www.fao.org/home/en>) и Национального Управления по Аэронавтике и Исследованию Космического Пространства (<https://earthobservatory.nasa.gov/world-of-change/globaltemperatures>) с конца 20 века средняя температура повысилась на 0.8 °C. Как следствие, увеличение числа климатических аномалий (т.е. периодов сильной засухи или дождей) приводит к значительным убыткам (на 50–80%) важнейших продовольственных культур, включая пшеницу (Asseng et al., 2019; Pequeno et al., 2021). Различные климатические модели предсказывают, что такие негативные изменения окружающей среды будут усиливаться и во многих регионах приведут к гораздо более выраженным потерям урожая (Lesk et al., 2016; Zandalinas et al., 2021; 2022). На уровне физиологии растений дефицит воды угнетает рост и формирование урожая из-за низкого водного потенциала и тургора тканей (Kaur, Asthir, 2017; Farooqi et al., 2020). В условиях ограничения воды рост и продуктивность культур на ранних стадиях развития снижаются из-за низкого энергообеспечения, поглощения воды и затруднения функций ферментов (Anjum et al., 2011; Kaur, Asthir, 2017). Последующий стресс снижает всхожесть семян, площадь листьев, разрастание листьев, деление и удлинение клеток, что снижает фотосинтетическую активность, и, как следствие, приводит к ингибированию роста и формирования урожая (Zadrazil et al., 2017). Различают почвенную, атмосферную, сухую и комбинированную засухи, каждая из которых вызывает специфические защитные реакции растений. Почвенная засуха характеризуется недостатком влаги, доступной растениям, в почве при относительно

низких температурах воздуха. Атмосферная засуха вызвана низкой относительной влажностью и высокой дневной температурой и может возникать при достаточном увлажнении почвы (Зимин и др., 2022). Недостаток влаги в фазу прорастания и формирования листьев уменьшает ассимилирующую поверхность нижнего и среднего ярусов, что приводит к уменьшению количества колосьев и зерен. Засуха в период формирования колоса уменьшает ассимиляционную поверхность средних и верхних листьев и уменьшению количества зерен в колосе. Воздействие засухи во время налива зерна ухудшает ее качество (Зимин и др., 2022).

Любые абиотические стрессы оказывают на растения двойной эффект: повреждающий и раздражающий (Zhu, 2016; Zandalinas et al., 2018; 2021; 2022). Повреждающее действие проявляется в нарушении целостности мембранных структур клеток, изменении их свойств, а также в разобщении процессов дыхания и фосфорилирования. В то же время стрессор-раздражитель вызывает формирование комплекса защитных реакций, направленных на восстановление повреждений. Различают специфические и неспецифические универсальные или стандартные ответы организма на действие стресс-факторов, хотя не вызывает сомнения существование тесной связи специфических и неспецифических защитно-приспособительных реакций растений в этих условиях (Шакирова, 2001), которое особенно четко проявляется в выделении эколого-физиологических групп, например, по отношению к засухе и засолению, пойкилогидровым и гомеогидровым растениям, галофитам и гликофитам (Лапина, Строгонов, 1979; Генкель, 1982; Larcher, 2003) с генетически закрепленными механизмами устойчивости к этим стрессам. Первичная реакция растений на воздействие стрессора направлена на предотвращение повреждений клеток и, следовательно, является универсальной (Larcher, 2003b; Taiz, Zeiger, 2010). Она проявляется в мобилизации неспецифических защитных реакций, которые «стоят на страже жизни» и участвуют в формировании адаптивных механизмов растений, способствующих повышению их устойчивости к изменяющимся условиям окружающей среды.

Согласно концепции общего адаптационного синдрома, предложенной Гансом Селье (Selye, 1950) первичная реакция организма в ответ на сильное стрессовое

воздействие носит неспецифический характер и направлена на мобилизацию защитных механизмов. Общий адаптационный синдром включает три последовательные стадии: 1) реакция тревоги – первоначальная реакция с процессами катаболизма, активирующая защитные механизмы, 2) стадия адаптации – активация синтетических процессов, повышающая сопротивляемость, 3) стадия истощения (наступает при продолжающемся повреждающем действии стрессора) – истощение компенсаторных механизмов, потеря адаптации (Selye, 1950; 1956; 1976). Однако при менее сильных и кратковременных воздействиях картина может быть иной – физиологические стрессоры могут индуцировать усиление восстановительных процессов, повышая общую неспецифическую устойчивость растений (Mitter, 2006; Levitt, 2015; Zhu, 2016). Хотя четкое разделение на фазы стрессовых реакций более характерно для животных, растения также проходят сходные реакции в ответ на неблагоприятные воздействия, с некоторыми особенностями (Smékalová et al., 2014).

Первые неспецифические реакции растений на стрессоры, соответствующие фазе тревоги (катаболической фазе) (или фаза торможения, реакция защитного торможения метаболизма, первичная стрессовая реакция, фаза физиологической депрессии), включают: снижение активности синтетических процессов, деградацию белоксинтезирующего аппарата, катаболизм биополимеров, синтез стрессовых белков, повышение активности гидролитических ферментов, образование соединений для срочной защиты клеток (Шакирова, 2001). Эти первичные нарушения вызваны прямым действием стрессора на клетку: изменение свойств и состояния цитоплазмы, pH, структуры мембран, активности ядерной ДНК, биоэнергетики (Lamers et al., 2020; Kang et al., 2022; dos Santos et al., 2022). Вторичные нарушения – индукция синтеза стрессовых белков и подавление общего белкового синтеза, повышение абсцизовой кислоты (АБК) (гормона стресса) (Tombesi et al., 2015; Rehman et al., 2021; Singh, Roychoudhury, 2023), этилена (гормона тревоги) (Chen et al., 2021), салицилата, жасмоната (Kim et al., 2021; Liu et al., 2022) и снижение ауксинов, цитокининов (ЦК), гиббереллинов (ГБ), торможение роста, что отражается в изменении интегральных показателей организма (поглощение и утилизация элементов минерального питания, прирост биомассы и т.д.) (Zia et al., 2021; Zandalinas et al., 2022). К тому же

устойчивость растений к стрессам зависит от фазы онтогенеза (Rankenberg et al., 2021) – наиболее устойчивы в покоем состоянии, наиболее уязвимы в периоды прорастания и формирования семян. Изменения, происходящие в процессе развития растений и органов, сильно влияют на то, как растение взаимодействует с окружающей средой. Возрастная устойчивость к вредителям и патогенам (также называемая “ontogeny resistance”) хорошо изучена и обычно увеличивается с возрастом, как на уровне всего растения, так и на уровне органов (Rankenberg et al., 2021). Однако возрастные изменения абиотической стресс-устойчивости изучены не так хорошо, хотя и не менее распространены. Сообщалось, что возрастная устойчивость к абиотическим стрессам наиболее заметна в листьях, но также наблюдается и в корнях, обладающих значительной архитектурной гибкостью, что проявляется в стимулированном росте первичных и боковых корней или в появлении новых боковых зачатков. Кроме того, у зрелых корней могут образовываться отложения непроницаемых клеточных стенок или анатомические особенности, такие как аэренхима, которые могут иметь решающее значение для адаптации к переувлажненным или вододефицитным почвам (Pedersen et al., 2021).

В целом, способность растений сопротивляться экстремальным условиям произрастания, приспосабливаться к ним и в то же время сохранять при этом свой жизненный потенциал является одним из определяющих условий их существования, основанная на возможности реализовать защитно-приспособительные механизмы, т.е. адаптироваться к различным стрессорам. В ходе эволюции растения выработали различные механизмы, позволяющие им избегать стрессовых ситуаций или защищаться от них, а также способствовать росту и развитию (Zia et al., 2021). Основной стратегией адаптации к засухе является поддержание водного баланса за счет более экономного использования воды и улучшения водопоглощения корней. Такая стратегия реализуется с помощью целого ряда физиологических и молекулярных механизмов, таких как (i) быстрое подавление роста молодых листьев или опадение частей листьев у растений, которые завершили рост; (ii) уменьшение площади поверхности испарения воды; (iii) закрытие устьиц; (iv) накопление совместимых осмолитов, которые защищают макромолекулы и поддерживают

градиент водного потенциала между почвенным раствором и клетками корней в условиях прогрессирующего дефицита воды, что сохраняет способность корней поглощать почвенную влагу во время засухи (Blum, 1996; Zia et al., 2021; Зимин и др., 2022). Стресс-индуцированное снижение содержания воды в растениях обычно сопровождается рядом таких адаптационных процессов как выработка осмолитов, включая пролин, сахара, полиамины и внеклеточные полисахариды. Очевидно, что засуха ограничивает водный потенциал растения и вызывает закрытие устьиц для сохранения воды в листьях, что влияет на приток питательных веществ и их доступность корням (Anjum et al., 2011; Vurukonda et al., 2016). Закрытие устьиц влияет на газообмен листьев, что ограничивает рост тканей, снижает накопление биомассы растений (сырой и сухой), скорость транспирации и, как следствие, замедляет фотосинтетическую деятельность (Farooq, 2009; Kaur, Asthir, 2017). Кроме того, дефицит воды уменьшает количество белков, участвующих в фотосинтезе, таких как активизатор рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (Рубиско) и белок, связывающий большие субъединицы Рубиско. Это снижает каталитическую активность и сборку Рубиско в хлоропластах, что косвенно приводит к деградации Рубиско и уменьшению фиксации CO_2 (Zadrazil et al., 2017; Aranjuelo et al., 2011). Фотосинтетические пигменты, хлорофилл (Хл) а и Хл b уменьшаются в условиях стресса, что снижает уровни общего хлорофилла (Fotovat et al., 2007). Воздействие дефицита воды нарушает основные компоненты фотосинтетического аппарата, включая фотосинтетические пигмент-белковые комплексы, структуру хлоропластов и тилакоидов, дыхание, транспорт ионов, метаболизм углеводов и питательных веществ, а также активность Рубиско, что снижает способность карбоксилирования, регулируемую устьицами (Carmo-Silva et al., 2012). Это может увеличить накопление углеводов и инициировать выработку токсичных для растительных органелл АФК, что приводит к окислительному стрессу в мембранах, денатурации белков и ингибированию активности ферментов, нарушая поглощение воды (Allen, Ort, 2001). Например, проростки кукурузы, выращенные в условиях засухи, снизили чистый фотосинтез, скорость транспирации, устьичную проводимость и эффективность использования воды примерно на 33%, 38%, 26% и 51%, соответственно (Anjum et al.,

2011b). Однако чувствительность растений к обезвоживанию зависит от вида растений и стадии развития, а также от продолжительности и степени стресса. У бобовых засуха снижает скорость транспирации, что приводит к снижению скорости транслокации ксилемы и ферментативной активности, а также к ограничению скорости симбиотической азотфиксации (Vadez et al., 2000). В условиях засухи корни посылают сигналы стресса побегам изменяя содержание АБК, ЦК и других веществ, участвующих в сигнальном пути «корень-побег», что приводит к индукции физиологических изменений для адаптации к стрессору или противостояния ему. Из-за нарушения клеточной мембраны или тургора клеток, подвергшиеся стрессу растения накапливают АБК для регуляции закрытия устьиц (Rehman et al., 2021; Singh, Roychoudhury, 2023), тем самым помогая растениям адаптироваться к стрессовой ситуации (Farooqi et al., 2020). Например, *Vitis vinifera* модулировал закрытие устьиц, а затем накапливал АБК, чтобы поддерживать устьица закрытыми в ответ на нехватку воды (Tombesi et al., 2015). Дефицит воды активирует АБК-зависимый сигнальный путь и усиливает выработку АБК, что стимулирует экспрессию гена 9-цис-эпоксикароотиноиддиоксигеназы (NCED). Засухотолерантность опосредуется транскрипционным фактором DREB1A, взаимодействующим с элементом, чувствительным к дегидратации (DRE) (Kasuga et al., 1999).

В то время как реакция растений на отдельные стрессы была тщательно изучена для различных видов растений, в последнее время все большее внимание исследователей направляется на понимание реакций растений на многофакторные и комбинированные стрессовые воздействия (недавний обзор Pascual с соавт. (2022)). Эти исследования, безусловно, представляют особую важность, поскольку в естественных условиях растения обычно подвергаются сочетанию различных стрессовых факторов; хотя, следует отметить, что количество таких исследований все еще остается относительно малым. Недавно, Priya с соавт. (Priya et al., 2023) разработали интерактивную платформу с базой данных «Stress Combinations and Their Interactions in Plants» (<http://www.nipgr.ac.in/scipdb.php>), которая содержит всю информацию (постоянно обновляющуюся) о существующих исследованиях, касающихся различных сочетаний стрессов и растений. Следует отметить, что вопрос

о важности этой проблемы поднимался еще ранее академиком А.А. Жученко, который подчеркивал, что «пораженные вредными видами (болезнями, насекомыми, сорняками и др.) культурные растения и агроценозы оказываются менее устойчивыми к действию большинства абиотических стрессоров (морозам, засухам, ионной токсичности и пр.), а ослабленные под действием последних растения с большей частотой становятся «жертвами» вредной фауны и флоры» (Жученко 2001; 2010). Действительно, анализ накопленных данных убедительно свидетельствуют о более серьезных потерях урожая при воздействии сочетаний стрессов (Priya et al., 2023). К примеру, комбинированное воздействие засухи и гербицидов, вызывало более значительные (по сравнению с растениями, испытывавшими воздействие только одного из этих стрессоров) морфофизиологические и биохимические изменения у растений, включая подавление роста, снижение фотосинтетической активности, изменения в окислительном метаболизме, нестабильность мембран, снижение устьичной проводимости, повышение маркеров окислительного стресса, изменение роста корней, уменьшение площади листьев и нарушение водного баланса, что, в конечном итоге, привело к снижению роста, урожайности и качества зерна (Benevenuto et al., 2021; Vikrant et al., 2021; Radchenko et al., 2021; Todorova et al., 2021; 2022; Chetverikov et al., 2022). Кроме того, было задокументировано снижение эффективности гербицидов против сорняков в условиях засухи (Skelton et al., 2016; Miller, Norsworthy, 2018; Wu et al., 2019; Benedetti et al., 2020). Засуха вызывает многочисленные изменения в молекулярном, биохимическом и физиологическом состоянии сорных растений с различными последствиями, включая снижение поглощения и распространения гербицида, а также предотвращение попадания активного ингредиента в целевую зону, что способствует их выживанию (Skelton et al., 2016; Miller, Norsworthy, 2018; Wu et al., 2019; Benedetti et al., 2020).

Имеются данные о том, что обработка только гербицидами может и не вызывать значительных изменений в фенотипе и росте пшеницы, но при этом умеренно повышает содержание фенолов, тиолсодержащих соединений, активность каталазы (КАТ), пероксида водорода (H_2O_2), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионредуктазы (GR), не влияя на уровень малонового диальдегида (МДА)

(конечного продукта ПОЛ, маркера окислительного стресса), пролина и пероксидазы. В ответ на совместное воздействие стрессов в растениях активируются гены, связанные с защитными механизмами, включая антиоксидантные (*APX*), детоксикации гербицидов (*CYP450*), адаптации к стрессу (*HSP*, *TPP*, *TPS*) и конъюгации гербицидов (*UGT*), что демонстрирует комплексный адаптивный ответ растений по отношению к глифосату, обнаруженный в растениях-потомках (G2) (Benedetti et al., 2020). Изучение комплексных стрессовых ответов позволит получить более полное представление о механизмах стресс-адаптации растений.

Таким образом, растения развивают комплексные ответные реакции, направленные на борьбу со стрессами и формирование адекватной защиты, что позволяет им противостоять экстремальным условиям, приспосабливаться к ним, сохраняя при этом жизненный потенциал. Хотя растения оснащены различными стратегиями адаптации и защиты от внешних угроз, этих ресурсов недостаточно ввиду того, что реализация защитных механизмов сопровождается торможением роста и существенным снижением продуктивности растений (Pascual et al., 2022). Проблема повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам и их комбинациям является одной из ключевых задач современного растениеводства. В последние годы большое внимание уделяется использованию различных биологически активных веществ природного происхождения и разработке биопрепаратов (в т.ч. на основе микроорганизмов), способных активировать естественные защитные механизмы растений (Щербаков и др., 2013; Chebotar et al., 2015; Zia et al., 2021; Liu et al., 2024). При этом важно применять не любые регуляторы, а обладающие широким спектром защитного действия.

1.2. Роль RGP-бактерий в повышении устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам среды

Растения на протяжении всей своей жизни живут в тесной связи с разнообразной микробиотой, свободно обитающей в почве и/или колонизирующих ризосферу, филлосферу (эпифиты) или внутренние ткани (эндофиты) растения-хозяина (Hardoim et al., 2015; Compant et al., 2019; Васильева и др., 2019; Glick, 2020; Glick, Gamalero, 2021;

Compant et al., 2021; Chukwudi et al., 2025). Согласно современной холобионтной концепции растения рассматриваются как единая система с микроорганизмами (холобионт), функционирующие и эволюционирующие совместно (Compant et al., 2019; Галиева и др., 2023; Mukherjee et al., 2025). Поддержание баланса этой сложной системы или «суперорганизма» (названной «экосистемой на поводке» (Foster et al., 2017)) критически важно для достижения общей стабильности и реализации взаимовыгодных отношений. Почвы содержат большое количество микроорганизмов ($\sim 10^8 - 10^9$ клеток на грамм почвы), и в зависимости от их влияния на растения, их можно классифицировать как полезные, вредные (патогенные) и нейтральные. В условиях стресса растения направленно отбирают микроорганизмы, синтезирующие фитогормоны, осмолиты и антиоксиданты. Эти бактерии не только стимулируют рост корневой системы, улучшая поглощение воды, но и «кооперируются» друг с другом, чтобы усилить стрессоустойчивость холобионта. Такой симбиоз превращается в стратегию выживания, где микробный компонент холобионта выступает ключевым звеном в его адаптации к экстремальным условиям (Галиева и др., 2023). Организмы, обитающие в большом количестве в зоне влияния на функционирование растений составляют их фитобиом (Leach et al., 2017). Управление фитобиомом растений, основанное на понимании сложных эволюционных и экологических механизмов его функционирования и взаимодействия с растениями является перспективным способом повышения устойчивости и урожайности в сельском хозяйстве. В настоящее время применение полезных бактерий, стимулирующих рост растений (PGP-бактерии), способных активировать естественные защитные механизмы растений-хозяев, не вызывая негативного воздействия на них, окружающую среду и здоровье человека, рассматривают как доступную, низкозатратную, быстродействующую и экологически благоприятную стратегию повышения адаптивного потенциала, стресс-устойчивости и урожайности растений в изменяющихся условиях среды (Максимов и др., 2011; 2018; Чеботарь и др., 2016; Chebotar et al., 2015; 2021; Glick, 2020; Velloso et al., 2021; Olmo et al., 2022; Oyedoh et al., 2025). В литературе имеется немало данных о повышении PGP-бактериями устойчивости растений (Zhao et al., 2023; Diniz et al., 2025; Chukwudi et al., 2025), хотя механизмы их защитного действия еще недостаточно изучены.

PGP-бактерии – большая и разнообразная группа полезных непатогенных микроорганизмов, свободно живущих в почве либо населяющих поверхность (ризосферу и филосферу) или внутреннюю часть тканей (эндофиты) растений-хозяев, способных индуцировать рост (Malfanova et al., 2013; Ma, 2017; Baez-Rogelio et al., 2017; Glick, 2020; Glick, Gamalero, 2021; Olmo et al., 2022; Gamalero et al., 2022) и активировать защитные механизмы растений-хозяев против различных биотических (фитопатогены, насекомые-вредители, нематоды, вирусы) (Tran et al., 2019; Maksimov et al., 2020; Sorokan et al., 2021; Cantoro et al., 2021; Veselova et al., 2024; Nuzhnaya et al., 2024) и абиотических (засуха, засоление, перепады температур, токсичные соединения, УФ-излучение и др.) (Numan et al., 2018; Курамшина и др., 2019; Compant et al., 2019; 2021; Kuramshina et al., 2023; Chebotar et al., 2024; Shaymullina et al., 2024; Chukwudi et al., 2025) стрессов без негативного воздействия на само растение, окружающую среду и здоровье человека; что продемонстрировано на примере многих видов растений в многочисленных исследованиях по всему миру (Diniz et al., 2025).

Исследование механизмов регуляции PGP-бактериями стресс-устойчивости растений является на сегодняшний день одной из самых актуальных проблем современной биологии растений. Накопились многочисленные данные, свидетельствующие о разнообразии физиологического действия PGP-бактерий как ризосферных так и эндофитных на различные растительные организмы (Bochow at al., 2001; Zhou at al., 2008; Cakmakci et al., 2007; Kidoglu et al., 2008; Egamberdieva et al., 2011; Malfanova et al., 2011; 2012; García-Gutiérrez et al., 2013; Verma et al., 2017; Shaymullina et al., 2024; Diniz et al., 2025), которое можно подразделить на выраженный ростстимулирующий и защитный по отношению к широкому спектру неблагоприятных воздействий эффекты (Khalid et al., 2004; Sayed et al., 2011; Beneduzi et al., 2012; Turan et al., 2014; Cherif et al., 2015; Пусенкова и др., 2016; Burhanova et al., 2017; Kitir et al., 2017; Veselova et al., 2024).

Механизмы, посредством которых PGP-бактерии влияют на растение-хозяина могут быть многообразными, специфичными и еще недостаточно изучены (Niu et al., 2011; Berg et al., 2013; Rolli et al., 2014; Pandey et al., 2017; Veselova et al., 2024). PGP-бактерии могут использовать прямые и не прямые (Dimkpa et al., 2009; Grover et al., 2011;

Vuruconda et al., 2016) пути стимуляции роста и индуцирования устойчивости растений к стрессам, в частности, такие как продукция антибактериальных и инсектицидных компонентов (Forchetti et al., 2007; 2010; Jha, Kumar, 2009; Malfanova et al., 2011; 2012; Максимов и др., 2020), биосурфактантов (De Vleeschauwer, Höfte, 2009; Ongena et al., 2010), фитогормонов (Dobbelaere et al., 1999; Cassan et al., 2001; Arkhipova et al., 2005; 2007; Ishak et al., 2016; Sorokan et al., 2021; Ayaz et al., 2022; Veselova et al., 2024; Chebotar et al., 2024) и ферментов (Hung et al., 2007), сидерофоров (Khan et al., 2009; Ghazanfar et al., 2024) и хелаторов (Palaniappan et al., 2010), снижение уровня этилена в растениях (Glick, 2014; Xia et al., 2024), фиксация азота (Kirchhorf et al., 1997; Kuklinski-Sorbal et al., 2004; Sessitsch et al., 2012; Бровко и др., 2014), повышение доступности макро-/микроэлементов (Balloi et al., 2010; Чеботарь и др., 2016), запуск механизмов системной устойчивости к биотическим (Van Loon, 2007; Pieterse et al., 2014; Максимов и др., 2020; Veselova et al., 2024) и абиотическим стрессам (Mayak et al., 2004a,b; Barassi et al., 2006a,b; Yang et al., 2009; Sahin et al., 2015; Chukwudi et al., 2025), где важную роль играют сигнальные пути, регулируемые ЖК и СК (Van Loon, 2007; Fravel, 2005; Chourdary, Johri, 2009; Sayed, 2011; Niu et al., 2011; Wenhao, 2012; García-Gutiérrez et al., 2013; Martinez-Medina et al., 2016; Yang et al., 2023; Veselova et al., 2024; Gogoi et al., 2025). В то же время накопился большой массив сведений, указывающих на участие СК в регуляции защитных реакций разных видов растений к таким абиотическим стрессам как дефицит влаги, засоление, гипо-/гипертермия, тяжелые металлы (Шакирова, 2001; Horvath et al., 2007; Shakirova et al., 2007; 2016; Miura, Tada, 2014; Verma et al., 2016; Li et al., 2022; Khan et al., 2022).

Среди RGP-бактерий наиболее привлекательными компонентами для коммерческого использования в качестве биоинокулянтов являются эндофиты, поскольку они тесно взаимодействуют с растением-хозяином и могут обеспечивать долгосрочные фенотипические преимущества (Щербаков и др., 2013; Чеботарь и др., 2015; Chebotar et al., 2015; Alferov et al., 2017; Shahzad et al., 2018; Васильева и др., 2019; Галиева и др., 2023). Колонизируя внутренние ткани растений эндофиты отличаются повышенной стабильностью (в отличие от других ассоциированных с растениями микроорганизмов), так как они защищены от резких колебаний влажности, УФ-

излучения и дефицита питательных веществ, что делает их ключевыми «игроками» в долгосрочной адаптации и защите растения-хозяина при возникновении неблагоприятных факторов внешней среды (засухи, засоления и т.д.) (Compant et al., 2019; 2021). Кроме того, эндофиты играют жизненно важную роль в биоремедиации органических/неорганических загрязнителей, одновременно способствуя росту растений (Garipova, 2012; Chebotar et al., 2015; Iqbal et al., 2018; Hussain et al., 2019). Не смотря на то, что в литературе накопился массив данных о повышении под влиянием PGP-бактерий устойчивости растений к абиотическим стрессам (включая засуху) (Glick, Gamalero, 2021; Glick, 2020; Курамшина и др., 2019; Chieb, Gachomo et al., 2023; Diniz et al., 2025) в том числе и с нашим участием (Lastochkina, 2019b; Lastochkina et al., 2019a; Ласточкина, 2021; Ласточкина, Аллагулова, 2023; Lastochkina, Bosacchi, 2023), ключевой парадокс остается нерешенным: с одной стороны, количество коммерческих штаммов и сельскохозяйственных земель, отведенных для использования микробных биопрепаратов ежегодно продолжают расти; с другой стороны, фундаментальные физиолого-биохимические и молекулярные механизмы их ростстимулирующего и защитного действия во многом остаются неясными. Это объясняет нестабильность действия существующих микробных биопрепаратов и не полную реализацию их потенциала из-за пробелов в понимании их мультифункционального взаимодействия с растениями.

1.2.1. Эндофитные PGP-бактерии: распространение, разнообразие, колонизация и физиологические функции в растениях

Полученные к настоящему времени знания показывают, что почти каждое растение, включая культивируемые и дикие, травянистые, древесные и сфагновые мхи, содержат эндофиты (Deng et al., 2011; Pedrosa et al., 2011; Romero et al., 2014; Shi et al., 2014; Hardoim et al., 2015; Васильева и др., 2019; Žiarovská et al., 2020), которые могут обнаруживаться в тканях внешне здоровых растений-хозяев (Hallmann et al., 1997; Schulz, Boyle, 2006). На основании жизненных стратегий эндофитные бактерии классифицируются на факультативные, облигатные, условно-патогенные и случайные или эндофиты-пассажиры (рис. 1.1).

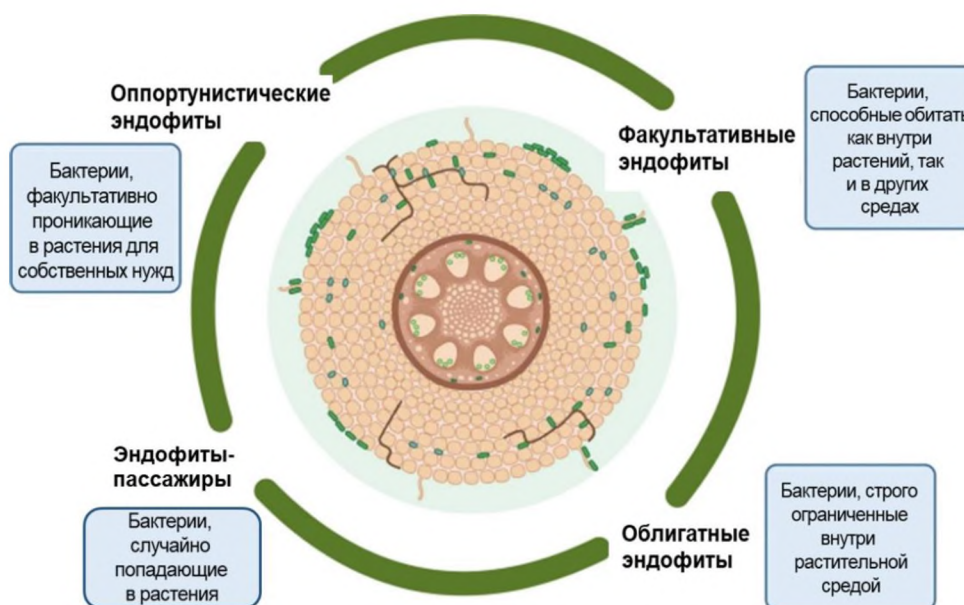


Рис. 1.1. Классификация эндофитных бактерий по образу их жизни. Опportunистические эндофиты – эпизодически (время от времени) проникают в растения для реализации собственных потребностей; Эндофиты-пассажиры – случайно попадают в растительные ткани, не взаимодействуя с хозяином; Облигатные эндофиты – строго ограничены внутрирастительной средой обитания; Факультативные эндофиты – способны обитать внутри растений и в других экологических нишах. Адаптировано из Anand et al. (2023)

Интерес к исследованию эндофитных микроорганизмов значительно возрос в последние годы, о чем свидетельствует увеличение числа публикаций на эту тему. Так, запрос в PubMed (от 13 мая 2025 г.) показал, что за последние 25 лет количество публикаций, содержащих слово "эндофит" в названии или резюме, составило 15 887, из которых более половины работ опубликованы за последние годы (рис. 1.2).

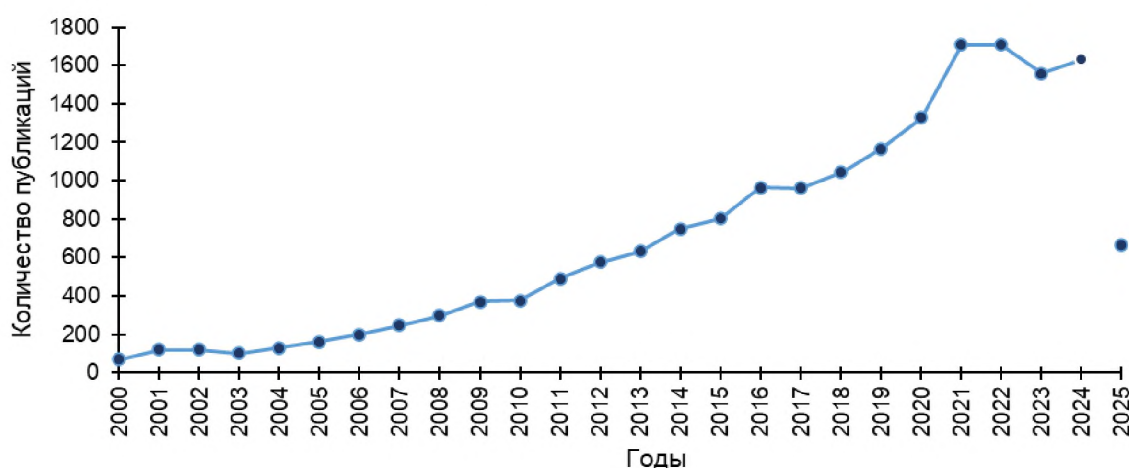


Рис. 1.2. Рост публикаций по эндофитам в период с 2000 по 2025 гг. Публикации, связанные с эндофитами, были взяты из PubMed с использованием ключевых слов «endophyte» или «endophytic». Общее число публикаций на момент поиска составляло 16 476 (с 1946 года), из них: 15 887 – за последние 25 лет; 8 104 – за последние 5 лет (данные от 13 мая 2025 г.)

Растущий интерес к эндофитам в последние годы обусловлен их биотехнологическим потенциалом и ролью в повышении устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам. Систематизация научных трендов в этой области была проведена Anand с соавт. (2023), которые осуществили кластерный анализ ключевых слов из статей, индексированных в Scopus. Результаты мета-анализа выявили пять ключевых исследовательских направлений: 1) стресс-адаптация растений (241 элемент) – крупнейший кластер, объединяющий исследования влияния эндофитов на устойчивость к засухе, засолению и фитопатогенам, что подчеркивает их значение в контексте климатических изменений; 2) биоактивные метаболиты (224 элемента) – акцентирует внимание на способности эндофитов синтезировать антибактериальные соединения и вторичные метаболиты, открывающие перспективы для агробиотехнологии; 3) механизмы колонизации (192 элемента) – исследует симбиотические взаимодействия, включая молекулярные аспекты колонизации растений и методы культивирования эндофитных штаммов; 4) биоремедиация (175 элементов) – охватывает роль эндофитов в детоксикации тяжелых металлов и разложении органических загрязнителей, что актуально для экологического восстановления; 5) геномика и генетика (168 элементов) – фокусируется на исследованиях геномного разнообразия эндофитов и генетических механизмов, лежащих в основе их функциональных свойств. Данная кластеризация отражает многодисциплинарный характер исследований эндофитов, объединяющий фундаментальные аспекты (биохимия, генетика) с прикладными задачами (устойчивое земледелие, биоремедиация). Работа Anand с соавт. (2023) визуализирует смещение научного фокуса от описания симбиотических отношений к практическому использованию эндофитов в решении глобальных экологических и агрономических вызовов.

Формирование современной концепции эндофитов началось с пионерских работ середины XX века, когда впервые были получены достоверные доказательства колонизации бактериями внутренних тканей растений, включая работы российских ученых, о чем подробно описано в историографии возникновения эндофитологии как науки (Хайруллин, 2023). Метод поверхностной стерилизации, разработанный Samish и соавт. (1961) и усовершенствованный Mundt и Hinkle (1976), стал краеугольным камнем

для выделения «истинных» эндофитов, исключаящим контаминацию ризосферными микроорганизмами. С момента появления первых достоверных сообщений о выделении эндофитных бактерий из поверхностно стерилизованных растений (Samish et al., 1961; Mundt, Hinkle, 1976) идентифицировано более 200 родов бактерий, принадлежащих к 16 типам, причем их распределение коррелирует с типом растения и стрессовыми факторами среды. Это подчеркивает важность региональных исследований для расшифровки агроэкологического потенциала эндофитов. К эндофитным бактериям относятся как культивируемые, так и некультивируемые представители Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, цианобактерий, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospira, планктомицетов, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Deinococcus-Thermus и других типов (Sun et al., 2006; Berg, Hallmann, 2006; Mengoni et al., 2009; Manter et al., 2010; Sessitsch et al., 2012; Rana et al., 2020). Наиболее преобладающие и изученные эндофиты принадлежат к трем основным типам Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes и для многих родов, включая *Bacillus spp.* (Rana et al., 2020) показана эффективность против фитопатогенов (грибов, бактерий) (Rabbee et al., 2019; González et al., 2019; Maksimov et al., 2020; Zhang et al., 2022a) и абиотических стресс-факторов (Garipova, 2014; Chatterjee et al., 2017; Kaushal, 2019). Находясь внутри растений эндофитные PGP-бактерии обычно не вызывают каких-либо существенных морфологических изменений у хозяина, как это делают симбионты корневых клубеньков. Они также не вызывают никаких симптомов заболевания, в отличие от фитопатогенов. Эндофиты ассоциируются с растениями-хозяевами на протяжении их жизненного цикла, от прорастания семян до развития плодов, и могут продолжать оказывать благотворное воздействие в послеуборочный период (Shahzad et al., 2018; Lastochkina et al., 2019). Большинство эндофитов колонизируют различные отделы апопласта растения, включая межклеточные пространства клеточных стенок и сосуды ксилемы различных частей растений (листья, корни и стебли). Некоторые из них способны колонизировать репродуктивные органы растений (цветы, плоды и семена) (Hallmann et al., 1997; Compant et al., 2011; 2019; 2021; Hardoim et al., 2015; Shahzad et al., 2018; Васильева и др., 2019). Кроме того, микробы, живущие в растительных тканях, могут вновь заселять эндосферу из окружающей среды с каждым новым поколением или

передаваться будущим поколениям от семян к семенам (Truyens et al., 2015; Frank et al., 2017; Diabankana et al., 2024).

За последнее десятилетие опубликовано много исследований о популяциях эндофитов (бактериальных и грибковых), живущих в разнообразных растениях, фруктах и овощах (Malfanova et al., 2011; 2013; Hardoim et al., 2015; Васильева и др., 2019; Žiarovská et al., 2020). Плотность популяций эндофитов невероятно изменчива у многих растений и значительно варьирует от 10^5 до 10^7 культивируемых клеток на 1 г корней до 10^3 – 10^4 в листьях и стеблях, в то время как в семенах, цветках и плодах было найдено около 10^2 – 10^3 клеток на 1 г ткани (Compant et al., 2011). Как правило, наибольшая плотность эндофитов обнаруживается в корнях растений (но не всегда) по сравнению с другими органами (Compant et al., 2021). Примечательно, хотя многие эндофитные бактерии демонстрируют «полезные» для растений свойства *in vitro*, лишь небольшое их число проявляет эти свойства *in planta* и в практическом сельском хозяйстве (Scherwinski et al., 2008; Berg, 2009). Только небольшое количество эндофитов демонстрируют результативность в роли стимуляторов роста растений или агентов биоконтроля. Биологическая активность эндофитов напрямую коррелирует с их способностью колонизировать внутренние ткани растений. Механизмы, лежащие в основе успешной колонизации эндофитами включают адгезию к поверхности корней и проникновение через точки входа (участки повреждений или устьица), а также преодоление защитных барьеров растений-хозяев. Понимание этих механизмов позволит создавать более эффективные эндофитные биопрепараты для сельского хозяйства.

Колонизация растений эндофитами представляет собой не внезапное явление, а серию сложных и организованных процессов, обусловленных хемотаксическими реакциями. Несмотря на схожесть механизмов развития внутриклеточных колоний у бактерий и грибов, по всей видимости, их стратегии и способы колонизации существенно различаются (Anand et al., 2023). Бактериальные эндофиты, как правило, заселяют межклеточные пространства сосудистой системы растения-хозяина, тогда как грибковые эндофиты колонизируют как межклеточные, так и внутриклеточные пространства всей корневой системы (Kandel et al., 2017; Liu et al. 2017; Yan et al., 2019; Kowal et al., 2020; Mengistu, 2020; Palmieri et al., 2020; Anand et al., 2023). Процесс

проникновения и колонизации эндофитов может включать различные механизмы: (i) взаимодействие рецептора эндофита с определенным растительным белком для распознавания и доступа к хозяину; (ii) взаимодействие с филлосферой с последующим проникновением в клеточную среду (Mitter et al., 2013; Kost et al., 2014; Chagas et al., 2018). На успешность колонизации влияют генотип растения-хозяина, тип растительной ткани, видовая принадлежность эндофитов, а также абиотические и биотические стрессы (Ma et al., 2016; 2016a). Экссудаты корней растений служат химическими сигналами для привлечения бактериальных эндофитов, использующих жгутики для перемещения к поверхности корня и взаимодействия с растением через пили и волокна (Mitter et al., 2013; Kost et al., 2014; Allard-Massicotte et al., 2016; Chagas et al., 2018). При этом они должны быстро адаптироваться к контрастным условиям эндосферы, включая окислительно-восстановительный статус, доступность кислорода, состав питательных веществ и осмотический баланс (Kost et al., 2014; Noman et al., 2021). Кроме того, эндофиты должны преодолевать механизмы антиоксидантной защиты растения-хозяина для успешной колонизации. Ключ к успешной инвазии и колонизации эндофитов заключается в своевременном распознавании сигнальных молекул, реакциях кворума, способности противостоять защитным механизмам хозяина и эффективной адаптации к совершенно иной клеточной системе растения (Mitter et al., 2013; Kusari et al., 2015).

Эндофиты последовательно колонизируют различные части растения-хозяина: ризоплану, кору, ксилему и репродуктивные органы. *Колонизация ризопланы (поверхности корня)* является важным начальным этапом. Бактериальные эндофиты сначала осваивают ризосферу, а затем прикрепляются к ризоплане. Ранние этапы этого процесса, такие как распознавание и хемотаксис, были подробно рассмотрены Lugtenberg с соавт. (2001) и Lugtenberg, Kamilova (2009). Для этого они используют различные компоненты своей поверхности, такие как пили IV типа, кодируемые *pilAB* (Dörr et al., 1998) (мутанты с нарушенной экспрессией *pilAB* не могут успешно колонизировать корни и побеги растений (Reinhold-Hurek et al., 2006)) или липосахариды (Balzanelli et al., 2010). Мутантный штамм с измененным моносахаридным составом в ядровом домене LPS показал стократную более низкую адгезию корней и эндофитное распространение по сравнению с диким типом. Экзополисахариды (ЭПС) также

необходимы для колонизации ризопланы и эндосферы, как показано на примере *Gluconacetobacter diazotrophicus* и растений риса (Meneses et al., 2011). Поскольку мутантные штаммы с нарушениями в этих поверхностных структурах демонстрируют сниженную адгезию, можно ожидать, что другие компоненты бактериальной поверхности также вовлечены в этот процесс.

Проникновение (инвазия). Предпочтительными местами прикрепления эндофитов с последующей инвазией являются апикальная зона корня с тонкостенными клетками (“зона активной инвазии”) или через небольшие трещины, образующиеся при появлении боковых корней (“зона пассивной инвазии”). В этих местах бактерии часто формируют микроколонии из нескольких сотен клеток (Zachow et al., 2010). Для активной инвазии эндофиты должны продуцировать целлюлолитические ферменты, такие как эндоглюканаза, которая гидролизует клеточные стенки растения. Экспрессия генов, кодирующих эти ферменты, была обнаружена у многих эндофитов (Compant et al., 2005; Reinhold-Hurek et al., 2006) и подтверждена мутационным анализом (Norman-Setterblad et al., 2000). Так, мутанту *AneglA* не удалось эффективно проникать в растительные клетки и системно колонизировать растение, в отличие от штамма дикого типа и мутанта, дополненного *eglA*. Проникая через естественные трещины в корнях, эндофиты могут оставаться “невидимыми” для иммунной системы растения. Этот пассивный способ инвазии часто используется в сочетании с активной инвазией, как показано для *Azoarcus* sp. BH72 (Reinhold-Hurek, Hurek, 1998), *Burkholderia vietnamiensis* (Govindarajan et al., 2007), *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (James et al., 2002), *B. phytofirmans* PsJN (Compant et al., 2005), *B. subtilis* Lu144 (Ji et al., 2008), *B. cepacia* Lu 10-1 (Ji et al., 2010), *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (James et al., 1994).

Колонизация кортекса растений. После проникновения через эпидермальный барьер эндофитные бактерии могут либо оставаться в месте инвазии (как показано для *Raenibacillus polymyxa* и арабидописа) (Timmusk et al., 2005), либо перемещаться глубже в межклеточное пространство кортекса (James et al., 1994; Roncato-Maccari et al., 2003; Compant et al., 2005; Gasser et al., 2011). Эндофитные бактерии редко проникают непосредственно в клетки растений и не вызывают образование специфических морфологических структур, в отличие от клубеньковых бактерий. Однако было показано,

что *Bacillus subtilis* GXJM08 может колонизировать корни бобового растения *Robinia pseudoacacia* L. аналогично ризобиям (Huang et al., 2011). Это включает деформацию корневых волосков, развитие нитей заражения между клетками кортекса и образование бактериоидов внутри корковых клеток. Остается открытым вопрос, может ли этот штамм фиксировать азот, как и симбиотические ризобии, и способны ли другие несимбиотические бактерии вызывать подобные морфологические изменения.

Колонизация ксилемы. Лишь немногие бактерии способны проникать через эндодермальный барьер и достигать сосудов ксилемы (James et al., 2002; Roncato-Maccari et al., 2003; Compant et al., 2005; Gasser et al., 2011). Это обычно происходит через незамерзшие эндодермальные клетки в апикальной зоне корня и/или в месте появления боковых корней, где нарушается непрерывность каспариевой полосы. В ксилеме происходит транспорт воды, ионов и низкомолекулярных органических соединений (сахара, органические кислоты, аминокислоты) на большие расстояния (Sattelmacher, 2001). Хотя концентрация этих питательных веществ относительно невысока (Madore, Webb, 1981), она достаточна для поддержания роста эндофитных бактерий (Sattelmacher, 2001; Bacon, Hinton, 2006). С использованием радиоактивных меток экспериментально доказано, что эндофиты потребляют органические вещества растений. Например, Rasche и соавт. (2009) после инкубации растений картофеля с $^{13}\text{CO}_2$ обнаружили изотопную метку сначала в фотосинтетических метаболитах растения, а затем в различных эндофитных бактериях. Было предпринято несколько попыток найти источники углерода, которые могли бы иметь важное значение для эндофитного образа жизни (Shishido et al., 1999; Krause et al., 2011; Malfanova et al., 2013). Shishido с соавт. (1999) сравнили профили окисления углерода эндофитного штамма *Paenibacillus polymyxa* Pw-2R и *Pseudomonas fluorescens* Sm3-PH с таковыми у ризосферных штаммов, которые не смогли эндофитно колонизировать ель. Оказалось, что штаммы Pw2r и Sm3-RN были способны метаболизировать сорбитол и D-галактуроновую кислоту, в то время как ризосферные штаммы не могли. Аналогично, Malfanova с соавт. (2013) обнаружили, что в отличие от большинства ризосферных *Pseudomonas* spp., эндофитные псевдомонады, выделенные из растений огурца, способны использовать L-арабинозу, один из наиболее распространенных доступных сахаров в ксилемной жидкости различных растений (Iwai

et al., 2003). В другом исследовании Krause с соавт. (2011) показали, что при колонизации корней риса штаммом *Azoarcus* sp. BN72 в бактериальных клетках индуцировалась экспрессия генов, кодирующих алкогольдегидрогеназы. Мутантные штаммы с нарушенными генами, кодирующими эти ферменты, колонизировали внутреннюю часть корня менее эффективно, чем дикий тип. Поскольку этанол в изобилии содержится в переувлажненном рисе, эти данные позволяют предположить, что он может являться одним из основных источников углерода для клеток бактерий внутри растения (Krause et al., 2011). В совокупности эти исследования показывают, что способность бактерий утилизировать определенные растительные метаболиты может быть необходимым условием для их успешного эндوفитного развития.

Колонизация репродуктивных органов. Вполне вероятно, что концентрация доступных питательных веществ в ксилеме уменьшается по мере удаления от корня (вдоль оси растения), что может объяснять снижение разнообразия и плотности популяции эндوفитных бактерий в верхних частях побегов, листьях и репродуктивных органах (Compant et al., 2010; Fűrnkranz et al., 2011). Тем не менее, присутствие эндوفитных бактерий в репродуктивных органах, таких как цветы, плоды, семена, было подтверждено методами культивирования (Samish, Etinger-Tulczynska, 1963; Mundt, Hinkle, 1976; Graner et al., 2003; Okunishi et al., 2005; Fűrnkranz et al., 2011) и микроскопической визуализации (Coombs, Franco, 2003; Compant et al., 2011). Предполагается, что скорее всего, бактериальные клетки попадают в репродуктивные органы через сосудистые ткани растения, как это происходит с фитопатогенами, заражающими развивающиеся семена через сосудистые ткани фуникулуса, халазы, рыльца и микропиле (Agarwal, Sinclair, 1996). Также возможно, что если одна из репродуктивных клеток (яйцеклетка или мужские гаметы) несет микроб, то полученный эмбрион и эндосперм могут быть колонизированы, что могло бы объяснить перенос эндوفитов с растений на семена. Однако инвазия эндوفитов в репродуктивные ткани (яйцеклетку, материнскую клетку с мегаспорами, тычинки и материнские клетки пыльцы) пока не была показана (Agarwal, Sinclair, 1996). Точный механизм передачи эндوفитных бактерий из сосудистых тканей в репродуктивные органы и впоследствии к новому поколению растений еще предстоит установить.

Другие способы колонизации растений. Хотя предполагается, что ризосфера является основным источником эндофитных колонизаторов, нельзя игнорировать и другие пути проникновения бактерий в растения. Некоторые бактерии способны проникать в растение через устьица, как было показано для *Gluconobacter diazotrophicus* на сахарном тростнике (James et al., 2001) и для *Streptomyces galbus* на рододендроне (Suzuki et al., 2005). В последнем случае *S. galbus* выработка неспецифических ферментов, разрушающих воск, скорее всего, способствовала колонизации поверхности листьев и последующему распространению эндофита внутри растения (Suzuki et al., 2005). Бактерии также могут проникать в растение через цветы, плоды и семена. Однако это в основном известно для фитопатогенов и не было подробно изучено для (непатогенных) бактериальных эндофитов.

Различные факторы окружающей среды, включая классические методы управления растениеводством (обработка почвы, орошение, использование химических удобрений и пестицидов) и воздействие стресс-факторов, оказывают значительное влияние на структуру сообщества эндофитных микробов, а также на взаимодействие между микробами-микробами и микробами-растениями (Glick, Gamalero, 2021; Glick, 2020). Результаты недавнего метагеномного анализа (Žiarovská et al., 2020) показали, что изменчивость бактериальных эндофитов предпочтительно связана с характеристиками ответной реакции сортов испытываемых растений на стресс, а не с самими стрессами. Долговременные исследования микробиомов растений подчеркнули важность вклада микробов в фенотип и физиологию растения-хозяина (Chatterjee et al., 2017; Del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2021). Являясь важной частью различных функций растений, эндофиты определяют реакцию растений на стресс и их продукционные характеристики. Применение эндофитов также документально подтверждено как способ повышения качества растениеводческой продукции, таких как фрукты, овощи и цветы, за счет улучшения таких характеристик качества продукции, как размер, твердость, цвет и срок годности (González et al., 2019; Vukelić et al., 2021; Mingot-Ureta et al., 2020; Acuña-Rodríguez et al., 2022).

Несмотря на значительный прогресс в изучении фенотипических и экологических аспектов взаимодействия эндофитов с растениями (Mitter et al., 2013; Chagas et al., 2018),

ключевые генетические факторы, обеспечивающие успешное проникновение и колонизацию, изучены недостаточно. Полногеномный анализ бактерий позволяет выявить не только гены, ответственные за подвижность (например, жгутиковые системы), адгезию (пили, мембранные белки), преодоление защитных барьеров (ферменты деградации клеточной стенки) и стресс-адаптацию (Compant et al., 2021). Интеграция таких данных раскрывает комплексные молекулярные механизмы, лежащие в основе эффективных растительно-микробных взаимодействий. Таким образом, углубление в генетическую «архитектуру» эндофитов является необходимым шагом для перехода от эмпирического описания к прогнозированию и управлению их взаимодействием с растениями.

1.2.2. *Bacillus* spp. – типичные представители эндофитных PGP-бактерий

Род *Bacillus* Cohn (семейство Bacillaceae) – разнообразная группа (гетерогенный таксон), представители которой повсеместно распространены в природе: они обнаружены в почве, воде, на поверхности (эпифиты) и во внутренних тканях растений (эндофиты) (Martinez, 2013; Hirooka, 2014; Siciua et al., 2015; Su et al., 2020; Cantoro et al., 2021). Род был впервые выделен и описан немецким ботаником и микробиологом Ф. Коном (F. Cohn) в 1872 году, а *B. subtilis* был определен в качестве типового вида, который имеет три подвида: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, subsp. *spizizenii* и subsp. *inaquosorum* (Rooney et al., 2009). Наряду с *B. subtilis* описаны другие родственные виды, такие как *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. axarquiensis*, *B. licheniformis*, *B. malacitensis*, *B. mojavensis*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis* и *B. velezensis* (Jeyaram et al., 2011). Эндофитные *Bacillus* spp. найдены во внутренних тканях разнообразных частей растений: семян, фруктов, стеблей, листьев, корней и клубней, цветков (Russo et al., 2012). Разнообразие эндофитных *Bacillus* spp. может зависеть от вида и сорта растений, а плотность заселения – от ткани, стадии развития растения, факторов окружающей среды, например, времени года (Shen, Fulthorpe, 2015; Kuklinsky-Sobral et al., 2004). Кроме того, эндофитная колонизация *Bacillus* spp. зависит от физиологических изменений в растениях и может быть ограничена или замедлена защитными механизмами (Rosenblueth, Martínez-Romero, 2006). К примеру, у

двудольных растений салициловая кислота (СК), этилен, жасмоновая кислота (ЖК) ограничивают колонизацию *Bacillus* spp. (Iniguez et al., 2005; Miché et al., 2006). Сообщалось, что *Bacillus* spp. могут «передаваться из поколения в поколение» через семена (Pleban et al., 1995; Adams, Kloepper, 2002; Diabankana et al., 2024), вегетативный посадочный материал (Dong et al., 1994), а также через почву на клубнях (Sturz, 1995; Hallmann et al., 1997; Mahaffee, Kloepper, 1997). Наряду с этим, *Bacillus* spp., в частности *B. subtilis* – общепризнаны как безопасные микроорганизмы для применения в пищевой промышленности (GRAS – Generally Recognized As Safe) (Harwood et al., 1992; Martinez, 2013; Su et al., 2020). Более того, они продуцируют эндоспоры, чрезвычайно толерантные к разным физическим и химическим воздействиям (нагревание, высушивание, органические растворители, УФ-облучение и др.) (Ulrich et al., 2018), благодаря чему сохраняют способность запускать защитные реакции у растений-хозяев даже в стрессовых условиях внешней среды. Все это делает *Bacillus* spp. привлекательными агентами для разработки на их основе коммерческих биоудобрений и средств защиты растений, число которых растет ежегодно во всем мире. Недавно проведенные мета-анализы (Zhao et al., 2023; Diniz et al., 2025) показывают, что в большинстве опубликованных работ внимание сосредоточено на бактериях *Bacillales*. Инокуляция различными таксонами PGP-бактерий в разной степени повышала засухоустойчивость растений, однако выраженный положительный эффект оказали бактерии из отрядов *Bacillales* и *Pseudomonadales* посредством стимуляции фотосинтеза, защиты от окислительного стресса и увеличения биомассы. Это объясняется их эффективной колонизацией корней и механизмами повышения выживаемости растений в неблагоприятных условиях, что приводит к их преобладанию в ризосферной нише (Khan et al., 2018).

Важным фактором для *Bacillales* является способность к спорообразованию, обеспечивающая запас питательных веществ в условиях стресса (Ulrich et al., 2018; Blake et al., 2021). Кроме того, *Bacillales* могут стимулировать экссудацию корней, образование биопленки и накопление осмолитов – ключевых механизмов защиты от стрессовых факторов, приводящих к обезвоживанию (Radhakrishnan et al., 2017). Азотфиксация PGP-бактерий также положительно влияла на морфологию и фотосинтез

растений в условиях стресса (засухи), но не в условиях оптимального полива (Zhao et al., 2023). Однако точные механизмы влияния PGP-бактерий на растения в стрессовых (засушливых) условиях остаются не совсем ясными и требуют дальнейшего изучения.

Многие виды *Bacillus* относятся к группе PGP-бактерий, поскольку способны стимулировать рост и повышать устойчивость различных видов растений к биотическим (фитопатогены (Максимов и др., 2011; Lastochkina et al., 2019, 2020; Maksimov et al., 2020; Miljakovic et al., 2020; Cantoro et al., 2021; Veselova et al., 2024), насекомые-вредители (Maksimov et al., 2020; Sorokan et al., 2021; Румянцев и др., 2024), нематоды (Ali et al., 2023; Alnasrawi et al., 2024), вирусы (Maksimov et al., 2019; Sorokan et al., 2020; Veselova et al., 2022)) и абиотическим стрессорам (засуха (Vardharajula et al., 2011; Cherif et al., 2015; Zhou et al., 2016; Sood et al., 2020; Rashid et al., 2021; Puthiyottil, Akkara, 2021; Paul et al., 2022; Kuramshina, Khairullin, 2023; Narayanasamy et al., 2023; Mendoza-Alatorre et al., 2024), засоление (Numan et al., 2018; Soltani et al., 2023; Ghazala et al., 2023; Fouladvand, Soltani, 2024), токсичные соединения (Awan et al., 2020; Pishchik et al., 2021; Yue et al., 2021; Shahzad et al., 2025), что указывает на регуляцию ими неспецифической устойчивости растений (Çakmakçı et al., 2017; Meenakshi et al., 2019; Shobana et al., 2020; Ilyas et al., 2020; Blake et al., 2021). Механизмы, посредством которых *Bacillus* spp. оказывают стимулирующее действие на растения, до конца не изучены, но известно, что они способны модулировать гормональный статус, влиять на архитектуру корневой системы, повышать доступность питательных веществ (макро- и микроэлементов) (Baig et al., 2012; Чеботарь и др., 2016; Saha et al., 2016; Jochum et al., 2019; Kaushal et al., 2019; Hussain et al., 2020; Oleńska et al., 2020; Ghazanfar et al., 2024), регулировать фотосинтез (Timmusk et al., 2014; Abd El-Daim et al., 2019; Ramandi et al., 2024), устьичную проводимость (Kaushal, 2019; Sood et al., 2020), водный статус растений (Abd El-Daim et al., 2018; Kaushal, 2019; Sood et al., 2020; Akhtyamova et al., 2024), продукцию фитогормонов (ауксины, ЦК, ГБ, АБК, СК и ЖК, этилен) (Arkhipova et al., 2007; Dodd et al., 2010; Ishak et al., 2016; Park et al., 2017; Raheem et al., 2018; Danish et al., 2019; Danish, Zafar-ul-Hye, 2019; Zafar-ul-Hye et al., 2019; Sorokan et al., 2021; Ayaz et al., 2022; Veselova et al., 2024; Chebotar et al., 2024), антиоксидантов и осмопротекторов (Zhang et al., 2010; Su et al., 2017; Shobana et al., 2020), экспрессию генов устойчивости

к обезвоживанию (аквапорины, дегидрины) (Abd El-Daim et al., 2019; Blake et al., 2021; Akhtyamova et al., 2024), продукцию летучих органических соединений (ЛОС) (Raza et al., 2016; Ali et al., 2023; Sudakov et al., 2025), ЭПС (Zhang et al., 2015; Khan et al., 2019; de Oliveira-Paiva et al., 2024; Díaz-Cornejo et al., 2024), фермента 1-амино-циклопропан-1-карбоксилат-дезаминазы (АЦК-дезаминазы) (Zhang et al., 2018; Zafar-ul-Hye et al., 2019; Amna et al., 2019; Gowtham et al., 2020; Rashid et al., 2021), органических кислот и вторичных метаболитов (Abd El-Daim et al., 2019; Максимов и др., 2020; Wang et al., 2021; Tran et al., 2022). Эти механизмы в совокупности активируют индуцированную системную защиту растений, повышая их устойчивость и продуктивность в стрессовых условиях (Chourdary, Johri, 2009; Pieterse et al., 2014; Kaushal, 2019; Sood et al., 2020; Blake et al., 2021; Rashid et al., 2021; Yang et al., 2023; Dutilloy et al., 2024). При этом вся цепь защитных реакций на пути индуцированной PGP-бактериями *Bacillus* spp. устойчивости растений к абиотическим стрессам все еще далека от ясности. Более того, на практике эффективность одного и того же штамма *Bacillus* spp. часто варьируется в зависимости от множества факторов (свойств штамма, вида растений, их эколого-географического происхождения, сортовых особенностей, условий выращивания и др.) (Madry et al., 2013; Volis et al., 2015; Idesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Пусенкова и др., 2020; Маркова и др., 2023; Kolesnikov et al., 2023; Garipova et al., 2024). Для более полного использования их потенциала как биоинокулянтов, обеспечивающих устойчивую продуктивность растениеводства (особенно на фоне постоянного изменения климата), чрезвычайно важно понимание общих и специфичных растительно-микробных взаимодействий и механизмов, лежащих в основе их физиологического эффекта на растения, в т.ч. при защите от доминирующих абиотических стрессов.

1.2.3. Роль *Bacillus* spp. в микроб-индуцированной системной устойчивости (MIST) растений к абиотическим стрессам

Согласно современным представлениям, PGP-бактерии *Bacillus* spp. способствуют эффективному противостоянию растений к стрессам благодаря развитию так называемой микроб-индуцированной системной устойчивости (MIST, Microbe-

Induced Systemic Tolerance) (Shobana et al., 2020; Kaushal, 2019; Rashid et al., 2021), которая включает широкий спектр взаимосвязанных механизмов затрагивающих гормональный статус растений, архитектуру корневой системы (Jochum et al., 2019; Kaushal et al., 2019; Hussain et al., 2020), поступление воды из глубоких слоев почвы, биодоступность элементов минерального питания (биологическая азотфиксация (БАФ), солюбилизацию P, K, Zn и др.) (Baig et al., 2012; Чеботарь и др., 2016; Saha et al., 2016; Oleńska et al., 2020; de Oliveira-Paiva et al., 2024; Ghazanfar et al., 2024), состояние фотосинтетического аппарата (Timmusk et al., 2014; Abd El-Daim et al., 2019), устьичной проводимости (Kaushal, 2019; Sood et al., 2020), водного статуса (Abd El-Daim et al., 2018; Kaushal, 2019; Sood et al., 2020), регуляцию продукции фитогормонов (ауксинов, ЦК, ГБ, АБК, СК, ЖК, этилена) и их баланс в растениях (Dodd et al., 2010; Danish et al., 2019; Kudoyarova et al., 2019; Danish, Zafar-ul-Hye, 2019; Zafar-ul-Hye et al., 2019; Sorokan et al., 2021; Veselova et al., 2022; 2024), синтез антиоксидантных и осмопротекторных соединений (Zhang et al., 2010; Su et al., 2017; Shobana et al., 2020), экспрессию генов устойчивости к обезвоживанию (аквапоринов, дегидринов) (Abd El-Daim et al., 2019; Blake et al., 2021; Akhtyamova et al., 2024), продукцию бактериальных метаболитов (Abd El-Daim et al., 2019; Cherepanova et al., 2021;), ЛОС (Raza et al., 2016; Ali et al., 2023; Sudakov et al., 2025), ЭПС (Zhang et al., 2015; Khan et al., 2019; de Oliveira-Paiva et al., 2024; Díaz-Cornejo et al., 2024), АЦК-дезаминазы (Zafar-ul-Hye et al., 2019; Amna et al., 2019; Gowtham et al., 2020; Rashid et al., 2021; Kaur et al., 2023), органических кислот и сигнальных соединений, активирующих ИСУ (Kaushal, 2019; Blake et al., 2021, Rashid et al., 2021; Yang et al., 2023; Румянцев и др., 2024; Gogoi et al., 2025), что приводит к повышению устойчивости и продуктивности растений в условиях стресса (Sood et al., 2020) (рис. 1.3). Эти механизмы в комплексе активируют индуцированную системную защиту растений, повышая их устойчивость и продуктивность в стрессовых условиях. Однако эффективность конкретных штаммов *Bacillus* spp. может варьировать в зависимости от множества факторов, поэтому для оптимального использования их потенциала требуется дальнейшие детальные исследования для понимания особенностей лежащих в основе растительно-микробных взаимодействий.

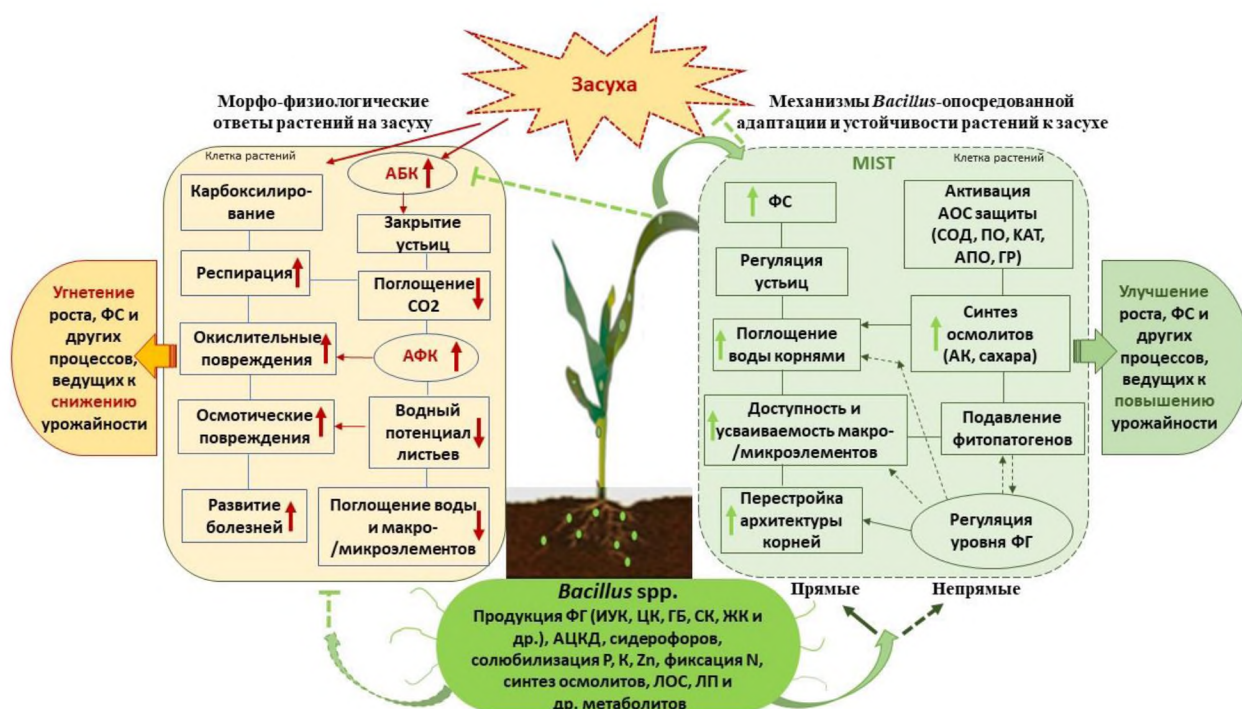


Рис. 1.3. Основные механизмы *Bacillus*-опосредованной адаптации и устойчивости растений пшеницы к засухе: ФГ - фитогормоны, АБК - абсцизовая кислота, АК - аминокислоты, АОС - антиоксидантная система, АФК - активные формы кислорода, АЦКД - 1-аминоциклопропан-1-карбоксилаз-деаминаза, ГБ - гиббереллины, ЖК - жасмоновая кислота, ИУК - индолил-3-уксусная кислота, ЛОС - летучие органические соединения, ЛП - липопептиды, СК - салициловая кислота, СОД - супероксиддисмутаза, ПО - пероксидаза, КАТ - каталаза, АПО - аскорбатпероксидаза, ГР - глутатионредуктаза, ФС - фотосинтез, ЦК - цитокинины, MIST - микроб-индуцированная системная устойчивость (Ласточкина, 2021)

Использование PGP-бактерий, формирующих мутуалистические ассоциации с растениями привлекло большое внимание для борьбы с засухой и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Благодаря мобилизации почвенных нутриентов, регуляции гормонального баланса растений, синтезу регулирующих рост соединений и сигнальных молекул (Goswami, Suresh, 2020). PGP-бактерии в первую очередь повышают устойчивость растений к засухе за счет: 1) активации антиоксидантной системы защиты растений от окислительного повреждения (Batool et al., 2020; Singh et al., 2020; Puthiyottil, Akkara, 2021; Buqori et al., 2025); 2) поддержания фотосинтетической активности (Liu et al., 2019; Zhang et al., 2019; Vukelić et al., 2021; Buqori et al., 2025); 3) модификации архитектуры корней для улучшения поглощения и транспортировки воды (Jochum et al., 2019; Kaur et al., 2023; Buqori et al., 2025; Kondo et al., 2025); 4) регуляции обмена питательных веществ и энергии (Джаббаров и др., 2019; de Oliveira-Paiva et al., 2024); 5) модуляции экспрессии стресс-респонсивных генов и функциональных белков (Zhang et al., 2021; Yang et al., 2023). Широко

подтверждено, что инокуляция PGP-бактериями повышает засухоустойчивость различных культур, таких как кукуруза (Vardharajula et al., 2011; Guler et al., 2016; Sood et al., 2020; Chukwudi et al., 2025), рис (Shukla et al., 2012; Kakar et al., 2016; Narayanasamy et al., 2023), пшеница (Arzanesh et al., 2011; Kasim et al., 2013; Gontia-Mishra et al., 2016; Barnawal et al., 2017; Abd El-Daim et al., 2019; Sood et al., 2020; Rashid et al., 2021; Kuramshina, Khairullin, 2023), просо (Niu et al., 2018), сахарный тростник (Chandra et al., 2018) и мн. др., что суммировано в многочисленных обзорных работах (Çakmakçı et al., 2017; Zhao et al., 2023; Ferrante et al., 2024; Diniz et al., 2025), включая наши (Lastochkina et al., 2019a; Lastochkina 2019b; Ласточкина, 2021; Ласточкина, Аллагулова, 2023; Lastochkina, Bosacchi, 2023). Под действием PGP-бактерий уровни улучшения показателей роста (развитие корневой системы, накопление биомассы, усиление фотосинтеза и снижение окислительного стресса) варьируются у различных растений. Однако степень влияния на рост в условиях засухи и возможность восстановления физиологического статуса растений при оптимальном поливе остаются неясными. Следовательно, выявление механизмов микроб-опосредованного повышения засухоустойчивости представляет актуальную задачу. Эффективность PGP-бактерий на засухоустойчивость растений зависит от вида растений, интенсивности и продолжительности стресса. Растения, использующие C4 путь фотосинтеза, более приспособлены к засушливой среде, чем растения, использующие C3 путь фотосинтеза. Сообщалось, что вклад полезного микробиома в устойчивость растений к засухе у C3- и C4-растений различается (Li et al., 2019; Rubin et al., 2017). Исследования подтверждают, что ответ C4-растений на ризомикробиом отличается от реакции C3-растений (Augé et al., 2015; Li et al., 2019; Rubin et al., 2017), однако механизмы этой дифференциации изучены недостаточно из-за ограниченного числа сравнительных работ. Кроме того, бактериальное сообщество в ризосфере растений постоянно меняется под воздействием засухи (Rubin et al., 2017), что модулирует эффективность PGP-бактерий и приводит к вариабельности их влияния на растения в течение стрессового периода. В исследованиях по инокуляции PGP-бактериями для повышения засухоустойчивости растений применялись представители различных таксонов: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Streptomyces* (Fan et al., 2015; Zhou et al., 2016; Brilli et al., 2019; Abbasi et al., 2020). Многие экспериментальные растения были инокулированы консорциумами PGP-бактерий, демонстрируя повышенную

эффективность по сравнению с монокультурами благодаря синергии механизмов действия (Santoyo et al., 2021). PGP-бактерии, принадлежащие к различным таксонам, способны наделять растения многими полезными свойствами, которые, как предполагается, вносят основной вклад в повышение засухоустойчивости растений (Vurukonda et al., 2016). Однако при мета-анализе не удалось найти исследований, которые оценивали бы связь между таксономическим разнообразием PGP-бактерий, их функциональным потенциалом и устойчивостью растений к засухе. Важно всесторонне оценить благотворное воздействие PGP-бактерий, включая эндофитные, на повышение засухоустойчивости растений и получить более четкое представление о функциональных особенностях экологических сообществ ризосферы.

1.2.3.1. Стимулирование роста растений

Способность улучшать ростовые процессы растений была показана для многих эндофитов (Zachow et al., 2010; Gasser et al., 2011; Malfanova et al., 2011; Glick, 2020; Mengistu, 2020; Kuramshina, Khairullin, 2023; Chebotar et al., 2024). Некоторые исследователи полагают, что ростстимулирующий эффект, опосредуемый эндофитами, в основном связан с обеспечением растений необходимыми питательными веществами, например, азотом (Glick, 2020), являющимся основным лимитирующим соединением при выращивании растений (Benedetto et al., 2017). В научной литературе активно обсуждается механизм биологической азотфиксации (БАФ), основанной на симбиозе бобовых растений с азотфиксирующими бактериями корневых клубеньков (Умаров и др., 2007; Provorov, Tikhonovich, 2022; Safronova et al., 2023). Важнейшие сельскохозяйственные культуры (кукуруза, рис, пшеница, сахарный тростник) демонстрируют повышенную продуктивность при взаимодействии с разнообразными эндофитными diaзотрофами. Наиболее изученные представители этой группы включают роды *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum* и *Klebsiella* (James, 2000). Способность эндофитов фиксировать N_2 *in planta* была подтверждена молекулярными методами путем детекции экспрессии генов нитрогеназы (*nifH*, *nifD*) в колонизированных тканях (Egener et al., 1999; Roncato-Maccari et al., 2003; You et al., 2005) и с помощью изотопного анализа (Sevilla et al., 2001; Elbeltagy et al., 2001). Эксперименты по включению $^{15}N_2$ показали, что растения

сахарного тростника, инокулированные *G. diazotrophicus* Pal5, получали до 0,6% общего азота благодаря БАФ в течение 24-часового периода (Sevilla et al., 2001); для растений риса, колонизированных *Herbaspirillum* sp. B501, это значение составило 0.14% (Elbeltagy et al., 2001), что указывает на значимый вклад diaзотрофных эндофитов в поступление N₂ в растение. Другие исследования показали, что растения могут получать до 70% необходимого азота через БАФ, опосредованную эндофитами (James, 2000). Азотфиксация, в свою очередь, регулируется концентрацией кислорода и доступностью азота. У *Herbaspirillum* sp. B501 экспрессия нитрогеназы подавлялась на обычном воздухе (21% O₂) и индуцировалась в микрокислотных условиях (2% O₂) (You et al., 2005), предполагая, что внутренняя среда растений является подходящей для БАФ. Sevilla с соавт. (2001) продемонстрировали, что в условиях дефицита азота растения сахарного тростника, инокулированные диким типом *G. diazotrophicus* Pal5, имеют значительно большую массу побегов и содержание азота, чем растения, инокулированные мутантом, неспособным фиксировать N₂, предполагая, что БАФ является вероятной причиной стимуляции роста растений. Интересно отметить, что азотное голодание также может подавлять биосинтез растительного гормона ИУК. Например, Brandi с соавт. (1996) продемонстрировали, что синтез ИУК в супернатанте культуры *Erwinia herbicola* 299R был более чем в 10 раз выше в условиях недостатка азота. ИУК был обнаружен и в супернатанте культуры *G. diazotrophicus* (Fuentes Ramirez et al., 1993; Bastian et al., 1998). Следовательно, вполне вероятно, что некоторые эндофиты стимулируют рост растений как за счет поступления азота, так и за счет выработки фитогормонов, в частности ИУК. Эта возможность дополнительно подтверждается наблюдением, что, когда N не был лимитирующим, как дикий тип *G. diazotrophicus* Pal5, так и его *fix*-мутантные штаммы увеличивали биомассу сахарного тростника (Sevilla et al., 2001). Сообщалось о продукции ИУК *in vitro* и его возможном участии в ростстимуляции у многих других эндофитных бактерий (Govindarajan et al., 2008; Rothballer et al., 2008; Jha, Kumar, 2009; Malfanova et al., 2011). Мутационный анализ ризобактерий подтвердил ключевая роль ИУК в стимуляции роста растений (Patten, Glick, 2002; Spaepen et al., 2008). Инактивация генов биосинтеза ИУК (например, *ipdC*, *aldH*) приводит к значительному снижению способности бактерий индуцировать развитие корневой системы и увеличивать биомассу растений (Spaepen et al., 2008; Duca et al., 2014).

Помимо непосредственной стимуляции роста через синтез ИУК, микроорганизмы усиливают устойчивость к абиотическим стрессам (Tang et al., 2023; Chebotar et al., 2024). Например, галотолерантные эндофиты, продуцирующие ИУК, повышают солеустойчивость семян кукурузы и пшеницы на стадии прорастания (Soltani et al., 2023). Аналогичный эффект продемонстрирован для многолетнего райграса, у которого бактериальная ИУК стимулировала рост и адаптацию к засоленным почвам (Feng et al., 2023), а также для суходольных сортов хлопчатника и пак-чой (Arif et al., 2023). Многие эндофиты, продуцирующие ИУК, обладают активностью АЦК (1-аминоциклопропан-1-карбоксилат)-деаминазы – фермента, катализирующего расщепление АЦК, предшественника этилена (Glick, 2014), что снижает стресс-индуцированное накопление фитогормона. Это критически важно, так как избыток этилена подавляет рост первичных корней и формирование латеральных корневых систем (Ivanchenko et al., 2008; Kaur et al., 2023). Согласно модели, предложенной Glick (2014), возникает парадоксальная регуляторная петля: бактериальная ИУК активирует АЦК-синтазу растений, усиливая синтез АЦК. Одновременно АЦК-деаминаза некоторых бактерий гидролизует АЦК, ограничивая продукцию этилена. Этот дуальный механизм позволяет поддерживать оптимальный баланс этилена, необходимый для развития корней в условиях стресса. Активность АЦК-деаминазы выявлена у эндофитных штаммов с ростстимулирующей активностью, включая *Burkholderia* (Sun et al., 2009; Gasser et al., 2011) и *Herbaspirillum* (Rothballer et al., 2008). Роль фермента в стимулировании роста растений подтверждена генетически: делеция гена *acdS* (кодирующего АЦК-деаминазу) у *B. phytofirmans* PsJN уменьшила длину корней проростков рапса на 32%, что доказывает его критическое значение для развития корневой системы (Sun et al., 2009).

Другие фитогормоны, продуцируемые эндофитными бактериями, включают АБК (Cohen et al., 2008; Rumyantsev et al., 2023; Chebotar et al., 2024), цитокинины (Sgroy et al., 2009) и ГБ (Lucangeli, Bottini, 1997; Malfanova et al., 2011). Инокуляция растений кукурузы ГБ-продуцирующим эндофитом *Azospirillum* spp. вызвало увеличение концентрации GA3 в корнях растений и стимулировало рост растений (Lucangeli, Bottini, 1997). Аналогично, инокуляции арабидопсиса АБК-продуцирующим штаммом *Azospirillum* sp. привела к накоплению АБК в растениях (Cohen et al., 2008). Несмотря на эти наблюдения, механизм

регуляции фитогормонального баланса остаётся не до конца изученным и еще предстоит выяснить, вносят ли эндофитные бактерии непосредственный вклад в увеличение пула фитогормонов растений.

Хотя потенциал биоконтроля эндофитов хорошо известен (Berg, Hallmann, 2006; Scherwinski et al., 2008; Malfanova et al., 2011), их базовые механизмы остаются недостаточно изученными. Основные стратегии подавления фитопатогенов включают антибиоз, конкуренцию за ресурсы (питательные вещества, нишу) (CNN, Competition for Nutrients and Niches) и индуцированную системную резистентность (ISR, Induced Systemic Resistance) (Yang et al., 2023; Dutilloy et al., 2024). Экспериментально подтверждён *in planta* механизм ISR, продемонстрированный через морфологические изменения тканей и снижение симптомов заболевания в неколонизированных участках растений. Например, в исследовании Melnick с соавт. (2008) оценили способность штаммов *Bacillus* spp. колонизировать растения какао и уменьшать симптомы черной гнили стручков (*Phytophthora capsici*). Инокуляция листьев суспензией вегетативных клеток привела к локальной колонизации листовых тканей, при этом сосудистая система и новые листья оставались стерильными. Несмотря на отсутствие системной колонизации, через 26 дней наблюдалось значительное снижение симптомов чёрной гнили на неколонизированных листьях, что свидетельствует о запуске ISR.

Колонизация растений эндофитами с биоконтрольной активностью вызывает структурные изменения клеточных стенок, включая накопление каллозы, пектинов, целлюлозы и фенольных соединений, формирующих барьер против фитопатогенов (Benhamou et al., 1998; 2000). К числу ключевых защитных реакций относится также индукция защитных белков – пероксидаз, хитиназ и β -1,3-глюканаз (Fishal et al., 2010; Максимов и др., 2011), что существенно ограничивает распространение патогенов. Например, у инфицированных оомицетом *Pythium* spp. растений огурца, гифы оомицета через 5 дней после инокуляции обнаруживались только в наружных тканях корня, при этом 80% из них были деформированы (Benhamou et al., 2000). Аналогично, колонизация пшеницы *B. subtilis* (Liu et al., 2009) или банана эндофитными штаммами *Pseudomonas* и *Burkholderia* (Fishal et al., 2010) снижала тяжесть заболеваний даже при отсроченном (72 дня) заражении патогенами. Большинство эндофитов, вероятно, используют

комбинацию механизмов биоконтроля. Так, некоторые антимикробные соединения одновременно подавляют патогены напрямую (антибиоз) и запускают ISR (Ongena et al., 2007; Dutilloy et al., 2024). Геномные данные указывают на потенциальную роль конкуренции за железо или ниши колонизации, однако эти механизмы требуют экспериментального подтверждения *in planta*.

1.2.3.2. Модификация архитектуры корней, повышение доступности воды, макро-/микроэлементов в стрессовых условиях

Ключевой адаптивный механизм PGP-бактерий (включая *Bacillus* spp.) в условиях абиотических стрессов включает регуляцию метаболизма растений и ремоделирование их корневой архитектуры (Yan et al., 2013; Vacheron et al., 2013; Kaur et al., 2023; Kondo et al., 2025). Колонизируя ризосферу и/или внутренние ткани растений, бациллы способствуют увеличению длины главного и боковых корней, плотности корневых волосков, площади поверхности корневой системы и накоплению их биомассы. Эти изменения в корневой системе усиливают поглощение воды и питательных элементов из почвы, что в итоге способствует более эффективной адаптации растений к стрессовым условиям (Timmusk et al., 2014; Abd El-Daim et al., 2018; Kaushal, 2019; Buqori et al., 2025). PGP-бактерии *Bacillus* spp., помимо модификации корневой архитектуры, повышают доступность и усвояемость элементов минерального питания для растений-хозяев через БАФ и мобилизацию связанного азота. БАФ позволяет снизить зависимость от синтетических удобрений, обеспечивая растения доступными формами азота (Pishchik et al., 2015; Benedetto et al., 2017; Abd El-Daim et al., 2019; Galindo et al., 2025); высвобождение связанных форм азота из вносимых минеральных удобрений путем выделения ферментов и органических кислот, переводящих азот из минеральных удобрений в биодоступные формы. Эти процессы усиливают эффективность усвоения азота, критически важного для синтеза белков и роста растений в стрессовых условиях. Некоторые штаммы *B. subtilis*, помимо собственной N-фиксирующей активности, могут стимулировать активность других азотфиксаторов ризосферы за счет секреции метаболитов-стимуляторов (Pishchik et al., 2015; Galindo et al., 2025). Это синергетическое взаимодействие повышает общую эффективность биологической

фиксации N_2 в почве, снижая зависимость растений от минеральных удобрений. Засуха снижает доступность азота (NO_3^- и NH_4^+) в почве и подавляет минерализацию его органических форм (Bai et al., 2012; Kaur et al., 2017), что резко ограничивает поглощение питательных элементов корнями (Frechilla et al., 2000). В этих условиях БАФ становится ключевым источником азота для растений, объясняя повышенную эффективность инокуляции N-фиксирующими PGP-бактериями в засушливой среде по сравнению с оптимальным увлажнением. Наряду с азотом, важным элементом минерального питания растений является фосфор (P), значительная часть которого (более 80%) фиксируется в почве и находится в недоступных для растений формах из-за различных физико-химических процессов, таких как адсорбция, осаждение и образование труднорастворимых соединений. Это ограничивает поглощение этого соединения корневой системой и снижает его доступность для нормального роста и развития. Кроме того, абиотические стрессы, например засуха, могут напрямую уменьшить биодоступность фосфора в почвенном растворе (Alori et al., 2017; Zhang et al., 2020). Тем не менее, P-солубилизирующие PGP-бактерии, в частности *Bacillus* spp., способны растворять нерастворимые формы P за счет продукции органических и неорганических кислот, сидерофоров, протонов, гидроксильных ионов и CO_2 . Эти соединения хелатируют катионы или снижают pH почвы, высвобождая связанные формы P и делая их доступными для поглощения растениями (Ramesh et al., 2014; Kour et al., 2019; Billah et al., 2019; Chen et al., 2023).

Согласно мета-анализу Zhao с соавт. (2023), инокуляция растений P-солубилизирующими PGP-бактериями не вызывает значимых изменений морфологии растений при оптимальном поливе, но в условиях стресса приводит к увеличению сухой биомассы, удлинению корневой системы. Улучшение поглощения растениями питательных веществ с последующей интенсификацией их роста связано с N-фиксацией и P-солубилизацией PGP-бактериями (Rodríguez et al., 2006; Kour et al., 2019; de Oliveira-Paiva et al., 2024). Так, инокуляция *B. subtilis* SIR1 в условиях засухи разной интенсивности повышала усвоение растениями пшеницы N, P и калия (K), увеличивая их концентрацию в растениях (Sood et al., 2020). Аналогично, *B. amyloliquefaciens*, способные солубилизовать P и K, обогащали побеги и зерна

пшеницы этими элементами (Zafar-ul-Hye et al., 2019), *B. aryabhattai* MDSR7, MDSR11 и MDSR14 значительно повышали доступность Zn для растений пшеницы, улучшали их рост и способствовали накоплению Zn в зернах (Ramesh et al., 2014), демонстрируя, что минерал-мобилизирующие бактерии рода *Bacillus* могут эффективно улучшать минеральное питание растений, обогащая их различными макро- и микроэлементами, особенно в стрессовых условиях. Для многих PGP-бактерий *Bacillus* spp. показана способность к продукции биосурфактантов, снижающих коэффициент межфазного натяжения и эмульгирующих труднорастворимые гидрофобные соединения, тем самым повышая их биодоступность для растений (Theatre et al., 2021). Кроме того, *Bacillus* spp. могут улучшать доступность и усвоение Fe растениями за счет выделения специфических хелатирующих соединений – сидерофоров (Khan et al., 2016; Saha et al., 2016; Albelda-Berenguer et al., 2019; Ghazanfar et al., 2024). Однако необходимы дальнейшие исследования для изучения механизмов, лежащих в основе этих процессов, и оптимизации использования таких бактерий в качестве биоудобрений.

1.2.3.3. Продукция фитогормонов и регуляция их уровня в растениях

Важное значение в проявлении антистрессового действия PGP-бактерий может играть их способность индуцировать синтез эндогенных фитогормонов критически важных для адаптации растений к засухе (Dobbelaere et al., 1999; Cassan et al., 2001; Forchetti et al., 2007; Chebotar et al., 2024). Согласно мета-анализу Zhao с соавт. (2023), инокуляция PGP-бактериями, продуцирующим фитогормоны, в условиях дефицита влаги усиливает фотосинтез и активирует антиоксидантные ферменты (КАТ, СОД), снижая уровень окислительного стресса. Эти эффекты выражены слабее при оптимальных условиях, что подтверждает роль фитогормонов в стресс-адаптации. Экзогенные фитогормоны, секретируемые PGP-бактериями, регулируют многие физиологические и биохимические процессы в растениях, включая содержание эндогенных фитогормонов в растениях (Ghosh et al., 2019; Yang et al., 2023). Эндогенные фитогормоны, такие как АБК и ЦК, контролируют закрытие устьиц и биосинтез хлорофилла, влияя на фотосинтез (Iqbal et al., 2014). Кроме того, накопление в растениях осмолитов (пролин, сахара, аминокислоты) также регулируется фитогормонами (АБК, ЦК, ЖК и СК) (Gusta et al., 2005; Yadav et al.,

2005; Li et al., 2014; Sharma et al., 2019). Повышение проводимости устьиц, содержания хлорофилла, скорости фотосинтеза, а также усиление регуляции активности осморегулирующих ферментов (включая пролин и растворимые сахара) и антиоксидантов (СОД, ПО и КАТ), указывает на то, что гормональная регуляция растений после инокуляции гормон-продуцирующими PGP-бактериями в условиях засухи значительно улучшает фотосинтетическую и антиоксидантную активность растений. Однако открытым остается вопрос, могут ли бактериальные фитогормоны, секретируемые в питательную среду, действовать на растения-хозяева в качестве экзогенных фитогормонов и вызывать у них специфическую стрессовую реакцию. Этот аспект все еще остается в значительной степени неизученным и требуются дальнейшие более углубленные исследования.

Важную роль в повышении устойчивости и урожайности растений, вызываемом *Bacillus* spp. играет продукция и регуляция уровня фитогормонов (ауксинов, ЦК, ГБ, АБК, СК, ЖК) (Dodd et al., 2010; Sivasakthi et al., 2013; Ishak et al., 2016; Danish et al., 2019; Kudoyarova et al., 2019; Danish, Zafar-ul-Hye, 2019; Zafar-ul-Hye et al., 2019; Sorokan et al., 2021; Yang et al., 2023; Veselova et al., 2022; 2024), которым отводится центральное место в перепрограммировании сигнальных каскадов и формировании стрессоустойчивости растений (Singh et al., 2016; 2022; Rowe et al., 2016; Korver et al., 2018; Liu et al., 2022; Singh et al., 2023). Индольные соединения, такие как индолил-3-уксусная кислота (ИУК), продуцируемые *Bacillus* spp., играют важную роль в стимуляции роста и развитии растений, регулируя процессы деления, удлинения, разрастания и дифференциации клеток, а также развитие сосудистых тканей и апикальное доминирование (Raheem et al., 2018; Etesami et al., 2024). *Bacillus* spp. используют вырабатываемую ИУК в своей стратегии взаимодействия с растениями, включая колонизацию, фитостимуляцию и обход защитных механизмов растений. Исследования подтверждают, что ИУК-продуцирующие *Bacillus* spp. имеют значительное положительное влияние на рост растений в нормальных условиях и при засухе (Timmusk et al., 2014; Barnawal et al., 2017; Kaushal, 2019; Buqori et al., 2025), что обусловлено увеличением способности растений поглощать воду и питательные вещества. ИУК-продуцирующие *Bacillus* spp. способствуют увеличению площади поверхности и длины боковых и придаточных корней растений, что играет

жизненно важную роль в улучшении потребления и усвоения ими микро- и макроэлементов, а также способствует ускорению роста и формированию стресс-устойчивости (Egamberdieva, Kucharova, 2009; Kaushal, 2019; Camaille et al., 2021; Etesami, Glick, 2024). Кроме того, недавно показано, что инокуляция ИУК-продуцирующими бактериями, наряду с улучшением развития корневой системы и повышением активности антиоксидантов, приводила к повышению экспрессии транспортера ауксина тем самым увеличивая экспрессию фотосинтетических генов *RBC-L*, *PEPC*, *SPS* в сахарном тростнике условиях засухи (Buqori et al., 2025). Согласно исследованиям, способность продуцировать ИУК наиболее широко распространена среди почвенных бактерий (Khalid et al., 2004) и чаще встречается у эндофитных бактерий, чем у эпифитных (Sessitsch et al., 2012). Например, из изученных 363 эпифитных и 373 эндофитных бактерий доля ИУК-продуцирующих эндофитов составляла 34%, а эпифитов – 21% (Kuklinski-Sorbal et al., 2004). Недавние исследования Ambreetha с соавт. (2018) показали, что *Bacillus* spp. контролируют уровень эндогенной ИУК в корнях растений путем регуляции экспрессии генов, чувствительных к ауксину, что приводит к изменениям в архитектуре корневой системы растений. Кроме того, исследование Barnawal с соавт. (2017) показало снижение уровня ИУК при засухе и активацию гена *AUX/IAA1* в неинокулированных проростках пшеницы. Однако, при инокуляции штаммом *B. subtilis* LDR2 уровень ИУК увеличивался на 80%, а экспрессия гена *AUX/IAA1* подавлялась. Это свидетельствует о том, что этот штамм модулирует ауксиновый сигнальный путь для защиты растений от засухи. По мере развития исследований были идентифицированы многие ключевые гены ферментов, участвующих в синтезе ауксина в микроорганизмах, и полностью охарактеризован основной путь биосинтеза ИУК (Tang et al., 2023). Предполагается, что основным предшественником при образовании ИУК у микроорганизмов является L-триптофан (Sessitsch et al., 2012). Однако существуют и другие пути синтеза ИУК (индол-3-ацетамидный, индол-3-пируватный и триптаминовый), и иногда бактерии обладают более чем одним путем синтеза ИУК (Sessitsch et al., 2012; Pandey et al., 2017; Tang et al., 2023; Etesami, Glick, 2024). Сложная сеть биосинтеза ИУК и роль ИУК в микроорганизмах все еще не раскрыты, включая взаимодействия между различными регуляторными генами и ключевыми генами ферментов в некоторых путях

синтеза. В аспекте функций ИУК в микроорганизмах необходимы дальнейшие исследования механизма взаимодействия между микробно-синтезированной ИУК и растениями, например, как микроорганизмы взаимодействуют с растениями через сигнальные пути, опосредованные ИУК, является ли ИУК фактором вирулентности, усиливает ли ИУК эффекты вирулентности и каково влияние ИУК на защитные механизмы растений. Выяснение путей синтеза, метаболизма, транспорта и передачи сигнала ИУК в микроорганизмах имеет важное значение для рационального и адекватного использования PGP-бактерий для стимулирования роста и развития растений, повышения урожайности агрокультур, улучшения состояния почвы и создания значительных экономических, экологических и социальных выгод.

Другой важной группой фитогормонов, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*, являются ЦК. Роль ЦК в физиологических процессах растений, включая прорастание семян, деление клеток в корнях и побегах, открывание устьиц, мобилизацию питательных веществ при обезвоживании хорошо известна (Kulaeva, Prokoptseva, 2004; Veselov et al., 2017; Svolacchia, Sabatini, 2023). Согласно исследованиям, около 90% P-солюбилизирующих PGP-бактерий способны продуцировать ЦК *in vitro* (Barea et al., 1976). Рядом авторов выявлена стимуляция ЦК-продуцирующими бактериями ростовых процессов разных видов растений, включая салат (Arkhipova et al., 2005; 2007), арабидопсис, фасоль (Ortiz-Castro et al., 2008), соя (Naz et al., 2009), томат (Ghanem et al., 2011), плосковetchник (Liu et al., 2013), пшеница (Martynenko et al., 2022; Akhtyamova et al., 2023). Кроме того, сообщалось об участии бактериальных ЦК в стимуляции экскудации аминокислот корнями пшеницы (Kudoyarova et al., 2014), а также сборке микробиома филлосферы посредством структурных и химических сигналов, тем самым способствуя повышению стрессоустойчивости растений (Gupta et al., 2022). Для многих *Bacillus* spp. обнаружена способность к синтезу ГБ, регулирующих различные физиологические процессы (прорастание семян, удлинение стебля, цветение, созревание плодов, старение листьев и плодов) (Kaushal, 2019). Хотя точный механизм опосредованного ГБ-продуцирующими бактериями роста растений при засухе остается неясным, предполагается, что увеличение роста корней и плотности корневых волосков связано с увеличением потребления растениями питательных веществ и воды (Eichmann et al., 2021).

Помимо повышения засухоустойчивости растений, наблюдаемого при микробной колонизации, было отмечено изменение в содержании АБК (Kaushal, 2019) - ключевого регулятора стрессовых реакций растений (Eichmann et al., 2021). Это вызывало модификацию архитектуры корневой системы за счет увеличения числа боковых корней, а также регулировало водный баланс растений путем изменения гидравлической проводимости корней, оптимизации скорости транспирации и устьичной проводимости. Кроме того, наблюдалась индукция экспрессии генов, участвующих в обеспечении засухоустойчивости растений (Kaushal, 2019). Согласно исследованиям, около двух третей из 2000 генов, экспрессия которых повышается в ответ на засуху, регулируются АБК (Huang et al., 2008). Обработка растений пшеницы *B. subtilis* LDR2 способствовала поддержанию фотосинтетической активности в условиях засухи. При этом наблюдалось снижение индуцируемого стрессом накопления АБК и АЦК (Barnawal et al., 2017). Авторы предполагают, что ингибирование биосинтеза АБК бациллами подавляло экспрессию гена аквапорина *TaAQP7*, транскрипционная активность которого возрастает при водном стрессе. Кроме того, обработанные *B. subtilis* LDR2 проростки характеризовались усилением экспрессии гена *TaCTR1*, кодирующего негативный регулятор этиленового сигналинга, и гена *TaDREB2*, участвующего в формировании устойчивости к широкому спектру абиотических стрессов (Barnawal et al., 2017). Повышение засухоустойчивости растений под влиянием *B. subtilis* LDR2 может быть связано со снижением соотношения АБК/АЦК, а также модулированием активности регуляторных компонентов этиленового CTR1 и DREB2-опосредованных сигнальных путей. Сообщалось, что *B. velezensis* 5113 может использовать передачу сигналов АБК для регуляции засухоустойчивости пшеницы (Abd El-Daim et al., 2018; 2019). В других исследованиях повышение устойчивости при инокуляции бациллами сопровождалось одновременным снижением АБК и повышением СК и ЖК, выполняющих сигнальные функции в растениях (Kang et al., 2014).

Продукция бактериями СК, ЖК и/или регуляция их эндогенного уровня в растениях может играть важную роль в MIST, поскольку эти фитогормоны являются ключевыми регуляторами запуска каскада сложной цепи защитных реакций растений (Kaushal, 2019; Eichmann et al., 2021). Имеются данные о том, что ключевой мишенью, на который воздействуют PGP-бактерии являются сами сигнальные пути растений, регулирующие

развитие защитного ответа на воздействие стрессов (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Niu et al., 2011; Kaan, Lyons, 2014; Веселова и др., 2015; Yang et al., 2023). Например, инокуляция *B. subtilis* UMAF6639 приводила к формированию устойчивости дыни к мучнистой росе активируя ЖК- и СК-зависимые защитные реакции (Garcia-Gutierrez et al., 2012). Применение *B. cereus* AR156 индуцировало системную устойчивость арабидопсиса через NPR-1 и СК-зависимый сигнальный путь, не затрагивая при этом ЖК/этилен-зависимые пути (Niu et al., 2015). Формирование устойчивости нута под влиянием *Pseudomonas* sp. также происходило за счет продукции фенольных соединений и индукции системной устойчивости через СК-зависимый сигнальный путь (Singh et al., 2003). Эндوفитные бактерии *B. pumilus* усиливали рост растений подсолнечника в условиях водного стресса посредством продукции эндогенной СК (Forchetti et al., 2010; García-Gutiérrez et al., 2013). Очевидно, что ЖК и этилен также выполняют важную регуляторную роль в сети взаимосвязанных сигнальных путей, участвующих в MIST растений (Kaushal, 2019; Eichmann et al., 2021). Хотя есть сведения об активации бактериями СК-, ЖК- и этилен-зависимых сигнальных путей, участвующих в развитии защитного ответа растений при биотических стрессах (Niu et al., 2016; Yang et al., 2023; Rumyantsev et al., 2023; Veselova et al., 2022; 2024), данные о регуляции засухоустойчивости пшеницы (в т.ч. с разными адаптивными стратегиями) с вовлечением этих сигнальных путей практически отсутствуют. Также не обнаружено сообщений и о роли других фитогормонов (к примеру, брассиностероидов, стриголактонов) в MIST у растений, хотя участие этих фитогормонов в смягчении абиотических стрессов не вызывает сомнения (Eichmann et al., 2021).

Этилен – еще один важный фитогормон, регулирующий рост и развития растений, включая прорастание семян, старение листьев, созревание цветов и плодов. Однако эффект этилена зависит от его концентрации в тканях, и во время стресса его биосинтез усиливается, что негативно влияет на растения (Eichmann et al., 2021). Ключевым ферментом в этилен-зависимой регуляции роста растений является АЦК-деаминаза, которая участвует в разложении АЦК – непосредственного предшественника этилена (Glick, 2014). Многие штаммы *Bacillus* spp. продуцируют АЦК-деаминазу, и при их использовании отмечается снижение вызываемого стрессом накопления этилена, который в противном случае мог бы подавлять рост (Rashid et al., 2021). Бактерии используют АЦК в качестве источника

питания, что приводит к снижению его содержания в растениях и, как следствие, подавлению синтеза этилена в корнях. Высвобождающийся из корней в ризосферу растения-хозяина АЦК и расщепляется продуцируемой бациллами АЦК-дезаминазой до аммиака и α -кетобутирата. В результате содержание этилена снижается, что способствует улучшению поглощения воды и питательных веществ растениями, и, в конечном итоге, их росту (Glick, 2014; Zhang et al., 2018; Danish, Zafar-ul-Hye, 2019; Gupta, Pandey, 2019; Zafar-ul-Hye et al., 2019; Singh et al., 2022; Kaur et al., 2023). Инокуляция PGP-бактериями, способными продуцировать АЦК-дезаминазу, не только значительно улучшила морфологию растений, но и значительно усилила фотосинтез растений и подавила окислительное повреждение в условиях засухи по сравнению с таковым в условиях хорошего полива (мета-анализ данных с 1990–2021 гг.) (Zhao et al., 2023). Показано, что продуцирующие АЦК-дезаминазу PGP-бактерии, включая *Bacillus* spp., способны улучшать рост растений в условиях дефицита влаги (Kaushal, 2019; Zafar-ul-Hye et al., 2019; Danish, Zafar-ul-Hye, 2019). Так, инокуляция штаммом *B. amyloliquefaciens*, синтезирующими АЦК-дезаминазу, в условиях водного стресса приводила к значительному повышению интенсивности фотосинтеза, транспирации, устьичной проводимости, содержания хлорофиллов и урожайности зерна пшеницы (Danish, Zafar-ul-Hye, 2019; Zafar-ul-Hye et al., 2019). Согласно другим исследованиям, инокуляция бактериями, продуцирующими АЦК-дезаминазу, вызывала заметное увеличение относительного содержания воды в листьях растений в условиях водного стресса (Salem et al., 2018). Интересно отметить, что, хотя активность АЦК-дезаминазы описана для многих штаммов *Bacillus* spp., гены АЦК-дезаминазы (*acdS*, *acdR*) не были идентифицированы в геномах 271 штамма *Bacillus* spp. и *Paenibacillus* spp. (Nascimento et al., 2014). Это указывает на возможное существование альтернативных механизмов регуляции этилен-зависимых ответов у растений, не связанных с продукцией АЦК-дезаминазы, которые также могут быть задействованы в микроб-индуцированной устойчивости к засухе.

Таким образом, несмотря на признание ключевой роли фитогормональных сигнальных систем в механизмах MIST, их конкретный вклад в повышение устойчивости растений к абиотическим стрессам, опосредованное бактериальной колонизацией, остается малоизученным.

1.2.3.4. Модуляция процессов фотосинтеза

Абиотические стрессы вызывают целый каскад негативных физиологических изменений в растениях, включая снижение водного потенциала почвы, закрытие устьиц, ингибирование фотосинтеза, обезвоживание клеток и гиперпродукцию активных форм кислорода (АФК) (dos Santos et al., 2022; Jiang et al., 2025). Это приводит к развитию вторичных стрессов - осмотического и окислительного, что в конечном итоге тормозит рост растений и может стать причиной их гибели (Beck et al., 2007; Ahmad et al., 2018). PGP-бактерии *Bacillus* spp. способны поддерживать в растениях более высокое относительное содержание воды при засухе, что является важным физиологическим показателем, коррелирующим с засухоустойчивостью (Kaushal, 2019; Sood et al., 2020). Ключевыми параметрами для оценки состояния растений в условиях засухи являются устьичная проводимость, содержание хлорофилла, скорость фотосинтеза, а также соотношение переменной и максимальной флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m). Уникальное свойство зеленых растений к фотосинтезу определяет их центральную роль в пищевой пирамиде как природных экосистем, так и жизнедеятельности человечества. Порядка 95% сухих веществ растений представляет собой преобразованную солнечную энергию, аккумулированную благодаря фотосинтезу. При этом, 98,5% их состава составляют углерод, водород и кислород, которые растения потребляют из атмосферы (Жученко 2001; 2010). Согласно имеющимся данным, инокуляция растений (пшеницы) бактериями рода *Bacillus* spp. оказывает положительное влияние на ряд физиологических показателей, связанных с устойчивостью к засухе, включая некоторые параметры фотосинтеза (Sood et al., 2020). В частности, отмечается повышение содержания хлорофилла, улучшение устьичной проводимости и эффективности фотосистемы II (ФСII) у бактеризованных растений в условиях дефицита влаги. Предполагается, что эти положительные эффекты обусловлены способностью *Bacillus* spp. поддерживать более благоприятный водный статус и питательный режим растений, что способствует сохранению клеточного тургора и активации защитных механизмов (Kaushal, 2019). *Bacillus*-опосредованное улучшение водного баланса у пшеницы в стрессовых условиях приводит к повышению скорости фотосинтеза. Это связано с тем, что более высокая устьичная проводимость обеспечивает

усиление диффузии CO_2 в мезофильные клетки (Timmusk et al., 2014). Продemonстрировано, что инокуляция *B. subtilis* LDR2 приводила к увеличению фотосинтетической активности растений в условиях дефицита влаги, что сопровождалось накоплением ИУК и снижением уровней АБК и АЦК (Barnawal et al., 2017). У пшеницы, инокулированной LDR2 и подвергнутой засухе, наблюдалось повышение экспрессии генов *TaCTRI* и *TaDREB2*, участвующих в формировании устойчивости к абиотическим стрессам (Barnawal et al., 2017). Аналогичный защитный эффект был отмечен для *B. velezensis* 5113, который способствовал сохранению фотосинтетической активности растений и поддержанию более высокого содержания фотосинтетических пигментов в условиях засухи (Abd El-Daim et al., 2019). Вместе с тем, анализируя имеющиеся в литературе данные становится очевидным, что несмотря на то, что фотосинтез напрямую связан с формированием продуктивности растений, детальные механизмы воздействия эндофитных PGP-бактерий на этот процесс, включая параметры фотохимической активности при стрессах, в большей степени остаются неизученными.

1.2.3.5. Регуляция синтеза антиоксидантов и снижение окислительного стресса

Различные стрессовые факторы окружающей среды, несмотря на разную природу, приводят к сходным морфологическим и физиолого-биохимическим изменениям в растениях, которые можно рассматривать как неспецифический ответ на стресс (Шакирова, 2001; Potters et al., 2007). Общим механизмом растений в ответ на воздействие стрессовых факторов является усиление продукции АФК (O_2^- , OH^- , H_2O_2), оказывающих негативное воздействие на клеточные структуры (Beck et al., 2007; Ahmad et al., 2018; Hasanuzzaman et al., 2014; 2020). Избыточное накопление АФК приводит к неспецифическому взаимодействию с различными клеточными компонентами, что вызывает серьезные повреждения липидов, белков, углеводов и нуклеиновых кислот. Для нейтрализации последствий окислительного стресса растения задействуют антиоксидантную систему (Колупаев и др., 2015), включающую ферментативные (СОД, пероксидаза (ПО), КАТ, аскорбатпероксидаза (APX), GR) и неферментативные (пролин, глутатион, AsA), цистеин, флавоноиды, каротиноиды и токоферол) компоненты, находящиеся в тесном функциональном взаимодействии (Farooq et al., 2009; Kaushal, 2019). Поддержание баланса

между продукцией АФК и антиоксидантной защитой является ключевым механизмом стресс-адаптации растений. Накопленные в литературе данные свидетельствуют об участии PGP-бактерий в обезвреживании АФК и снижении окислительного стресса в растениях посредством модуляции систем их антиоксидантной защиты (Omar et al., 2009; Ullah, Bano, 2015). Это проявляется в снижении концентрации МДА – конечного продукта ПОЛ, что показано на многих культурах, в том числе и растениях пшеницы (Kang et al., 2014; Abd El-Daim et al., 2014; Gusain et al., 2015; Armada et al., 2015; Li, Jiang, 2017; Ishizawa et al., 2017; Kaushal, 2019, Rashid et al., 2021). Механизмы влияния PGP-бактерий на антиоксидантную систему растений могут быть достаточно сложными. Так, имеются сведения о неоднозначном как активирующем, так и ингибирующем влиянии *Bacillus* spp. на активность антиоксидантных ферментов, что во многом может быть обусловлено особенностями самого штамма, условиями произрастания и других факторов. В разных исследованиях показано, что повышение активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД, ПО и КАТ, является одним из основных механизмов *Bacillus*-опосредованной устойчивости растений к стрессам (Sood et al., 2020; Kaushal, 2019; Buqori et al., 2025). Обработка растений *B. amyloliquefaciens* 5113 оказывала защитный эффект в условиях дефицита влаги путем регуляции активности гена аскорбатпероксидазы (*APX1*) и ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Этот важный антиоксидантный механизм обеспечивает высокую окислительно-восстановительную буферность клеток благодаря поддержанию высокого внутриклеточного содержания AsA и глутатиона (Kasim et al., 2013). Однако эффекты разных штаммов *Bacillus* spp. могут различаться – некоторые не влияют на активность APX при тепловом стрессе, в то время как при засухе и холоде такого снижения не наблюдается. Так, инокуляция растений пшеницы *B. velezensis* 5113 не влияла на активность аскорбат-глутатионового цикла в обычных условиях, но существенно снижала активность APX при тепловом стрессе. В то же время, при засухе и холодовом стрессе достоверного снижения активности APX не наблюдалось (Abd El-Daim et al., 2019). Другие исследования показали, что засуха приводила к увеличению уровня экспрессии таких связанных со стрессом генов как *APX1*, *SAMS1* и *HSP17.8* и повышению активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла в листьях пшеницы. Однако у растений, инокулированных *B. amyloliquefaciens* 5113, количество транскриптов этих генов было

ниже, что свидетельствует об улучшении гомеостатических механизмов за счет бактериальной инокуляции (Kasim et al., 2013). Очевидно, что различные штаммы *Bacillus* spp. могут по-разному снижать степень окислительных повреждений, задействуя разные биохимические пути, что может зависеть от характеристик самого штамма, вида растения, типа и интенсивности стресса, что, безусловно требует дальнейших более детальных исследований.

1.2.3.6. Регуляция процессов водного обмена, продукция осмолитов и снижение осмотического стресса

Весомый вклад в формирование устойчивости растений к абиотическим стрессам, вызывающим нарушение водного обмена, вносит усиление синтеза осмопротектантов. Среди которых особое место занимает пролин, который помимо свойств осмопротектанта, характеризуется антиоксидантной активностью (Molinari et al., 2007; Sood et al., 2020), что повышает его функциональное значение в защите растений от обезвоживания и окислительного стресса. Пролин выполняет множество важных функций в условиях стресса, включая регуляцию кислотности цитозоля, снижение ПОЛ за счет улавливание свободных радикалов, а также стабилизацию субклеточных компонентов и структур, таких как белки и мембраны (Sood et al., 2020). Участие пролина в механизмах защитного действия PGP-бактерий *Bacillus* spp. было показано в исследованиях на различных видах дикорастущих и культурных растений (Benedetto et al., 2017; Numan et al., 2018; Garipova et al., 2021). К примеру, применение PGP-бактерий повышало биомассу, относительное содержание воды в листьях растений кукурузы, подвергнутых засухе, за счет накопления пролина (Sandhya et al., 2010). Однако остается открытым вопрос, с чем именно связано *Bacillus*-индуцированное повышение концентрации пролина в растениях – с его более активным поглощением из ризосферы или же с регуляцией его биосинтеза в самих растениях (Kaushal, 2019). Кроме того, *Bacillus* spp. могут повышать стресс-устойчивость растений за счет стимуляции накопления других осмолитов, таких как глицин-бетаин и сахара (глюкоза, фруктоза, сахароза) (Kaushal, 2019; Abd El-Daim et al., 2019). Эти полярные метаболиты играют ключевую роль в преодолении осмотического стресса

путем поддержания клеточного тургора через снижение водного потенциала растений без уменьшения в них фактического содержания воды (Çakmakçı et al., 2017; Kaushal, 2019). Сообщалось, что важную роль в *Bacillus*-опосредованном поддержании осмотического баланса и защите белков ФСП при абиотических стрессах играет глицинбетаин (Kaushal, 2019). В других исследованиях показано, что засухоустойчивость растений существенно повышалась при инокуляции PGP-бактериями, сверхпродуцирующими или усиливающими накопление внутри растений трегалозы (Sharma et al., 2020), которая, как известно, играет ключевую роль в передаче сигналов внутри клетки и стабилизации клеточных структур и белков (Kaushal, 2019; Yadav et al., 2021). Способность *B. subtilis* GB03 усиливать биосинтез холина (первичного метаболита биосинтеза глицин бетаина) и накопление глицин-бетаина в растениях приводила к повышению относительного содержания воды в листьях и накоплению сухой биомассы (Zhang et al., 2010; Kaushal, 2019). Вызываемое *B. subtilis* 2-кратное накопление глицин-бетаина и 5-кратное накопление холина придавало засухоустойчивость арабидопсису, тогда как у мутантных линий *xipotl* с нарушенным биосинтезом холина такая способность *B. subtilis* утрачивалась (Zhang et al., 2010; Kaushal, 2019). В ряде исследований сообщалось об осмопротекторной роли сахаров в подвергнутых засухе и инокулированных PGP-бактериями растениях (Kaushal, 2019). Для некоторых штаммов *Bacillus* spp. выявлена способность увеличивать накопление растениями полиаминов, таких как спермидин, спермин, кадаверин и путресцин, являющихся основными метаболитами, повышающими осмоустойчивость растений при дефиците воды, в дополнение к их ключевой роли в регуляции транскрипции, дифференцировке клеток и удлинении корней (Zhou et al., 2016; Kaushal, 2019). *B. megaterium* BOFC15 увеличивала накопление эндогенных полиаминов в растениях, активируя полиамин-зависимые сигнальные пути, тем самым смягчая негативное воздействие стресса (засухи) на растения, поддерживая повышенное содержание воды в клетках и сохраняя фотосинтетическую активность (Zhou et al., 2016). В недавних исследованиях также описана роль спермидина и кадаверина в усилении роста корней у инокулированных PGP-бактериями растениях при осмотическом стрессе (Kaushal, 2019; Miljakovic et al., 2020). Более ранние работы показали повышение концентрации

полиаминов у арабидопсиса при инокуляции спермидин-продуцирующим штаммом *B. megaterium* BOFC15 (Zhou et al., 2016), что позволяло растениям лучше переносить стресс за счет формирования крепкой корневой системы с более длинными первичными и боковыми корнями в сравнении с контролем (Zhou et al., 2016). Исследование фильтрата культуры *B. subtilis* ОКВ105 выявило, что основным ростстимулирующим соединением является полиамин спермидин. Секреция спермидина в этом штамме бактерий была связана с экспрессией генов *yecA* и *speB*, которые кодируют полиаминпермеазу и агматиназу, соответственно. Кроме того, было обнаружено, что индуцированная *B. subtilis* ОКВ105 экспрессия генов экспансинов *NtEXPA1* и *NtEXPA2* (связанных с растяжением клеточной стенки) приводит к ингибированию экспрессии гена *ACO1*, отвечающего за биосинтез этилена (Awan et al., 2020). Анализ профилей транскрипции *B. subtilis* выявил что гены, ответственные за ацетилирование, транспорт и биосинтез полиаминов, демонстрируют дифференциальную экспрессию при выращивании бактерий в щелочных или кислых средах. Кроме того, литературные данные свидетельствуют о существовании связи между полиаминами и образованием биопленок у *B. subtilis*, которые играют важную роль в защите растений-хозяев от различных стрессовых воздействий (Kolodkin-Gal et al., 2012; Hobley et al., 2017; Шарипова и др., 2020). К примеру, транскриптомный анализ спермидин-дефицитных мутантов *B. subtilis* показал необходимость полиамина спермидина в образовании биопленок. Установлено, что это соединение активирует экспрессию генов синтеза экзополисахаридов матрикса и *tasA*-оперона, регулируемых белком SlrR (Hobley et al., 2017). Также установлена корреляция между содержанием полиаминов, уровнем АБК и устойчивостью растений к абиотическим стрессорам (Zhou et al., 2016). Это направление, несомненно, представляет интерес для раскрытия механизмов формирования опосредованной PGP-бактериями стресс-устойчивости растений (Kaushal, 2019). Недавние исследования с использованием метаболомных подходов позволили выявить накопление при стрессовых воздействиях в инокулированных *Bacillus* spp. растениях белков дегидринов и ряда других осмопротекторных соединений (Abd El-Daim et al., 2019). В другом исследовании *B. amyloliquefaciens* GB03 смягчал осмотический стресс, активируя гены дегидринов и

аквапоринов, а также изменяя гормональный гомеостаз, увеличивая содержание антиоксидантных ферментов и ЭПС (Su et al., 2017; Shobana et al., 2020). Имеются сведения об участии продуцируемых бактериями ЭПС в колонизации корней, улучшении водоудерживающей способности растений, плодородии почвы, а также их важной роли в защите самих клеток бактерий от высыхания (Naseem et al., 2018; Khan, Bano, 2019). К тому же инокуляция ЭПС-продуцирующими RGP-бактериями, продемонстрировала более высокие уровни накопления в растениях в условиях водного стресса пролина, сахаров и аминокислот, тем самым способствуя повышению стресс-устойчивости (Naseem et al., 2018; Khan, Bano, 2019). В целом, несмотря на то, что многие исследования демонстрируют положительное влияние RGP-бактерий на повышение содержания пролина и других совместимых растворимых веществ в подвергнутых стрессу растениях, существуют и противоречивые данные, когда под воздействием некоторых штаммов накопление пролина, напротив, снижается (Gagirova et al., 2021), что требует дальнейшего изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе этих различий, а также о генетических детерминантах, ответственных за их продукцию в разных штаммах RGP-бактерий, что ограничивает разработку эффективных биотехнологических решений для повышения адаптации сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам. Кроме того, остается неясным, как контрастные по стратегии адаптации к обезвоживанию растения реагируют на инокуляцию RGP-бактериями - существуют ли различия в индукции накопления осмолитов, активации антиоксидантных систем и других адаптивных механизмов, что может быть связано с генетическими особенностями, как самих бактерий, так и сортов растений, что, безусловно требует дальнейших исследований.

1.2.3.7. Продукция биологически активных метаболитов и перепрограммирование метаболических и молекулярных механизмов во время стрессовых воздействий

К непрямым механизмам *Bacillus*-опосредованного улучшения роста растений при стрессах относится эффективная конкуренция и подавление патогенных микроорганизмов (грибов, бактерий) благодаря продукции вторичных метаболитов с антибиотическими свойствами (Stein, 2005; Ongena, Jacques, 2008; Максимов и др.,

2011; Mnif, Ghribi, 2015; Khan et al., 2016; Salazar et al., 2017; Miljakovic et al., 2020; Nannan et al., 2021; Cherepanova et al., 2021; Tran et al., 2022; Sudakov et al., 2025), включая рибосомные (бактериоцины) или нерибосомные (липopeптиды (ЛП), поликетиды) пептиды с низкой молекулярной массой (Malfanova et al., 2012; Salazar et al., 2017; Toral et al., 2018; Juturu, Wu, 2018; Hanif et al., 2019; Dimopoulou et al., 2021; Theatre et al., 2021; Xiao et al., 2021; Румянцев и др., 2024), ферментов, разрушающих клеточную стенку фитопатогенов (хитиназы, целлюлазы, глюканазы, протеазы, липазы) (Abriouel et al., 2011; Yan et al., 2011; Senol et al., 2014; Ma et al., 2020), сидерофоров (Hertlein et al., 2014; Ghazanfar et al., 2024), летучих органических соединений (ЛОС) (Raza et al., 2016; Paul et al., 2022; Sudakov et al., 2025), а также снижению образования этилена в растениях и активации MIST (Miljakovic et al., 2020). Для разных *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans*) показана способность синтезировать бактериоцины и бактериоциноподобные вещества (амилолизин, амизин, субтилин, субтилозин А, субтилозин В, турицин и др.) с антимикробными свойствами в отношении фитопатогенов (Abriouel et al., 2011). Однако гораздо более сильные антимикробные свойства проявляют бациллы, продуцирующие нерибосомные ЛП и пептиды (Fira et al., 2018). ЛП влияют на колонизацию и сохранение представителей *Bacillus* spp. в ризосфере и стимулируют защитные механизмы растений (Han et al., 2015). Наиболее важные продуцируемые бациллами циклические ЛП представлены семействами сурфактина, итурина и фенгицина (Stein, 2005; Theatre et al., 2021; Cherepanova et al., 2021). Показано, что *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. coagulans* синтезируют ЛП семейства сурфактинов (сурфактин, лихенизин, пумилацидин, галобацилин, бамилоцин), которые действуют как противогрибные и антибактериальные средства (Ongena, Jacques, 2008; Cherepanova et al., 2021; Theatre et al., 2021). Семейство итуринов состоит из гептапептидов (итурин, микосубтилин, бацилломицин, бациллопептины, миксирин, моявенсин, субтулен, продуцируемые *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circans*, *B. pumilus* и *B. vallismortis*), обладающих ингибирующим действием против широкого спектра грибов, но менее активных против бактерий. Продукцию ЛП семейства фенгицинов (декапептиды фенгицин, плипастатин, мальтацин), полезных

для защиты растений от грибных патогенов, обнаружили у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* (Ongena, Jacques, 2007; Chen et al., 2009). Нерибосомные ЛП включают курстакины, бацитрацины, полимиксины, грамицидины и тирокидины. Курстакины – циклические или линейные гептапептиды, специфичные для *B. cereus* и *B. thuringiensis*, обладают способностью дестабилизировать биологические мембраны как бактерий, так и грибов. Бацитрацины – циклические декапептиды, продуцируемые *B. licheniformis*, *B. subtilis* и *B. sonorensis*, активность которых в первую очередь направлена против грамположительных бактерий. Полимиксины – циклические декапептиды, продуцируемые *Paenibacillus polymyxa* подавляют рост и размножение грамотрицательных бактерий. Грамицидины и тироцидины – циклические декапептиды, синтезируемые *B. brevis*, активны в отношении широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий. Некоторые виды бацилл продуцируют и другие нерибосомные пептиды (бацилизин, ризоктицин, амикумацин, микобациллин, дикетопиперазины) и поликетиды (бациллин, дигидробациллин, диффицидин, макролактин) с различными противогрибными и антибактериальными свойствами. У наиболее часто используемых биоагентов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* значительная часть генетического материала (соответственно 4–5% и 8,5%) отвечает за синтез вторичных метаболитов с потенциалом для продукции более 20 антимикробных соединений разной структуры (Stein 2005, Chen et al., 2009). В настоящее время кластеры генов, кодирующих бактериоцины, а также пептиды и поликетиды легко идентифицируются при геномном сканировании. Для 328 штаммов 57 видов порядка *Bacillales* идентифицированы в общей сложности 583 предполагаемых кластера генов бактериоцина, кроме того, у 49 видов *Bacillales* обнаружили 1231 предполагаемых кластера генов нерибосомных антимикробных соединений, которые объединили в группы в соответствии с 23 типами пептидов и пятью типами вторичных метаболитов поликетидной природы (Zhao, Kuipers, 2016). Во многих исследованиях показано, что гидролитические ферменты (хитиназы, хитозаназы, глюканазы, целлюлазы, липазы и протеазы), синтезируемые бациллами, очень активно разрушают клеточные стенки грибов и бактерий, а также повышают устойчивость растений к стрессам (Leelasuphakul et al., 2006; Guleria et al., 2016; Gautam et al., 2019; Villa-Rodríguez et al., 2019). Описано

значение синтезируемых бациллами сидерофоров в биоконтроле, основанном на конкуренции за Fe с целью уменьшения его доступности для патогенов (Beneduzi et al., 2012). Большинство бактериальных сидерофоров представляют собой катехолаты, такие как бациллибактин, продуцируемый некоторыми бациллами (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*). Кроме того, представители рода *Bacillus* продуцируют широкий спектр сидерофоров, в частности, пиовердин, пиохелин, шизокинен и петробактин (Khan et al., 2016; Ghazanfar et al., 2024).

Bacillus spp. также секретирует внеклеточные полисахариды и различные ЛОС, которые изменяют структуру и морфологию корней и вызывают MIST у растений (Etesami, Beattie, 2017; Panpatte et al., 2017; Chiappero et al., 2019; Paul et al., 2022). Установлено, что RGP-бактерии синтезируют широкий диапазон ЛОС, таких как короткоцепочечные алифатические альдегиды и кетоны, простые и сложные эфиры, спирты, серосодержащие соединения, углеводороды (Vaishnav et al., 2017; ALKahtani et al., 2020). ЛОС имеют липофильную природу и действуют как сигнальные молекулы для меж- и внутриорганных коммуникаций и передачи сигналов от клетки к клетке. Современные исследования, обобщенные в базе данных микробных ЛОС mVOC3.0 (<https://bioinformatics.charite.de/mvoc/>) насчитывают более 1000 ЛОС, синтезируемых бактериями и грибами (Lemfack et al., 2014; Paul et al., 2022; Sudakov et al., 2025). Эти соединения выступают ключевыми медиаторами в дистанционном взаимодействии микробных сообществ, участвуя как в межмикробной коммуникации, так и в «диалоге» между растениями и микроорганизмами ризосферы (Bitas et al., 2013). Кроме того, ЛОС регулируют экспрессию генов, ассоциированных с гормональным сигналингом, активацией защитных механизмов, стрессоустойчивостью, вирулентностью и биопленкообразованием у микроорганизмов (Bitas et al., 2013; Audrain et al., 2015). Важную роль ЛОС играют в индукции прайминга и системных адаптивных реакций растений к стрессовым факторам, что подтверждается экспериментальными данными (Chourdhary, Johri, 2009; Niinemets, 2010). Например, предпосевное замачивание в суспензии *B. thuringiensis* AZP2 в условиях засухи приводило к увеличению биомассы проростков пшеницы и их выживаемости за счет модификации профиля ЛОС и усиления фотосинтетической активности (Timmusk et al., 2014). Инокуляция

штаммами *B. amyloliquefaciens* IN937a и *B. subtilis* GB03 стимулировала синтез таких ЛОС как 2R,3R-бутандиол и 3-гидрокси-2-бутанон в растениях арабидопсиса, что сопровождалось модуляцией экспрессии генов, связанных с ростовыми процессами. Аналогичный эффект наблюдался при колонизации корней арабидопсиса штаммом *Pseudomonas chlororaphis* Об: продукция 2R,3R-бутандиола индуцировала закрытие устьиц, повышая устойчивость растений к засухе (Cho et al., 2008). Предполагается, что продуцируемые PGP-бактериями ЛОС могут активировать защитные реакции растений через СК-зависимый сигнальный путь (Cho et al., 2008, Vurukonda ye al., 2016), а также влиять на формирование микробных биопленок в ризосфере, что усиливает стресс-устойчивость хозяина (Chen et al., 2015). Кроме того, эти соединения выступают в роли агентов биоконтроля, запуская SAR к патогенам (Ryu et al., 2004; Raza et al., 2016). Например, обработка *A. thaliana* штаммами *Bacillus* sp. GB03 и IN937a приводила к накоплению бутандиола и ацетоина, что снижало степень поражения патогеном *Erwinia carotovorasub* sp. *carotovora* и стимулировало рост растений (Ryu et al., 2004). Этот эффект связывают с подавлением эмиссии ЛОС и усилением фотосинтетической активности, что подтверждается работами Timmusk с соавт. (2014) и Kaushal (2019).

Появление новых методов исследований позволяет более широко и комплексно оценить влияние микробных инокуляций на все жизненно важные системы растений, вовлеченные в регуляцию роста и развития в норме и в стрессовых условиях. В частности, исследование Abd El-Daim с соавт. (2019) что инокуляция пшеницы штаммом *B. velezensis* 5113 в нормальных условиях вызывает значимые изменения метаболического профиля: 61 метаболит (36 увеличивается, 25 уменьшается) дифференциально изменяется по сравнению с контролем. Среди ключевых изменений отмечено повышение уровня L-пролина, L-глутамина и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), а также модуляция путей метаболизма аланина, аспартата и глутамата. При этом инокуляция снижала интенсивность биосинтеза флавоноидов, включая флавоны и флавонолы, что может указывать на подавление защитных реакций, связанных с взаимодействием «растение-микроб». В условиях засухи неинокулированные растения демонстрировали активную стресс-индуцированную перестройку метаболома, накапливая 194 метаболита в листьях, тогда как у инокулированных растений этот

показатель снижался до 139 метаболитов. При этом, в условиях обезвоживания значительную разницу между инокулированными и неинокулированными растениями отмечали только по 29 метаболитам (10 увеличивалось, 19 – уменьшалось), причем ингибирующий эффект *B. velezensis* 5113 на биосинтез флавоноидов сохранялся как в норме, так и при дефиците влаги. Это позволяет предположить, что бактерии регулируют энергозатратные защитные пути, оптимизируя распределение ресурсов растения. Протеомный анализ выявил, что инокуляция *B. velezensis* 5113 повышает содержание белков фотосинтетического аппарата в листьях пшеницы. Важно отметить, что в неинокулированных растениях засуха полностью подавляла синтез этих белков, тогда как присутствие бактерий нивелировало негативный эффект стресса, что подчеркивает их роль в защите фотосинтеза. Кроме того, инокуляция активировала синтез нескольких белков с неизученными функциями, что указывает на сложность молекулярных механизмов взаимодействия. Особого внимания заслуживает тот факт, что в инокулированных *B. velezensis* 5113 растениях пшеницы значительно повышалось содержание ГАМК, глутамина и пролина. Роль пролина и глутамина в *Bacillus*-опосредованной регуляции засухоустойчивости растений пшеницы уже описывалась в литературе, однако для ГАМК такие работы отсутствуют. Имеются единичные сведения об участии ГАМК в становлении микробно-растительных взаимодействий (Seifikalhor et al., 2019). Например, показано, что ГАМК синтезируется в клубеньках бобовых, выступая медиатором симбиоза между растением и ризобиями. Более того, при дефиците влаги обработка тимopheевки эндофитным штаммом *B. subtilis* B26 стимулировала накопление ГАМК в побегах и корнях, коррелируя с повышением засухоустойчивости (Gagné-Bourque et al., 2016). Эти данные указывают на универсальность ГАМК как компонента стресс-адаптационных механизмов, индуцируемых микробиотой. В настоящее время известно, что ГАМК может быстро накапливается в тканях растений в ответ на стрессовые воздействия биотической и абиотической природы и играет значимую роль в стресс-адаптации растений и вовлекается в регуляцию физиологических и биохимических путей, обеспечивающих формирование стресс-устойчивости растений, в т.ч. в условиях дефицита воды (Pandey et al., 2017). ГАМК участвует в поддержании углеродно-азотного баланса через

модуляцию путей метаболизма аминокислот и углеводов, регуляции роста за счет влияния на клеточное деление и растяжение, нейтрализации АФК через активацию антиоксидантных систем (Seifikalhor et al., 2019). Важно отметить, что сравнительно недавно ГАМК начали рассматривать не только как метаболит, но и как сигнальную молекулу, вовлеченную в стрессовые сигналы и запуск каскада защитных реакций растений (Seifikalhor et al., 2019). Выявленная способность *B. velezensis* 5113 модулировать содержание ГАМК в нестрессированных листьях пшеницы может указывать на то, что этот штамм способен влиять на засухоустойчивость растений посредством праймирования функции защитных генов аналогично тому, как это происходит при применении экзогенного ГАМК (Abd El-Daim et al., 2019). Вероятно, при стрессе вызванное бактериальной инокуляцией накопление ГАМК в тканях растений способствует повышению их устойчивости, обеспечивая формирование критического звена в каскаде реакций от восприятия сигнала стресса до последовательных физиологических ответов. Это свидетельствует в пользу важной роли этого метаболита в индуцированной *Bacillus* spp. устойчивости растений к недостатку воды, что, безусловно, заслуживает пристального внимания и дальнейших исследований.

Засуха оказывает негативное влияние на все этапы метаболизма растений, что в целом приводит к снижению продуктивности и ухудшению качества урожая культурных растений, в том числе пшеницы. Для яровой пшеницы оптимальным температурным диапазоном, благоприятным для ее роста и развития, считается 20–25 °С. В засушливые годы, например, лето 2010 г. или 2023 г., температура воздуха часто достигала 32–35 °С, а в пик аномальной жары приближалась к 40 °С, что привело к существенным потерям урожая. Многочисленные исследования показали, что ризосферные бактерии, в том числе эндобактерии, вносят важный вклад в снижение негативного влияния дефицита влаги на растения пшеницы. Например, обработка растений пшеницы *B. safensis* W10 и *Ochrobactrum pseudogregnonense* IP8 оказывала стимулирующее влияние на рост и защитное действие в условиях засухи. Это проявлялось в увеличении массы корней, побегов и урожайности зерна у шести различных сортов пшеницы. Аналогичные результаты были получены при использовании других штаммов PGP-бактерий, таких как *Pantoea alhagi*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rh. phaseoli*, *Mesorhizobium ciceri*, *Azospirillum*

brasiliense и *A. lipoferum*, на пшенице, подвергавшейся засухе в различные фазы развития, включая период цветения. Засухоустойчивость является комплексным признаком, обусловленным функционированием множества взаимосвязанных механизмов. Очевидно, что PGP-бактерии вовлекаются в тонкую настройку реализации этих механизмов, способствуя развитию засухоустойчивости у растений. Раскрытие механизмов действия PGP-бактерий играет ключевую роль в определении наиболее эффективных путей их применения для максимального снижения повреждающего действия засухи на растения.

1.3. Факторы эффективного взаимодействия растений с PGP-бактериями в условиях абиотических стрессов

Эффективность PGP-бактерий *Bacillus* spp. в практическом применении может значительно варьировать в зависимости от множества факторов: (i) условий окружающей среды (температура, влажность, pH и др.), способных модифицировать активность и биологические свойства бактериальных инокулянтов; (ii) генетических особенностей растений-хозяев (взаимодействие *Bacillus* spp. с растениями носит высокоспецифичный характер и во многом определяется генетическими особенностями как бактерий, так и растений); (iii) эколого-географического происхождения (адаптация растений к местным условиям может влиять на их отклик на бактериальную инокуляцию) и сортовых характеристик (различия между сортами одного вида по морфофизиологическим и биохимическим признакам обуславливают неоднородность ответных реакций на бактериальные штаммы); (iv) свойств бактериальных штаммов, которые могут существенно различаться по своим антагонистическим, ростстимулирующим и другим полезным характеристикам (Mađru et al., 2013; Volis et al., 2015; Aldesuquy, Ghanem, 2015; Salem et al., 2018; Курамшина и др., 2019; Пусенкова и др., 2020; Маркова и др., 2023; Kolesnikov et al., 2023; Garipova et al., 2024). Таким образом, эффективность применения *Bacillus* spp. в качестве биопрепаратов определяется комплексным влиянием средовых, генетических и сортовых факторов. Учет этих особенностей позволит повысить результативность использования бактериальных агентов в сельскохозяйственной практике.

1.3.1. Генотипическая и экотипическая специфичность действия

Использование бактерий рода *Bacillus* для повышения урожайности сельскохозяйственных культур ограничивается вариативностью результатов, полученных в лабораторных, тепличных и полевых условиях (Salem et al., 2018; Miljakovic et al., 2020). Фактически, при повторном применении (инокуляции растений и почвы) только у 1–2% RGP-бактерий наблюдается положительное влияние на рост растений, сопоставимое с результатами лабораторных исследований. Анализ многолетних данных об эффективности коммерческого биопрепарата Фитоспорин-М на основе *B. subtilis* 26Д (ООО НВП «БашИнком», г. Уфа) на яровой пшенице в полевых условиях показал более высокую отзывчивость на обработку семян этим биопрепаратом в засушливых регионах Курганской и Оренбургской областей (прибавка до 24 и 43% соответственно) (Пусенкова и др., 2020). Было выявлено, что эффективность Фитоспорина-М зависит от взаимодействия с различными генотипами пшеницы, их устойчивостью к засухе и принадлежностью к экотипам. Наибольшая эффективность Фитоспорина-М наблюдалась в засушливых условиях на сортах яровой пшеницы степного экотипа (Пусенкова и др., 2020). Другие исследования также показали, что реакция пшеницы на инокуляцию RGP-бактериями, продуцирующими АЦК-деаминазу, в нормальных условиях и при засухе зависела от генотипа растения (Singh et al., 2022; Kaur et al., 2023). Выявленные различия могут быть связаны либо с уникальным составом корневых экссудатов определенных генотипов пшеницы, либо с другими особенностями, влияющими на способность растений поддерживать высокую численность бактерий-продуцентов АЦК-деаминазы в ризосфере, что, безусловно, требует дальнейшего изучения. Очевидно, выявление особенностей взаимодействия между штаммами *Bacillus* spp. и различными генотипами и экотипами пшеницы имеет важное значение для разработки инновационных эффективных стратегий отбора, разработки и применения бактериальных препаратов для улучшения устойчивости растений к абиотическим стрессам.

Успешное применение *Bacillus* spp. в полевых условиях во многом также зависит от взаимодействия между растениями и бактериями, которое может быть ограничено недостаточной колонизацией ризосферы (Miljakovic et al., 2020). Бактериям рода *Bacillus*

требуется 24 ч для образования биопленки, способствующей колонизации корней и продлевающей благотворное влияние штаммов *Bacillus* spp. на почву. Однако колонизация корней местными (аборигенными) штаммами бацилл может быть более эффективна, чем лабораторными или коммерческими. Необходимо понимать, как *Bacillus* spp. регулируют рост и развитие растений, учитывая многочисленные факторы, влияющие на их эффективность. Дальнейшие исследования в этом направлении с использованием современных методов исследований позволят пролить свет на глубинные механизмы, лежащие в основе эффективных растительно-микробных взаимодействий.

Недавно, рядом авторов (Zhao et al., 2023; Ferrante et al., 2024) был проведен мета-анализ данных о реакции растений на инокуляцию PGP-бактериями. Так, собрав данные из 57 исследований по инокуляции PGP-бактериями, включая 2 387 парных наблюдений за морфологическими, физиологическими и биохимическими параметрами в условиях засухи и хорошего полива Zhao с соавт. (2023) сравнили влияние PGP-бактерий на продуктивность растений в разных группах контроля и обработок. Результаты демонстрируют, что инокуляция PGP-бактериями способствует восстановлению физиологических параметров растений после засухи до уровня, близкого к оптимальным условиям увлажнения. При этом растения с C4-типом фотосинтеза проявляют более выраженную восстановительную способность по сравнению с C3-растениями. Эффективность PGP-бактерий максимальна при умеренном дефиците влаги (чем в оптимальных по увлажненности условиях), что подтверждается значительным увеличением биомассы, усилением фотосинтеза и подавлением оксидативного повреждения. Интенсивность ответа на инокуляцию коррелирует с фотосинтетическим типом: C4-растения демонстрируют более выраженную стимуляцию стресс-устойчивости под действием PGP-бактерий. Кроме того, выявлена таксон-специфичность воздействия: штаммы PGP-бактерий, принадлежащие к различным филогенетическим группам (например, *Bacillales*, *Pseudomonadales*) и обладающие уникальными функциональными признаками (синтез АСС-деаминазы, продукция сидерофоров), модулируют засухоустойчивость через дифференциальную активацию защитных путей.

Транскриптомный анализ генома штамма *B. amyloliquefaciens* выявил множество генов, вовлеченных в обеспечение приживания бактерий в ризосфере и контроль полезных

для растений признаков, включая использование полисахаридов растений, подвижность клеток и хемотаксис, вторичный синтез антибиотиков и кластеры генов, ответственных за стимуляцию роста растений (Miljakovic et al., 2020). Показано, что экссудаты корней и семян служат индукторами генов, продукты которых участвуют в колонизации корней и взаимодействиях растений с PGP-бактериями *Bacillus* spp. (Zhang et al., 2015; Martins et al., 2018, Olanrewaju et al., 2019). Новые исследования взаимодействия растений и PGP-бактерий раскрывают способность растений формировать свою ризосферу и микробиом эндоризы (Abedinzadeh et al., 2019; Sudakov et al., 2025). Полученные к настоящему времени данные указывают на существование других, пока не известных механизмов *Bacillus*-опосредованной устойчивости растений к абиотическим стрессам, которые будут раскрыты с развитием технологий анализа функций генов (Abd El-Daim et al., 2019). Использование методов секвенирования следующего поколения (NGS, Next Generation Sequencing) в сочетании с протеомикой, метагеномикой, метаболомикой поможет уточнить детали этих взаимодействий и то, каким образом они влияют на рост и устойчивость растений к абиотическим стрессам.

Пшеница – культура с большим адаптивным потенциалом, который позволяет ей широко распространяться по всему земному шару. Значительные площади возделывания пшеницы находятся в России, где эта культура подразделяется на несколько экологических групп или экотипов (Жученко, 2001; 2010). В разных эколого-географических зонах России засуха оказывает максимальный негативный эффект на растения пшеницы в зависимости от времени года. Так, весенняя засуха характерна для Западной Сибири, когда растения пшеницы наиболее чувствительны в начальные этапы вегетации. В юго-восточных регионах европейской части России, в частности Поволжье, засуха наблюдается в летние месяцы. В результате адаптации к специфичным почвенно-климатическим условиям у пшеницы сформировались генетически адаптированные группы популяций (экотипы), обладающие уникальными механизмами устойчивости к дефициту влаги. Степные экотипы Волжского региона России развили глубокую корневую систему для доступа к грунтовым водам, тогда как лесостепные экотипы Западной Сибири оптимизированы для использования осадочной влаги. Так, в зависимости от времени наступления засухи в ходе естественного и искусственного отборов у пшеницы сформировались две различающиеся

по стратегии адаптации к засухе эколого-географические группы (или экотипы): лесостепной западносибирский (ЛСЗС) и степной волжский (СВ) (Жуковский, 1957). Растения ЛСЗС экотипа характеризуются постепенной всхожестью и длительной фазой кущения, однако в то же время у них наблюдается быстрое развитие корневой системы. Напротив, сорта СВ экотипа характеризуются интенсивным ростом в начале вегетационного периода за счет использования влаги, запасенной в почве с весеннего периода, и, следовательно, в условиях летней засухи сорта этого экотипа характеризуются хорошо разветвленной сетью корневой системы, что способствует росту растений и формированию хорошего урожая в этих условиях. Как уже упоминалось выше, на практике эффективность одного и того же штамма PGP-бактерий может варьироваться в зависимости от нескольких факторов, таких как виды растений, их экологическое и географическое происхождение, а также сортовые характеристики (Madry et al., 2013; Volis et al., 2015; Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Пусенкова и др., 2020; Маркова и др., 2023; Kolesnikov et al., 2023; Garipova et al., 2024). Изучение специфических особенностей реализации защитных механизмов от засухи под влиянием *B. subtilis* у разных экотипов пшеницы с разными стратегиями адаптации к дефициту воды имеет большую актуальность. Это позволит выявить механизмы, с помощью которых повышается засухоустойчивость определенных экотипов при инокуляции PGP-бактериями, в частности эндофитными *B. subtilis*, что поможет раскрыть их генетический потенциал и повысить урожайность пшеницы, выращиваемой в различных эколого-географических регионах по всему миру.

1.3.2. Стресс-толерантные штаммы PGP-бактерий и их роль в устойчивости растений *in planta*

Особое внимание уделяется выделению новых штаммов PGP-бактерий *Bacillus* spp., обладающих толерантностью к разным агрессивным факторам среды (засуха, засоление, тяжелые металлы, пестициды и т.д.) из ризосферы растений, обитающих в условиях воздействия этих стресс-факторов. Это обусловлено тем, что от роста и выживания бактерий в таких агрессивных (стрессовых) условиях зависит их способность смягчать повреждающее действие этих стрессов на растения (Khan, Bano, 2019; Rashid et al., 2021). Недавние исследования Rashid с соавт. (2021) показали, что

засухотолерантные штаммы *B. licheniformis* MU8 и *B. megaterium* MU2, выделенные из ризосферы растений, произрастающих на засушливых и полузасушливых территориях, вызывают системную устойчивость растений-хозяев (пшеницы) к засухе. Из 90 изученных изолятов ризобактерий, 38 проявляли одно или несколько RGP-свойств, включая солюбилизацию Р, К и продукцию ЭПС. Однако только *B. licheniformis* MU8 и *B. megaterium* MU2 обладали наилучшим потенциалом для повышения засухоустойчивости растений, что выражалось в активности АЦК-деаминазы, продукции ИУК и антагонистической активности против фитопатогенов. Более того, при воздействии засухи (0,73 МПа) у MU2 выявили продукцию трех новых полипептидов с молекулярной массой 18 кДа, 30 кДа и 50 кДа (Rashid et al., 2021). Эти два отобранных толерантных к засухе штамма в условиях нормального полива и засухи увеличивали всхожесть семян на 11–46%, жизнеспособность проростков – на 11–151%, накопление сырой биомассы – на 35–192%, сухой биомассы – на 58–226%. Они также эффективно колонизировали корни растений и увеличивали относительное содержание воды, концентрацию фотосинтетических пигментов и осмолитов. В частности, после воздействия засухи выживаемость растений пшеницы, инокулированных *B. megaterium* MU2, повысилась благодаря увеличению относительного содержания воды (на 59%), хлорофиллов а, b и каротиноидов (260, 174 и 70 % соответственно), пролина (на 117%), белка (на 136%) и снижению образования МДА (на 57%) (Rashid et al., 2021). Таким образом, выделение и изучение устойчивых к стрессам штаммов RGP-бактерий из экстремальных местообитаний является перспективным направлением для разработки эффективных биопрепаратов для повышения продуктивности растений в условиях абиотических стрессов. Такие штаммы могут эффективно колонизировать растений и оказывать положительное влияние на их рост и развитие в стрессовых условиях.

1.3.3. Прогнозирование эффективности взаимодействия растений с RGP-бактериями в стрессовых условиях произрастания: роль геномного анализа

Современные исследования в области геномики открывают новые возможности для прогнозирования эффективности взаимодействия растений с RGP-бактериями в условиях стресса. Ключевую роль играет анализ геномов бактерий, позволяющий

идентифицировать гены, ответственные за адаптационные механизмы. В последние годы был секвенирован ряд геномов PGP-бактерий (Asaf et al., 2018; Yang et al., 2023a), что подтвердило наличие генетических детерминант, кодирующих такие ключевые свойства, как БАФ, ИУК, АЦК-дезаминаза и т.д. Более того, анализ геномов микроорганизмов также выявил существование большого числа генов, связанных с усвоением железа. Например, геном *Enterobacter* sp. 638 содержит девять ABC-транспортеров для сидерофорных комплексов в отличие от четырех в *E. coli* K12 (Taghavi et al., 2010). *Azoarcus* sp. BN72 имеет 22 гена рецептора железа TonB, что в два раза больше, чем у его свободноживущего почвенного собрата EbN1 (Krause et al., 2006). Эти данные свидетельствуют о том, что эндофитные бактерии хорошо приспособлены к выживанию в среде с низким содержанием железа и могут эффективно конкурировать за этот элемент с другими микроорганизмами, включая фитопатогены. В дополнение к вышеупомянутым полезным признакам растений, в геномах эндофитов был идентифицирован ряд генов, участвующих в чувстве кворума (QS, quorum sensing). Например, в геноме *Serratia proteamaculans* 568 присутствуют 24 гена LuxR QS. У эндофитного штамма *S. plymuthica* G3 QS контролирует важные признаки, связанные с колонизацией, такие как подвижность и образование биопленки (Liu et al., 2011). Интересно, что у некоторых свободноживущих *Serratia* spp. эти признаки не зависят от QS, что позволяет предположить, что точная роль QS зависит от образа жизни бактерии. Дальнейший анализ генома выявил гены, которые могут быть важны для эндофитного образа жизни. Например, геном *K. pneumoniae* Kp342 содержит гены СОД, САТ, пероксидаз и редуктаз, которые участвуют в защите бактериальных клеток от АФК растений (Fouts et al., 2008). Кроме того, анализ генома выявил способность Kp342 метаболизировать широкий спектр растительных сахаров, углеводов и гемицеллюлозных субстратов. Сравнение генома Kp342 с клиническим изолятом MGH 78578 выявило существенное различие в их метаболизме, прикреплении к поверхности и секреции. Эти данные свидетельствуют о том, что штамм Kp342 хорошо приспособлен к избеганию защитных реакций растений и успешно закрепляться внутри растения.

Метагеномный анализ наиболее распространенных эндофитных бактерий риса подтвердил признаки, которые являются общими для эндофитов и, следовательно,

потенциально важны для их взаимодействия с растениями (Sessitsch et al., 2012). К ним относятся: 1) целый набор специализированных систем секреции, за исключением системы секреции III типа, которая не была высоко консервативной у эндофитов риса; 2) целлюлолитические и пектинолитические ферменты; 3) флагеллины, 4) ферменты, участвующие в деградации АФК; 5) рецепторы и транспортеры для поглощения железа; 6) системы QS; 7) метаболические пути деградации растительных соединений; 8) многочисленные свойства, способствующие росту растений и биоконтролю (АЦК-деаминазная активность, азотфиксация, выработка антимикробных соединений, фитогормонов и ЛОС).

Применение постгеномных подходов, таких как метапротеомика, метапротеогеномика и метатранскриптомика, может связать геномный потенциал с функцией и, следовательно, дать более глубокое представление о взаимодействиях растений и эндофитов. Эти инструменты имеют дело с глобальной экспрессией белков (метапротеомика) или мРНК (метатранскриптомика) из микробных сообществ. Метапротеогеномика связывает протеом и геном образца окружающей среды. Это позволяет идентифицировать больше белков (функций), чем только протеомика. Метапротеогеномный подход был использован для изучения микробных сообществ в филлосфере и ризосфере риса (Knief et al., 2011). Результаты показали, что, несмотря на присутствие генов *nifH* в обоих микроокружениях, динитрогеназа-редуктаза была идентифицирована исключительно в ризосфере. Если бы такой подход можно было применить для изучения эндосферы, можно было бы собрать более значимые данные о функциональности эндофитов.

Полногеномный анализ эндофитов можно использовать для классификации генов, связанных с антагонистической и PGP активностями, одновременно обеспечивая понимание их молекулярных и функциональных механизмов (Franco-Sierra et al., 2020). К настоящему времени у эндофитных бактерий идентифицировано множество генов, способствующих росту растений (Asaf et al., 2018; Singha et al., 2023), включая гены, кодирующие азотфиксацию, АЦК-деаминазную активность, продукцию сидерофоров, гормонов растений (ИУК, ацетил и 2,3-бутандиол) и синтез антибактериальных соединений (Iqbal et al., 2021). При полногеномном секвенировании *E. roggkampii* ED5

был идентифицирован ряд генов, связанных с PGP активностью: фиксацию N_2 , продукцию фитогормонов, АЦК-деаминазную активность, индукцию устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам и колонизацию корней растений (Guo et al., 2020). На основе данных полногеномного секвенирования у *B. subtilis* EA-CB0575 были предсказаны гены, участвующие в продукции индола, сидерофоров, липопептидов, ЛОС, нитрогеназы и др. (Franco-Sierra et al., 2020). Полногеномное секвенирование эндофитной *B. toyonensis* BAC3151 с последующим анализом вторичных метаболитов позволили выявить потенциальную роль этого штамма в разработке антимикробных препаратов для борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур (Lopes et al., 2017). Очевидно, что знания о полной последовательности геномов PGP-бактерий открывают новые возможности для всестороннего понимания их физиологических и функциональных свойств. Анализ геномных последовательностей позволяет идентифицировать гены, ответственные за стимуляцию роста растений, биоконтроль патогенов, колонизацию корневой системы, а также механизмы адаптации к абиотическим стрессам. Эти знания могут быть использованы для более точного прогнозирования и оптимизации применения PGP-бактерий в качестве биоудобрений и биопестицидов. Кроме того, геномный подход дает возможность выявлять новые, ранее неизвестные потенциальные свойства PGP-бактерий, связанные с продукцией биологически активных соединений, устойчивостью к стрессовым факторам, конкурентоспособностью и другими характеристиками, важными для эффективного взаимодействия с растениями-хозяевами. Таким образом, геномный анализ становится инструментом для всесторонней оценки и прогнозирования эффективности PGP-бактерий в условиях абиотических стрессов, а также для таргетированного отбора штаммов-кандидатов способных усилить стрессоустойчивость растений в конкретных агроэкологических условиях.

Заключение к главе 1

Суммирование данных литературы свидетельствует о важной роли PGP-бактерий рода *Bacillus* в усилении роста, продуктивности и стрессоустойчивости сельскохозяйственных культур в условиях абиотических стрессов. Активное развитие

исследований в этой области, рост числа коммерческих биопрепаратов свидетельствуют о высоком биотехнологическом потенциале данных микроорганизмов. Однако, научные публикации по исследованию сигнальных путей, запускаемых ими немногочисленны, а сведения по сходству и различиям их действия на растения с разными стратегиями адаптации к обезвоживанию и вовсе отсутствуют. Практически не изучены механизмы регуляции инокулированных PGP-бактериями защитных систем растений-хозяев с различными адаптивными стратегиями в условиях воздействия сочетаний стресс-факторов, что критично для прогнозирования их эффективности в реальных агроэкосистемах. Для более полного раскрытия и использования потенциала PGP-бактерий, будущие исследования должны быть сосредоточены на выявлении новых ключевых компонентов, ответственных за регулирование микробными биоинокулянтами адаптации и стресс-устойчивости растений с учетом видо-, сорто- и экотип-специфичности взаимодействий PGP-бактерий с растениями. Раскрытие механизмов ответных реакций растений на стресс в присутствии эндофитов (включая неизученные аспекты работы фотосинтетического аппарата, редокс-гомеостаза, фитогормональных перестроек и сигнальных путей), а также применения новых подходов, включая технологии NGS секвенирования для раскрытия информации о геномах PGP-бактерий и обоснования возможности прогнозирования эффективности их практического применения в экологически-ориентированных технологиях возделывания культур в экстремальных условиях меняющегося климата представляют безусловный интерес и нуждаются в углубленных комплексных исследованиях, чему и посвящена настоящая работа. Четкое понимание механизмов, лежащих в основе действия эндофитных PGP-бактерий чрезвычайно важно для полного использования их потенциала в качестве биоинокулянтов, способных нивелировать негативное влияние доминирующих стрессовых факторов среды, в большинстве случаев, вызывающих обезвоживание. Это особенно актуально в контексте перехода к климатически-устойчивому сельскому хозяйству, где сочетание биотехнологий и прецизионного подхода к выбору сортов и микробных консорциумов будет определять продовольственную безопасность.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований

В качестве объектов исследования использовали растения яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сортов Башкирская26, Экада70, Саратовская55, Салават Юлаев, Омская35), гороха (*Pisum sativum* L., сорт Памяти Хангильдина), фасоли (*Phaseolus vulgaris* L., сорт Золотистая) (Чишминский селекционный центр БНИИСХ УФИЦ РАН), редьку масличную (*Raphanus sativus* L., сорт Тамбовчанка), овес (*Avena sativa* L., сорт Яков) (ООО «ТрансОпт», г. Иваново), сахарную свеклу (*Beta vulgaris* L., сорт Кампай) (ООО «АгроСем-Инвест», г. Краснодар). Сорта пшеницы Экада70, Саратовская55 и Салават Юлаев, Омская35 использовались соответственно в качестве представителей агроэкологических групп (экотипов) степного волжского (СВ) (интенсивный рост в начале вегетации и замедленный во второй половине для избегания летней засухи) и лесостепного западносибирского (ЛСЗС) (замедленные темпы всхожести и роста в начале вегетации для избегания весенней засухи и быстрый рост во второй половине) (схема 2.1) (Жуковский, 1957; Цыганков, 2011; Мухитов, Самуилов, 2014).

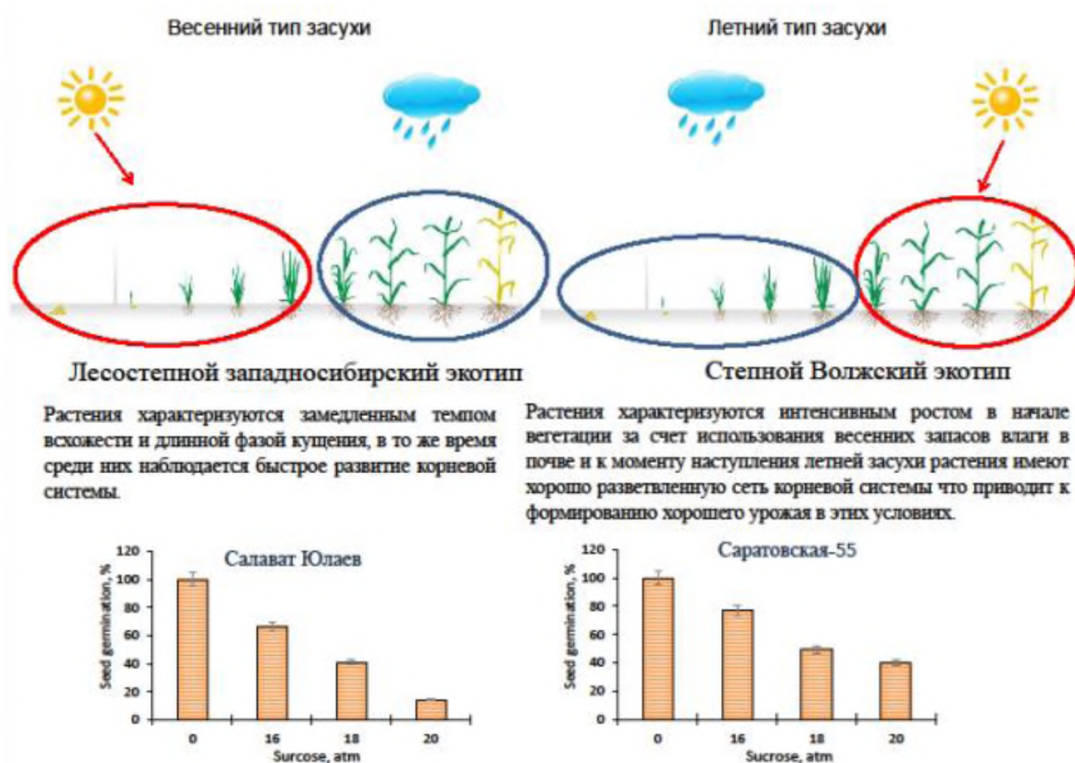


Схема 2.1. Стратегии адаптации к засухе у растений яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) лесостепного западносибирского и степного волжского агроэкологических групп

В экспериментах использовали эндофитные бактерии *B. subtilis*, а именно, штамм 10-4 (регистр. номер ВКПМ В-12988; номер кода доступа в NCBI DDBJ/ENA/GenBank JAVNHX0000000000, геномный проект ID: PRJNA1008864) и любезно предоставленный лабораторией растительно-микробных взаимодействий БНИИСХ УФИЦ РАН; штамм 26Д (референсный штамм, основа коммерческого биопрепарата Фитоспорин-М; регистр. № ВКПМ 016-02-2491-1, номер кода доступа в NCBI DDBJ/ENA/GenBank JBJBSD0000000000, геномный проект ID: JBJBSD01) любезно предоставлен микробиологической лабораторией ООО НВП «БашИнком» (г. Уфа). В полевых опытах использовали биопрепараты Фитоспорин-М (*B. subtilis* 26Д, ООО НВП «БашИнком», Россия) (П, 30 г/10 л воды), Витаплан (*B. subtilis* 2604D + *B. subtilis* 2605D, ЗАО «Агробиотехнология», Россия) (СП, 80 г/га), *B. subtilis* 26Д (10^8 КОЕ/мл) и *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл) (Ласточкина и др., 2018).

Тестовые фитопатогенные микроорганизмы: *Fusarium cilmorum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Bipolaris sorokiniana* (*Helmintosporium sativum*), *Alternaria alternata*, предоставлены из коллекции БНИИСХ УФИЦ РАН и ООО НВП «БашИнком» (г. Уфа); *Phytophthora infestans* любезно предоставлен Хютти А.В. (ВИЗР, г. Санкт-Петербург).

Питательные среды: картофельно-глюкозный агар (PDA, potato-dextrose agar) (HiMedia, Индия), жидкая среда Лурия-Бертани (LB, Luria-Bertani) (бактотриптон – 1,0 г, дрожжевой экстракт – 0,5 г, NaCl – 1,0 г, до 1 л), агаризованная среда LB включала 2% агара, селективная среда *Bacillus* ChromoSelect Agar («Sigma Aldrich», США), среда Эшби (Нетрусов и др., 2005), среда MOLP (Torral et al., 2018).

2.2. Идентификация *B. subtilis*, полногеномное секвенирование и анализ физико-химических свойств, ассоциированных с ростстимуляцией и антистрессовым эффектом на растения

2.2.1. Морфолого-культуральная идентификация

Бактериальный штамм *B. subtilis* 10-4 взят из коллекции микроорганизмов лаборатории растительно-микробных взаимодействий БНИИСХ УФИЦ РАН (Уфа, Россия), выделенный ранее из пахотного слоя засушливых почв Зауральской степи РБ ($52^{\circ} 36'N$ $58^{\circ}19'E$, Россия). Процедура выделения состояла из нескольких этапов.

Сначала, 10 г высушенной пробы почвы помещали в колбу с 90 мл стерильного 0,9% NaCl, перемешивали в шейкере (10 мин) и помещали в водяную баню при 70 °C на 30 мин. Далее суспензию почвы наносили на агаризованную питательную среду методом разбавления и инкубировали (37 °C, 3–4 суток) (Нетрусов и др., 2005). Видовую принадлежность изолята анализировали по морфолого-культуральным признакам (Скворцова, 1984; Хоулт и др., 1997; Нетрусов и др., 2005), а также с использованием методов молекулярной биологии.

2.2.2. Выделение бактериальной ДНК и молекулярно-генетическая идентификация по 16S рРНК

Молекулярно-генетическая идентификация штамма 10-4 осуществлялась по анализу 16S рРНК. ДНК бактерии выделяли согласно (Innis et al., 1990). Для наработки 16S рДНК использовали ПЦР с консервативными праймерами (5'→3'): 8f (agagtttgatcctggctcag), 926r (ccgtcaattcctttagttt), 1492r (ggttaccctgttacgactt) с режимами реакции: 1. 95 °C – 3 мин; 2. 35 циклов 95 °C – 30 сек, 57 °C – 30 сек, 72 °C – 1 мин 30 сек; 3. 72 °C – 5 мин. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе AE3000. Анализ результатов секвенирования переменных областей генов, кодирующих 16S рРНК и филогенетический анализ проводили с помощью баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и RDP-II (Ribosomal Database Project II) (<http://www.cme.msu.edu>). ПЦР проводили с использованием GeneAmp PCR System2700 (Catalog MBI Fermentas, 1998-1999; Pavlicek, 1999). Для идентификации видоспецифичности штамма 10-4 использовали праймеры для гена *secY* – *secYsubF* (5'-TTATATCACGGCTTCGAT-3') и *secYsubR* (5'-CGGTAGTTTCGTTTCACCA-3'), дающие продукт длиной 1050 п.н. (Palmisano et al., 2001).

2.2.3. Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование (WGS, whole-genome sequencing) штамма *B. subtilis* 10-4 проводили на автоматическом секвенаторе Miseq/NextSeq («Illumina», США) в НИЛ «Мультиомиксные технологии живых систем» Казанского федерального университета (г. Казань). Оценку качества выделенной ДНК проводили

визуализацией в 0,8% агарозном геле. Количественную оценку осуществляли на флуориметре Qubit 2.0 («Invitrogen», США). Фрагментацию 1 мкг геномной ДНК проводили ультразвуком с помощью прибора Covaris S220 («Covaris Inc.», США), ДНК-библиотеку подготавливали с использованием наборов NEBNext Ultra II («NEB», США) согласно инструкциям производителей. Оценка качества полученной библиотеки фрагментов ДНК проводили на чипах прибора 2100 Bioanalyzer («Agilent Technologies», США). Фильтрация прочтений от последовательностей адаптеров осуществлялась с помощью программного обеспечения fastp v. 0.23.2, сборка генома *de novo* – SPAdes v. 3.15.3, аннотация – Prokka v. 1.12.

2.2.4. Построение филогеномного дерева

Филогеномное дерево *B. subtilis* 10-4 построено на основе полногеномных данных (номер доступа в NCBI: JAVHKX010000000) с использованием сервера Type Strain Genome Server (TYGS) – биоинформатической платформы, доступной по адресу <https://tygs.dsmz.de> (Meier-Kolthoff, Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022), выведено с помощью FastMe 2.1.6.1 (Lefort et al., 2015) на основе расстояний GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny), рассчитанных по последовательностям генома. Длина ветвления масштабировалась по формуле d_5 на основе расстояний GBDP (Meier-Kolthoff et al., 2013). Статистическая достоверность порядка ветвления определялась с помощью pseudo-bootstrap GBDP-анализа на 100 повторов. Цифровые значения DDH и доверительные интервалы были рассчитаны с использованием рекомендуемых настроек GGDC 4.0 (Meier-Kolthoff et al., 2013; 2022). Дерево было укоренено в средней точке (Farris, 1972) и визуализировано с помощью PhyD3 (Kreft et al., 2017).

2.2.5. Оценка основных физико-химических и ростстимулирующих свойств

Оценку способности *B. subtilis* продуцировать ИУК оценивали с помощью реактива Сальковски (Malik, Sindhu, 2011) (фактическое измерение содержания индольных соединений, полученных из L-триптофана, которое экстраполируется на продукцию ИУК) и методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Shakirova et al., 2003), сидерофоров – с использованием чашек Петри с голубым агаром, содержащих краситель

Chrome Azurol S (CAS) (Schwyn et al., 1987), фосфат солибилизирующую активность – на среде Пиковской (Pikovskaya, 1948), азотфиксирующую способность с использованием безазотистой среды Эшби (Нетрусов и др., 2005) и методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (Умаров, 1986).

Основные физико-химические свойства (оксидазная, каталазная, β -галактозидазная, уреазная, фенилаланин-дезаминазная активности, реакция Фогеса-Проскауэра) определяли с помощью тест-систем (системы индикаторные бумажные (СИБ) для идентификации микроорганизмов, набор №2) («МикроГен», Россия). СИБ представляют собой диски или полоски хроматографической бумаги, содержащие определенные количества субстрата в сочетании с индикатором, стабилизированные пленкообразующим покрытием (поливиниловым спиртом). При положительной (“+”) реакции штамм изменял цвет субстрата в растворенном виде или цвет полоски в соответствии с таблицей учета результатов исследований, свидетельствуя об активности фермента или метаболическом преобразовании/накоплении тестируемого субстрата; в противном случае констатировали отрицательную реакцию (“–”) (https://rbpharm.ru/wp-content/uploads/2020/02/Instr_SIB-NABOR-2-463-598836.pdf).

2.2.6. Оценка *in vitro* антагонистической активности

Антагонистическую (фунгицидную) активность *B. subtilis* определяли методом лунок (колодцев) (Нетрусов и др., 2005). Жидкая суспензия бактерий, выращенная предварительно в течение 2–3 сут (37 °C), помещалась в лунку на чашки Петри с средой PDA, предварительно засеянных культурами тестовых фитопатогенов *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* и др.. После инкубации чашек при 28–30 °C в течение 10 дней оценивали ингибирование роста патогенов. Антагонистическая активность *B. subtilis* проявлялась в виде стерильных зон просветления в сплошном газоне тестовых патогенов.

2.2.7. Оценка стресс-толерантности *B. subtilis*

Толерантность *B. subtilis* к осмотическому стрессу (ПЭГ-6000), засолению (NaCl), кадмиевому (Cd) стрессу ($\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), гербицидам (Гб) (Sekator® Turbo,

д.в. амидосульфурон – 100 г/л, йодосульфурон-метил-натрий – 25 г/л, мефенпир-диэтил (антидот) – 250 г/л) оценивали путем наблюдения за ростом бактерий в жидкой и твердой 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 мМ), NaCl (0, 1, 1,5, 2,0%), Гб Sekator[®]Turbo (0, 0,25, 0,375, 0,5 мл/л). В стерилизованные колбы с жидкой LB средой (100 мл) с различными концентрациями ПЭГ-6000, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NaCl и Гб добавляли по 10 мкл свежей 24-сут бактериальной суспензии (10^9 КОЕ/мл) и инкубировали на шейкере в течение 24 ч (37 °С, 180 об/мин). Рост бактерий в жидкой LB среде оценивали путем измерения оптической плотности при 600 нм (SmartSpec[™] Plus, «Bio-Rad», США). Дополнительно проводили визуальное наблюдение роста бактерий в чашках с агаризованной LB средой, содержащей различные концентрации ПЭГ, ацетата Cd, NaCl и Гб; результаты фотодокументировали с помощью цифровой камеры PowerShot SX540 HS («Canon», США). По росту бактерий в присутствии ПЭГ-6000, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NaCl и Гб в течение 24 ч при 37 °С оценивали толерантность бактерии к засухе, кадмиевому стрессу, засолению и гербицидам, соответственно.

2.2.8. Оценка фитотоксичности для высших однодольных и двудольных растений

Фитотоксичность *B. subtilis* определяли согласно (ГОСТ 33777-2016). Семена овса (однодольные) и редьки масличной (двудольные) высевались (по 15 штук, 3 повтора) в чашки Петри, покрытые одним слоем фильтр. бумаги, увлажненных 2 мл суспензии *B. subtilis* в разных концентрациях (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ/мл) (опыт) и водой (контроль). Засеянные чашки помещали в термостат на 3 сут при 22 °С. У проросших семян измеряли длину главного корня с помощью линейки.

2.3. Функциональная аннотация и биоинформатический анализ полного генома *B. subtilis* с помощью веб-сервисов RAST, antiSMASH, CARD, KEEG

Функциональную аннотацию генома *B. subtilis* 10-4 выполняли с помощью Prokka версии v. 1.12. Дополнительный анализ аннотированных генов проводили с использованием веб-сервиса RAST (<https://rast.nmpdr.org>). Категории кластеров генов

10-4, ответственных за синтез вторичных метаболитов с антимикробными свойствами анализировали с помощью веб-сервиса antiSMASH bacterial версии v.7.1.0. (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>). Анализ устойчивости штамма 10-4 к противомикробным препаратам проводили с использованием комплексной базы данных по антибиотикорезистентности (CARD, Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (Alcock et al., 2023). Для анализа пула генов, ассоциированных с ростстимулирующими и антистрессовыми свойствами штамма 10-4 на растения и построения метаболических карт использовали базу данных KEGG Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/>).

2.4. Приготовление бактериального инокулюма и обработка семян

Для получения инокулюма клетки бактерий (штаммов *B. subtilis* 10-4 и 26Д) культивировали на среде LB при 37 °С в течение 24 ч (Lastochkina et al., 2021) до достижения концентрации 10^9 КОЕ/мл, и, в зависимости от эксперимента разбавляли стерильной водой до 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 КОЕ/мл. Концентрацию клеток определяли с помощью стандарта мутности 0.5McFarland Turbidity Standard и измерением оптической плотности при 600 нм (SmartSpec™ Plus, «Bio-Rad», США). В опытах по выявлению роли СК в эндофит-опосредованной засухоустойчивости пшеницы суспензии бактерий готовили в растворах с ингибитором биосинтеза СК – 1-аминобензотриазолом (АВТ).

Семена стерилизовали 96% этанолом в течение 60 сек, промывали 4–5 раз водой, подсушивали на воздухе и инокулировали путем замачивания в течение 1 ч в суспензиях клеток *B. subtilis* (в зависимости от эксперимента 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 или 10^8 КОЕ/мл) (опыт) или воде (контроль), далее суспензии клеток сливали и семена подсушивали на воздухе (Lastochkina et al., 2017; 2020a).

2.5. Постановка экспериментов с растениями и условия их выращивания

Для оценки морфофизиологических и биохимических параметров в лабораторных условиях инокулированные семена проращивали в чашках Петри или кюветах на фильтровальной бумаге, смоченной водой в течение 3-х сут (21–24 °С, 16 ч

фотопериод, 200 мкмоль м⁻² с⁻¹). Далее, в зависимости от целей работы, использовали разные постановки опытов:

Лабораторные эксперименты с проростками в ранние фазы онтогенеза. 3-сут или 4-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 мМ ацетата кадмия (Cd(CH₃COO)₂) (Cd стресс) или воду (норма) и через разные промежутки времени (1, 3, 7, 24, 48, 72 ч). В зафиксированном в жидком азоте растительном материале (корни, побеги, листья или целое растение в зависимости от анализа) оценивали физиолого-биохимические параметры.

Комбинацию обезвоживания с фузариозом моделировали следующим образом: 4-сут проростки (после 24 ч воздействия ПЭГ) заражали через корни путем внесения в стаканы с растворами ПЭГ суспензией конидий гриба *F. oxysporum* (10⁶ спор/мл). Развитие симптомов болезни, морфофизиологические и биохимические показатели оценивали у 14-сут проростков пшеницы (через 10 дней после заражения).

Вегетационные эксперименты в контролируемых условиях. 3-сут контрольные (неинокулированные) и опытные (инокулированные) проростки пшеницы (вместе с эндоспермом) высаживались в сосуды (25*25*25 см, объем 25 л) с почвогрунтом (глубина посева 4–5 см, расстояние между рядками 7–8 см, между растениями в ряду – 3 см). В каждом сосуде по 20 растений. В каждый сосуд предварительно раскладывали керамзит агротехнический Florizel слоем в 2–3 см (размер керамзита 10–20 мм) (ООО «Терра Мастер», г. Красноярск) и далее заполняли почвогрунтом (рН6,5, оптимальное соотношение NPK, влажность 65%) (ООО «Велторф», Великие Луки). Растения выращивали в контролируемых условиях (22–24 °С, 16 ч фотопериод, освещенность 320 мкмоль м⁻² с⁻¹, влажность воздуха 60%). В течение первых 17 сут все варианты поливали водопроводной водой 2 раза в неделю. Далее 17-сут вегетирующие растения (фаза 2–3 листа) разделяли на 2 группы: 1) растущие в нормальных условиях и при нормальном поливе; 2) подвергнутые Гб прессингу, для моделирования которого часть сосудов с растениями подвергалась однократному опрыскиванию раствором высокоселективного Гб Sekator® Turbo (д.в.

амидосульфурон – 100 г/л, йодосульфурон-метил-натрий – 25 г/л, мефенпир-диэтил (антидот) – 250 г/л) («Bayer», Германия)) с нормой расхода из расчета 75 мл/га, согласно рекомендациям производителя (<https://www.cropscience.bayer.ru/product/sekator-turbo>). Через 72 ч после опрыскивания Гб часть растений (необработанных и обработанных Гб) подвергали почвенной засухе (путем приостановки полива на 7 дней до достижения дефицита воды, на 60% ниже нормального полива контрольных вариантов) с последующим возобновлением полива (растения, подвергшиеся стрессу, оставляли на 4 дня (96 ч) для восстановления (репарации)) (Todorova et al., 2021). Таким образом, растения были разделены на варианты: 1) контрольные, растущие при нормальном поливе; 2) опрысканные Гб, растущие при нормальном поливе; 3) подвергнутые засухе; 4) опрысканные Гб и подвергнутые засухе; 5) инокулированные *B. subtilis* и растущие при нормальном поливе; 6) инокулированные *B. subtilis*, опрысканные Гб и растущие при нормальном поливе; 7) инокулированные *B. subtilis* и подвергнутые засухе; 8) инокулированные *B. subtilis*, опрысканные Гб и подвергнутые засухе. Все измерения фенологических, морфофизиологических и биохимических показателей растений в контролируемых вегетационных опытах производились в динамике в 4 точках: 1) до воздействия стресс-факторов (16-сут растения, фаза 2–3 листа); 2) через 96 ч воздействия засухи (24-сут растения); 3) через 168 ч воздействия засухи (27-сут растения); 4) через 96 ч восстановления (после возобновления нормального полива) (31-сут растения). Структуру урожая в экспериментах оценивали через 3 месяца (Ведров, Халипский, 2012).

Полевые опыты проводились в условиях Предуральской степной зоны РБ в опытном хозяйстве Чишминского селекционного центра УФИЦ РАН (54°35'38" N 55°23'42"E, Чишмы, Россия) на мелких делянках (5 м²) (Доспехов, 1979). Способ размещения делянок – рандомизированный, повторность – четырехкратная. Характеристика почвы опытного поля: чернозем выщелоченный (pH5,4), Нг – 5,6 мг-экв./100 г почвы, содержание гумуса 8,7%, фосфора и калия 23 и 29 мг на 100 г почвы, соответственно. Инокулированные непосредственно перед посевом семена засеивались в почву в сроки общепринятые для региона. Агрохимикаты в течение вегетации растений не применялись. Опыты на растениях сахарной свеклы проводились в ООО «Чишмы

агроинвест» (Чишмы, Россия) на мелких делянках (5 м²). Почва на опытном поле – чернозем выщелоченный (рН5,25), Нг – 5,50 мг-экв/100 г почвы, содержание гумуса – 8,69%, калия – 29,0 мг/100 г, фосфора – 23,0 мг/100 г. Появление всходов отмечали на 12–14-е сутки. Растения опрыскивали суспензиями биопрепаратов 2-кратно – в фазу 2–3 пар (16-е сутки) и 4–6 пар настоящих листьев (35-е сутки) (расход рабочей жидкости составлял 300 л/га). Всходы (12–14 день) были искусственно заражены, путем нанесения на листья по 100 мкл суспензии гриба *A. alternata* (10⁶ КОЕ/мл). Степень развития болезней оценивали визуально в течение вегетации по 5 балльной шкале (0 баллов – отсутствие симптомов, 1 балл – поражение от 1 до 25% площади листа, 2 балла – от 26 до 50%, 3 балла – от 51 до 75%, 4 балла – более 75%). Урожайность оценивали согласно (Доспехов, 1979; Ведров, Халипский, 2012).

2.6. Анализ прорастания и роста растений при воздействии абиотических стрессов

Для оценки способности *B. subtilis* придавать растениям устойчивость к засухе, засолению, Cd и Гб стрессу, был проведен анализ всхожести и прорастания инокулированных семян в чашках Петри с 5 мл растворов Гб Sekator[®] Turbo (0, 0,25, 0,375, 0,5 мл/л), ПЭГ-6000 (0, 4, 8 и 12%), NaCl (0, 1, 1,5, 2,0%), Cd(CH₃COO)₂ (0, 0,1, 0,5 и 1,0 mM) или воды (контроль) (по 15 семян на чашку, 3 повтора). Семена проращивали в темноте при температуре 22 °С, количество проросших и всхожих семян подсчитывали на 3 и 7 день, параметры роста проростков (длина корней и побегов, их сырая и сухая масса) измеряли на 7 день (Мокроносова, 1994).

Засухоустойчивость растений пшеницы оценивали дополнительно по способности семян прорасти в растворах сахарозы разных концентраций (16%, 18%, 20% или 1,32, 1,44 и 1,56 МПа, соответственно) и ПЭГ-6000 (3%, 6%, 9%, 12% или ≈0,11, ≈0,23 и ≈0,45 МПа, соответственно) (Удовенко, 1988; Щукин, Громов, 2008). Суть метода основана на определении прорастания семян в растворах осмотиков, имитирующих недостаток влаги. Способность семян прорасти в этих условиях отражает, с одной стороны, наследственное свойство прорасти при относительно меньшем количестве воды, с другой – наличие высокой сосущей силы,

обеспечивающей быстрое поглощение нужного количества воды. Опытные семена высевали в чашки Петри с фильтровальной бумагой, пропитанной 5 мл разных концентраций сахарозы и/или ПЭГ-6000 (тест) и водой (контроль) (100 семян на чашку, 3 повтора). Семена выращивали в течение 5 сут в темноте при 20–21 °С. Процент прорастания определяли по количеству семян, имеющих корешки, в том числе даже самой минимальной длины.

Ростовые параметры растений (длину надземной и подземной частей, накопление сырой и сухой биомассы) определяли классическими методами с использованием сантиметровой линейки и весов (Мокроносова, 1994). В каждом варианте оценивали 100 проростков в 3 повторах (n=100, 3 повтора).

2.7. Оценка способности *B. subtilis* колонизировать внутренние ткани растений (эндофитность)

Эндофитность (способность колонизировать внутренние органы и ткани растения) тестируемого штамма *B. subtilis* оценивали с использованием стерильных растений. Для этого, семена стерилизовали, инокулировали *B. subtilis* (10^5 КОЕ/мл) как описано выше (глава 2.3) и выращивали в стерильных условиях 3–5 сут. Затем, сегменты листьев и корней поверхностно-стерилизованных проростков, выращенных в стерильных условиях, погружали в 70% этанол на 5 мин. Этанол сливали, сегменты промывали стерильной водой 3 раза и подсушивали на воздухе в течение 10–15 мин. Поверхностно-стерилизованные сегменты раскладывали в чашки Петри с агаром *Bacillus ChromoSelect* («Sigma Aldrich», США) или агаризованную среду LB и выдерживали в течение 24 ч при 26 °С. Идентичность бактерий, выросших вокруг сегментов листьев и корней, с исходным штаммом, определяли с помощью RAPD-ПЦР анализа. Бактериальную ДНК выделяли при помощи лизирующего буфера (1% триптон×100, 1% твин-20, 1% хелекс100, 0,005% крезол красный, вода). Генетический полиморфизм бактерии оценивали по результатам RAPD-ПЦР тотальной ДНК с использованием праймеров AFK (5'-GCGTCCATTC-3'). Амплификацию проводили на оборудовании Tercik («ДНК-Технология», Россия), анализ и визуализацию продуктов RAPD анализа – с помощью горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле (SE-2, «Хеликон», Россия) (25 кВ,

1 ч) с окрашиванием бромистым этидием. Результаты регистрировали с помощью GelDoc XR («Bio-Rad», США).

Для контроля стерилизации поверхности, последний промывочный материал засекали в LB среду, и убеждались в отсутствии роста бактерий через 7 дней при 26 °С. Титр (КОЕ) эндофитов в тканях гидропонных проростков пшеницы (корней и побегов) определяли через 3–5 сут после посева. Поверхностно-стерилизованный растительный материал (корни, побеги) гомогенизировали в стерильных условиях, аликвоту распределяли по поверхности агаризованной LB среды и инкубировали при 26 °С в течение 24 ч. Количество бактерий (титр) подсчитывали после третьего разведения, результаты выражали в КОЕ/г сырой массы.

2.8. Определение содержания фитогормонов ИУК, АБК и ЦК

Содержание ИУК, АБК и ЦК в жидкой культуральной среде бактерий *B. subtilis* определяли с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) со специфическими кроличьими и вторичными анти-кроличьими антителами («Sigma-Aldrich», США) (Shakirova et al., 2003). Клетки *B. subtilis* культивировали в среде ЛБ при 180 об/мин, 37 °С в течение 24 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (5 000 об/мин, 10 мин) (BECKMAN COULTER Avanti J-E, «Beckman Coulter Inc.», США). В аликвоте бактериальной культуральной среды (супернатанта) объемом 5 мл определяли общее содержание иммунореактивных форм ЦК. Оставшийся водный остаток экстрагировали диэтиловым эфиром (C_2H_5)₂O для определения ИУК и АБК. Гормоны ИУК и АБК метилировали CH_3N_2 и после выпаривания сухой остаток растворяли в 80% C_2H_5OH . Количество АБК определяли в аликвоте растворенного остатка. Процедура очистки и экстракции ИУК и АБК, а также последовательность этапов иммуноанализа фитогормонов детально описаны ниже в методике их анализа в растениях.

Содержание эндогенных ИУК, АБК и ЦК определяли у 4-сут проростков пшеницы, подвергнутых воздействию 12% ПЭГ-6000 в течение 1, 3 и 7 ч методом ИФА как описано (Shakirova et al., 2003; 2004). Образец (10 проростков) растирали в жидком азоте и экстрагировали фитогормоны 80% C_2H_5OH в течение 16 ч при 4 °С. После центрифугирования (10 000 g, 10 мин) (BECKMAN COULTER Avanti J-E, «Beckman

Coulter Inc.», США) надосадочную жидкость выпаривали в потоке воздуха до водного остатка, в аликвоте которого определяли общее содержание производных зеатина (зеатин, его рибозид и нуклеотид) (Kudoyarova et al., 1990; Shakirova et al., 2004; Veselov et al., 2004). Надежность иммуноанализа была подтверждена тестами на разведение, хроматографическим исследованием распределения иммунореактивности и сравнением результатов иммуноанализа с физико-химическими анализами (ВЭЖХ-масс-спектрометрия) (Veselov et al., 1999; Arkhipova et al., 2007). Для оценки ИУК и АБК оставшийся водный остаток подкисляли HCl до pH2,5 и дважды разделяли (C₂H₅)₂O, переносили из органической фазы в 1% NaHCO₃ (pH7–8), повторно экстрагировали (C₂H₅)₂O, метилировали CH₂N₂ и иммуноанализировали с использованием антител к АБК и ИУК (Veselov et al., 1992; Shakirova et al., 2004). Надежность иммуноанализа на ИУК и АБК была обеспечена высокой специфичностью антител и эффективной предварительной очисткой гормонов в соответствии с модифицированной схемой разделения растворителя (Veselov et al., 1992).

2.9. Определение содержания СК методом ВЭЖХ

Содержание СК в культуральной жидкости B. subtilis оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) согласно (Shanmugam, Narayanasamy, 2008) с модификациями. Клетки *B. subtilis* культивировали в LB среде (180 об/мин, 37 °C, 24 ч), клетки осаждали центрифугированием (5 000 об/мин, 10 мин) (BECKMAN COULTER Avanti J-E, «Beckman Coulter Inc.», США). Полученный культуральный супернатант (5 мл) подкисляли 1М HCl до pH2 и дважды экстрагировали двойным объемом этилацетата. Экстракт упаривали до сухого остатка, растворяли в ацетонитриле и фильтровали через мембранный фильтр Chromafil Xtra PTFE-45/13 с диаметром пор 0,45 мкм («Machery-Nagel GmbH Co», Германия). Анализ проводили на хроматографе Waters Breeze («Waters», США) с детектированием на диодной матрице SPD-M20A при 305 нм. Разделение осуществляли на колонке Pursuit C18, 250×4,6 мм, 5 мкм («Agilent Technologies», США). В качестве подвижной фазы использовали элюент с составом 0,5% раствор H₃PO₄: ацетонитрил = 65: 35 с расходом 1,0 мл/мин. Анализируемый экстракт (20 мкл) вводили в хроматографическую систему с помощью

автосамплера Waters 2707 («Waters», США). С помощью программного обеспечения по градуировочной зависимости рассчитывали массовую концентрацию СК в образце. В качестве стандарта использовали чистую СК в ацетонитриле (0,1 г/л).

Содержание эндогенной СК в растениях определяли методом ВЭЖХ (Темердашев и др., 2011). Навеску растений (0,2–0,3 г) растирали в жидком азоте, заливали 20 мл дист. воды (90–100 °С) и инкубировали 30 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником при частом помешивании. После охлаждения без доступа света полученный экстракт фильтровали через мембранный фильтр Chromafil Xtra PTFE-45/13 с диаметром пор 0,45 мкм («Machery-Nagel GmbH Co», Германия). Анализ полученного экстракта проводили на хроматографе Waters Breeze («Waters», США) с детектированием на диодной матрице SPD-M20A при 305 нм, как описано выше.

Каждый анализ проводили в двух независимых экспериментах, каждый из которых проводился в трех биологических и пяти аналитических повторях.

2.10. Определение содержания фотосинтетических пигментов, площади листьев и морфометрических характеристик устьиц

Содержание фотосинтетических пигментов хлорофилла (Хл) а, Хл b и каротиноидов (Кар) в листьях определяли согласно (Мокроносова, 1994). Навеску листьев (0,05 г) гомогенизировали в 90% этаноле (с добавлением CaCO_3) и фильтровали. Оптическую плотность фильтрата определяли при 663 нм (Хл а), 646 нм (Хл b), 470 нм (Кар) (SmartSpec™ Plus spectrophotometer, «Bio-Rad», США).

Площадь листьев оценивали методом сканирования. Листья помещали в оптический сканер (HP laser MFP135w, «HP Inc.», США), покрывали сверху листом белой плотной бумаги и сканировали с разрешением 200 точек на дюйм в режиме черно-белого полутонового изображения (Lastochkina et al., 2023). Площадь листа, полученная в пикселях, была преобразована в см^2 (<http://csaa.ru/opredelenie-ploshhadi-listev-metodom-skanirovaniya/>) с использованием программы ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). В каждом варианте оценивали по три листа в трех повторях.

Устьица оценивали методом отпечатков (Salehinia et al., 2024). Поверхность листьев покрывали тонким слоем бесцветного лака и выдерживали 10 мин, после

чего пленку аккуратно снимали, переносили на предметное стекло и анализировали под микроскопом Biozero BZ-8100E («Keyence Co», Япония) и с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>).

2.11. Оценка фотохимической активности фотосинтетического аппарата с помощью импульсного флуориметра IMAGING-PAM-MAXI

Параметры фотохимической активности фотосинтетического аппарата растений оценивали с помощью импульсного флуориметра с функцией имаджинга (IMAGING-PAM-MAXI, «Heinz Walz», Германия) согласно рекомендациям производителя. Измерения проводились на молодых сформировавшихся листьях пшеницы после 30 мин адаптации к темноте (между 11:00 и 13:00 часами дня). Максимальный фотохимический квантовый выход (максимальная фотохимическая эффективность) (F_v/F_m), эффективный фотохимический квантовый выход ($Y(II)$), квантовый выход регулируемого светоиндуцированного нефотохимического тушения флуоресценции (регулируемая диссипация световой энергии) ($Y(NPQ)$) и квантовый выход нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции (нерегулируемая диссипация световой энергии) ($Y(NO)$) ФСII рассчитывали с использованием программного обеспечения PAM-MAXI флуориметра.

2.12. Определение параметров водного баланса и водоудерживающей способности растений

Интенсивность транспирации определяли весовым методом согласно (Sharipova et al., 2012). *Осмотический потенциал* клеточного сока определяли по точке замерзания с помощью микроосмометра («Camlab Ltd.», Великобритания) (Lubyanova et al., 2022). Побеги и корни растений фиксировали при температуре – 20 °C, после чего образцы размораживали и центрифугировали. Полученный клеточный сок использовали для анализа.

Относительное содержание воды (ОСВ) в листьях определяли сразу после отделения от растения как описано (Lubyanova et al., 2023). Для определения тургорной массы побеги выдерживали 24 ч в темноте при комнатной температуре в закрытых сосудах с дистиллированной водой (корни полностью погружены). Затем

образцы высушивали в открытых контейнерах с воздушной циркуляцией при 70 °С до постоянной сухой массы.

Водоудерживающую способность (ВС) листьев определяли согласно методике (Щукин, Громов, 2008). Три свежих листа 21-сут растений пшеницы срезали, взвешивали и выдерживали в течение 3–4 ч при 25 °С и относительной влажности 50%. Завядшие листья взвешивали и сушили при 105 °С до постоянного веса. Содержание влаги определяли в % от общего содержания воды. В каждом варианте оценивали по 3 листа в 4-х кратной повторности (n=3, 4 повтора).

2.13. Определение уровня развития окислительного стресса

Генерацию супероксид аниона (O_2^-) определяли путем измерения превращения адреналина в адренохром при 490 нм (Minibayeva et al., 2001). Образцы растений (0,5 г) инкубировали в 0,025 мМ $CaCl_2$ (10 мл) при 30 °С в течение 60 мин, а затем в среду добавляли 10^{-3} М адреналина (1 мл). После инкубации в течение 15 мин окисление адреналина в адренохром останавливали добавлением 0,05М HCl.

Генерацию пероксида водорода (H_2O_2) определяли с использованием ксиленолового оранжевого в присутствии Fe^{2+} при 560 нм (SmartSpec™ Plus, «Bio-Rad», США) согласно (Bindshedler et al., 2001). Образцы (корни) гомогенизировали (1: 5, масса/ объем) в 0,05М натрий-фосфатном буфере (pH6,2) и центрифугировали ($15\ 000\times g$, 15 мин) (5415R, «Eppendorf», Германия). Содержание H_2O_2 выражали в мкмоль/г сырой массы.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) (Мокроносова, 1994). Растения растирали в дист. воде, гомогенизировали в 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и центрифугировали ($10\ 000\times g$, 10 мин). Надосадочную жидкость смешивали с 0,5% тиобарбитуровой кислотой, приготовленной в 20% ТХУ, выдерживали на водяной бане (100 °С, 30 мин) и быстро охлаждали. Оптическую плотность измеряли при 532 нм и 600 нм (SmartSpec™ Plus, «Bio-Rad», США). Концентрацию МДА выражали в нмоль/г сырой массы.

Проницаемость клеточных мембран оценивали по экзоосмосу электролитов из интактных тканей целых проростков (Bari et al., 2019). Проростки промывали дист.

водой и инкубировали в стеклянных бюксах с 20 мл дист. воды при перемешивании в шейкере ES-20 («Biosan», Латвия) (130 об/мин, 30 °C, 2 ч). Электропроводность (S) инкубационной среды определяли с помощью портативного кондуктометра («HANNA Instruments», Италия). Результаты выражали в S/г сырой массы.

2.14. Определение активности антиоксидантных ферментов

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по его способности конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анионы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата (ФМС) (Beyer, Fridovich, 1987). Растительный материал гомогенизировали в 0.05М трис-НСl буфере (pH7,4), центрифугировали (13 400 об/мин, 10 мин). В аликвоте супернатанта измеряли активность СОД. После перемешивания в кювете 2 мл Реагента I (0,0062% ЭДТА, 0,05% НСТ, 0,0092% ФМС в ФБ (pH7,8)) с 0,1 мл Реагента II (0,0763% НАДН в трис-ЭДТА буфере (pH8,0)) и с 0,1 мл супернатанта устанавливали начальную экстинкцию полученного раствора на колориметре, а через 10 мин измеряли нарастание оптической плотности раствора. За ноль принимали экстинкцию холостой пробы, в которую вместо аликвоты образца приливали дист. воду. Для расчета активности СОД вначале определяли процент торможения реакции восстановления НСТ в опытной пробе за 1 мин (Т%). 50% ингибирования этой реакции соответствует одной условной единице активности СОД. Активность выражали в у.е./мл исследуемого образца.

Активность аскорбатпероксидазы (APX) (EC 1.11.1.11) оценивали путем мониторинга окисления аскорбата (AsA) при 290 нм (Verma et al., 2003). Реакционная смесь (2,93 мл) состояла из 50 мМ ФБ (pH7,0), 0,03 мл 17 мМ AsA, 0,03 мл ЭДТА, 0,01 мл экстракта. Реакцию запускали 0,03 мл 0,06% H₂O₂ и оценивали в течение 100 сек.

Активность глутатионредуктазы (GR) (EC 1.6.4.2) определяли путем последующего окисления никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) при 340 нм (коэффициент экстинкции 6,2 мМ/см) (Rao et al., 1996). Смесь для анализа объемом 1 мл содержала 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH7,8), 2 мМ ЭДТА, 0,2 мМ NADPH и растительный экстракт. Анализы начинали с добавления 0,5 мМ GSSG при 25 °C.

Активность измеряли после мониторинга окисления NADPH при 340 нм, активность выражали в нмоль/мин/мг белка.

Активность всех изученных ферментов была переведена в мг белка. Общий растворимый белок оценивали по методу Брэдфорда (Bradford, 1976) с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Для анализа использовался спектрофотометр UNICO 2800 («United Products® Instruments», США).

2.15. Определение содержания неферментативных антиоксидантов

Содержание общего восстановленного глутатиона (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) определяли в одном и том же растительном образце спектрофлуориметрическим методом, основанным на образовании флуоресцентного продукта о-фталальдегида («Sigma», Австралия) в зависимости от pH среды (Rao et al., 1996). Образцы (0,5 г) гомогенизировали в 4 мл смеси, содержащей 0,1М калий-фосфатного буфера (pH8,0) и 25% метафосфорной кислоты (3.75: 1, объем/объем) (Hissin, Hilf, 1976) и центрифугировали (8 000×g, 10 мин), супернатант центрифугировали повторно (13 000×g, 5 мин). Содержание GSH и GSSG определяли путем наблюдения кинетики интенсивности флуоресценции образовавшихся комплексов при 25 °С с помощью микропланшетного ридера EnSpire Model 2300 («PerkinElmer», США) при 420 нм (длина волны возбуждения 350 нм). Содержание GSH и GSSG выражали в мкмоль мг⁻¹ белка.

Содержание аскорбата (AsA) определяли методом титрования (Плешков, 1976). Образцы растений (10 г) гомогенизировали в 10 мл дист. воды и фильтровали. В коническую колбу с 20 мл фильтрата добавляли 1 мл 2% HCl, 0,5 мл 1% KI и 2 мл 0,5% крахмала, перемешивали и титровали 0,001 моль/л KIO₃ до получения стабильного окрашивания в синий цвет. Содержание AsA выражали в мг% (мг/100 г сырой массы).

2.16. Определение концентрации пролина

Экстракцию и определение концентрации свободного пролина проводили с помощью кислотного нингидринового реактива (Bates, 1973, Калинкина и др., 1985). Навеску растений (0,5 г) заливали кипящей дист. водой (2,5 мл), помещали в водяную баню (100° С, 30 мин) и охлаждали. Далее пробирки, содержащие по 1 мл экстракта,

нингидринового реактива и CH_3COOH инкубировали на водяной бане (100 °C, 60 мин) с последующим охлаждением и измерением оптической плотности при 522 нм (SmartSpec™ Plus, «Bio-Rad», США). Концентрацию пролина определяли с помощью предварительно полученной калибровочной кривой и выражали в мг/г сырой массы.

2.17. Определение содержания эндогенной ГАМК

Содержание эндогенной ГАМК определяли с помощью метода ВЭЖХ (Wang et al., 2022) с модификациями. Образцы растений (листья) (0,5 г) растирали в жидком азоте, гомогенизировали в 70% этаноле (2,5 мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и центрифугировали (10 000× g, 4 °C, 10 мин) (BECKMAN COULTER Avanti J-E, «Beckman Coulter Inc», США). Супернатант сливали в новую пробирку, а к осадку добавляли 2,5 мл 70% этанола, тщательно перемешивали с помощью вортекса Микроспин FV-2400 («BioSan», Латвия) и снова центрифугировали (10 000× g, 4 °C, 10 мин). Данную процедуру повторяли дважды. Образовавшиеся супернатанты (объемом 7,5 мл) фильтровали через шприцевой мембранный фильтр CHROMAFIL Xtra RTFE-45/13 с диаметром пор 0,45 мкм («Machery-Nagel GmbH Co», Германия) в стеклянные бюксы, упаривали до сухого остатка и растворяли в 1 мл растворителя (метанол: 0,3н уксусная кислота (УК), 80%:20%). Анализ образцов проводили на жидкостном хроматографе LicArt 62 («Лабконцепт», Россия) с детектором испарительного светорассеяния и колонки Nova Pak C18 (300x3,9 мм, 4 мкм) («Phenomenex», США). В качестве подвижной фазы применяли элюент (метанол:0,3н УК, 45%:55%). Скорость подачи подвижной фазы составляла 0,7 мл/мин, газа – 2 л/мин. 25 мкл анализируемых растворов (образцов) вводили в аналитическую петлю объемом 100 мкл и записывали хроматограмму. Содержание ГАМК рассчитывали с помощью градуировочного графика и программного обеспечения прибора. Для построения градуировочного графика использовали аналитический стандарт ГАМК («Sigma-Aldrich», США).

2.18. Оценка отложения и локализации лигнина и суберина в корнях

Накопление и локализацию лигнина и суберина в базальной части клеточных стенок корней проростков определяли с использованием окрашивания методами

световой и конфокальной микроскопии. Базальная зона выбрана не случайно, поскольку именно в зрелых тканях начинается активный синтез и отложение лигнина и суберина.

Определение локализации и содержания лигнина в клеточных стенках корней осуществляли по способности флороглюцина избирательно окрашивать лигнин в красно-фиолетовый цвет согласно методике (Фурст, 1979) с модификациями (Lastochkina et al., 2021). Делали продольные и поперечные срезы в базальной зоне корней с использованием криостата Leica CM1520 («Leica Biosystems», Германия) при -30°C . Для заливки использовали жидкость для заморозки образцов Tissue Freezing Medium («Leica Biosystems», Германия). Свежие срезы толщиной $60\text{ }\mu\text{m}$ помещали на предметное стекло в с 5% $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ на 3 мин, добавляли 3–4 капли 10% HCl и визуализировали с помощью флуоресцентного сканирующего микроскопа Biozero BZ-8100E («Keyence Co», Япония). Степень окраски оценивали по шкале, предложенной в работе (Sedlarova, Lebeda, 2001).

Сегменты базальной части корней фиксировали в реактиве Чемберлена, переносили в 30% этанол и промывали дист. водой. Сегменты корней заливали в 3% агарозе и нарезали поперечные срезы толщиной $45\text{ }\mu\text{m}$ на вибротоме («Leica VT 1200S», Германия) (Boerjan et al., 2003). Визуализацию проводили с помощью микроскопа Olympus IX83 («Olympus», Япония).

Для количественного определения содержания лигнина 100 мг тканей корня тщательно промывали горячей дист. водой, после центрифугирования нерастворимые частицы осаждали и промывали 96% этанолом. Полученный сухой остаток растворяли в течение 2,5 ч в растворе 2,5 мл HCl /этанола. Далее 10 мкл 20% флороглюцин- HCl смешивали с 1 мл предыдущего раствора (Maslennikova et al., 2023). После 30 мин инкубации регистрировали поглощение при 540 нм (UV-2800 Unico, «United Products&Instruments», США).

Для гистохимического определения локализации суберина осуществляли проводку поперечных срезов корней в спиртовых растворах возрастающей концентрации, затем в течение 5 мин окрашивали спиртовым раствором судана III, далее срезы выдерживали в растворах убывающей концентрации этанола, споласкивали дист. водой и заключали в 50% глицерин (Фурст, 1979). Суберинезированные ткани окрашивались растворенным с 70% этаноле суданом III в темно-оранжевые тона,

фотографии получены при помощи флуоресцентного микроскопа Biozero BZ-8100E («Keyence Co», Япония) в видимой области спектра.

Для визуальной оценки лигнина и суберина использовали водный раствор берберина гемисульфата (0,1% вес/объем). Для усиления интенсивности флуоресценции срезы докрашивали в течение 15 мин толуидиновым синим (0,1% вес/объем) в 0.1М ФБ (pH5,6). Окрашенные срезы заключали в смесь 0,1% FeCl₃/50% глицерина и просматривали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 3000 («Olympus», Япония) при увеличении x20 с использованием возбуждающего света с длиной волны 488 нм и диапазона поглощения 520–620 нм. Визуальный эффект был количественно пересчитан в % с использованием программного обеспечения для обработки изображений ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>).

2.19. Выделение РНК и определение относительного уровня экспрессии генов защитных белков

Выделение тотальной РНК из листьев растений проводили с использованием реагента TRIzol («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Очистка РНК от сопутствующей ДНК была осуществлена с помощью фермента ДНКазы («Синтол», Россия). кДНК была синтезирована с помощью коммерческого набора («Синтол», Россия). ПЦР проводили с использованием праймеров 5' CACCTATTAGCTAGCTAATCAT 3' (F) и 5' GTACGTACTGTACGTAACATATGTA 3' (R) для последовательностей гена *TaPR-1* (Lu et al., 2011). Электрофорез для разделения продуктов ПЦР проводили в 7% ПААГ с использованием MiniProteanII ElectrophoreticCtII («Bio-Rad», США). Визуализацию продуктов амплификации проводили с использованием Gel Doc XR («Bio-Rad», США) после окрашивания геля в течение 10 мин в растворе бромистого этидия (0,5 г/л). Полученные данные были обработаны с использованием компьютерных программ LabWorks 4.6 и TotalLab версии 2.01 («UVP Inc», США). Для определения размера ампликонов использовали ДНК-маркер GeneRuler™ 100 п.н. ДНК Ladder («Fermentas», Латвия). Данные о транскрипционной активности гена *TaPR-1* были нормализованы по отношению к гену *RLI* и представлены в условных единицах (y.e.). (Gimenez et al., 2011).

2.20. Анализ элементов структуры урожая, биохимического состава и качества зерна

Элементы структуры урожая пшеницы (длину колосьев, количество зерен на колосе, массу 1000 зерен, урожайность зерна) оценивали согласно (Доспехов, 1979; Ведров, Халипский, 2012).

Массовую долю аминокислот в зерне определяли путем разложения образцов кислотным и щелочным гидролизом с переводом аминокислот в свободные формы с получением фенилтиокарбамильных производных. Их дальнейшее разделение и количественное определение проводили методом капиллярного электрофореза на приборе Капель-205 («Люмекс-Маркетинг», Россия) по ГОСТ 55569-2013.

Массовую долю углеводов (фруктозы, глюкозы, сахарозы) в зерне определяли с использованием предварительно подготовленной пробы с последующим разделением, идентификацией и определением компонентов методом капиллярного электрофореза. Измельченный и гомогенизированный образец центрифугировали (5 000 об/мин, 5 мин) и анализировали с помощью прибора Капель-205 («Люмекс-Маркетинг», Россия) в соответствии с сертифицированным методом (Методика М 04-92-2020).

Массовую долю сырого жира в зерне определяли путем экстрагирования жира петролейным эфиром в аппарате Сокслета. Затем растворитель удаляли, а отбитый остаток взвешивали в соответствии с ГОСТ 13496.15-2016.

Содержание макроэлементов N, P и K оценивали, соответственно, по методикам ГОСТ 13496.4-93 (1993), ГОСТ 26657-97 (1997) и ГОСТ 30504-97 (1997).

Содержание микроэлементов Mn, Cu, Zn, Fe и Co определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ГОСТ 56372-2015). Образцы зерна (1 г) помещали в муфельную печь на 20 ч при 550 °С. Полученную золу инкубировали с 0.1M HNO₃ (50 мл) и фильтровали. В отфильтрованных экстрактах определяли содержание микроэлементов с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра Shimadzu AA-6300 («Shimadzu», Япония) с электротермическим распылителем GFA EX-7. Содержание макро- и микроэлементов выражали в % и мг/кг сухой массы, соответственно.

Влажность, содержание белка, количество и качество клейковины, стекловидность, число падения зерна пшеницы оценивали при помощи инфракрасного анализатора ИнфраЛЮМ ФТ-12 («Люмэкс», Россия).

2.21. Статистическая обработка результатов

Все эксперименты проводили в трех биологических и трех-четыре-х аналитических повторях. Статистическую обработку выполняли с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0 («StatSoft Inc.», США). На рисунках и в таблицах представлены средние значения (M) и их стандартные ошибки ($\pm SE$) при $p \leq 0,05$. Статистически значимые различия между средними значениями оценивались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Тьюки ($p < 0.05$).

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 *Bacillus subtilis* 10-4, который был взят из коллекции микроорганизмов лаборатории растительно-микробных взаимодействий БНИИСХ УФИЦ РАН, и проведена комплексная оценка его влияния при инокуляции семян на фенотип, основные физиолого-биохимические параметры роста и устойчивости агрокультур в норме и при действии разных по природе стрессов и их комбинаций. Выявлено, что *B. subtilis* 10-4 ингибирует *in vitro* рост фитопатогенов-возбудителей экономически опасных заболеваний растений, включая *Fusarium* spp., *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans* (глава 3.1), обладает комплексом свойств ростстимулирующих бактерий (глава 3.2); нефитотоксичен в отношении однодольных и двудольных растений (главы 3.3, 3.4); колонизирует внутренние ткани растений (эндофит) (глава 3.5); толерантен к засухе, засолению, тяжелым металлам, пестицидам (глава 3.6), оказывает *in planta* ростстимулирующий и протекторный эффекты на однодольные (пшеница) и двудольные (сахарная свекла, картофель, горох, фасоль) растения на клеточном и организменном уровнях при засолении, Cd стрессе, дефиците влаги, комбинации дефицита влаги с поражением возбудителем фузариоза и гербицидным стрессом, инфицированием возбудителем альтернариоза (главы 3.4, 3.7). Выявлены вариации в отзывчивости растений на инокуляцию клетками *B. subtilis* 10-4 (глава 3.7), предполагающие наличие множественных систем регуляции взаимодействия растений с эндофитными PGP-бактериями и необходимость детального изучения явления специфичности их действия на растения пшеницы с различными адаптивными стратегиями при дефиците влаги.

3.1. Морфолого-культуральные свойства, идентификация и антагонистическая активность *B. subtilis* 10-4

В почвах каждой климатической зоны имеются аборигенные виды *Bacillus*, адаптированные к местным условиям. Перспективным для использования в сельском

хозяйстве представляется применение аборигенных штаммов *B. subtilis* (Грошева, 2009), выделенных из почв или растений, подвергнутых стрессовым условиям. К примеру, штамм *Bacillus* spp., выделенный из растений пустыни, придавал устойчивость растениям пшеницы при их выращивании на других территориях, подвергнутых засухе (Rashid et al., 2020). В результате скрининга свободноживущих бактерий *Bacillus* spp. из образцов почв различных почвенно-климатических зон РБ в лаборатории растительно-микробных взаимодействий БНИИСХ УФИЦ РАН по признаку наличия высокой фунгицидной активности против фитопатогенного тест-гриба *F. culmorum* был отобран перспективный изолят 10-4 (рис. S1), выделенный из засушливых пахотных почв Зауральской степи РБ (52°36'N 58°19'E). По морфолого-культуральным свойствам отнесен к *B. subtilis*, грамположительный, палочковидный, аэробный и подвижный, образует споры. На агаризованной среде (PDA, LB) колонии круглой формы с волнистым краем, бежево-белого цвета (при старении более бежевые), с гладкой поверхностью, шероховатой в центре. Рост по штриху сплошной, умеренный, край волнистый, цвет бежево-белый, полуслизистый, гладкий (рис. 3.1). Клетки имеют форму правильных палочек с закругленными концами и монополярным перитрихальным расположением жгутиков. Размер клеток составляет 1,5–2,0×0,8–1,0 мкм. Рост в жидкой и полужидкой питательной среде микроаэрофильный, метаболизм дыхательный.

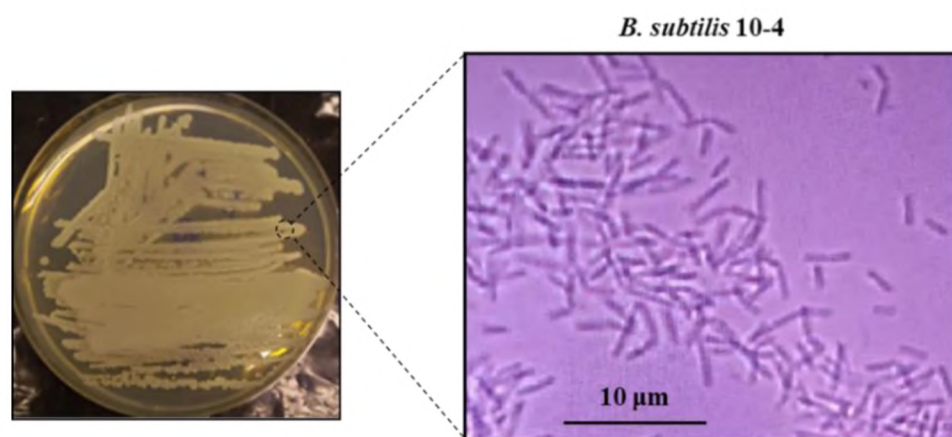


Рис. 3.1. Репрезентативные фотографии роста *B. subtilis* 10-4 на агаризованной среде LB (24 ч при 37 °C) и визуализация клеток под микроскопом Biozero BZ-8100E («Keyence Co.», Япония)

Молекулярно-генетическая идентификация. Первичный анализ результатов секвенирования переменных участков 16S рРНК с использованием базы данных GenBank и RDP-II показал, что изолят 10-4 принадлежит к следующим

систематическим группам Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae, Bacillus, причем гомология с некоторыми видами рода *Bacillus* составляет 99%. Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank. На рисунке 3.2а представлены результаты обработки секвенсов при помощи компьютерной программы, находящейся на сайте RDB-II, предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев. Дальнейший анализ 16S рРНК по RDP-II базе показал гомологию с теми же видами бактерий. Для точной идентификации изолята 10-4 были использованы видоспецифические праймеры (Palmisano et al., 2001). Результаты ПЦР-анализа с использованием видоспецифических праймеров представлены на рисунке 3.2б. Нарботка фрагмента размером 1050 п.н. при использовании праймеров secYsubF – secYsubR свидетельствует о том, что исследуемый изолят 10-4 относится к виду *B. subtilis*. Таким образом, основываясь на результатах анализа секвенирования переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК (99%) (рис. 3.2а), а также ПЦР-анализа с использованием видоспецифичных праймеров (рис. 3.2б) исследуемый штамм 10-4 был идентифицирован как *B. subtilis*.

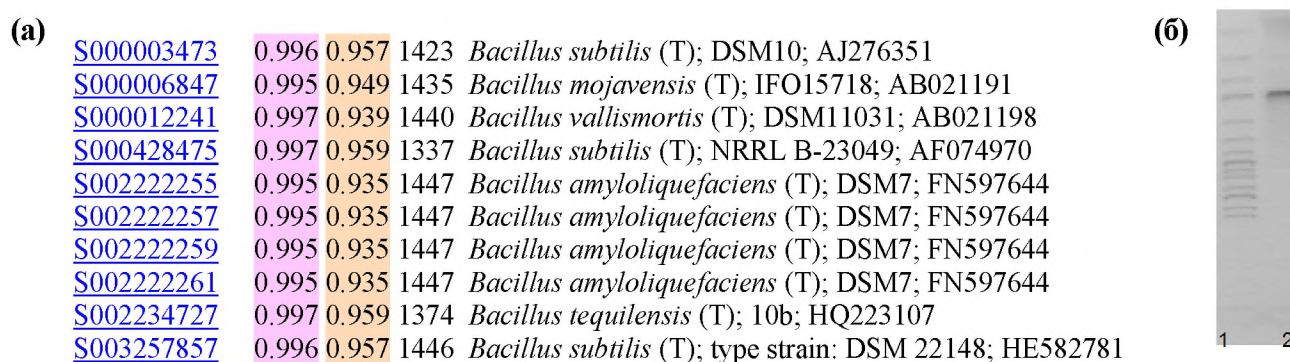


Рис. 3.2. Таксономическое положение *B. subtilis* 10-4 (а). 1 – Маркер 1kb DNA GeneRuler (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 п.н., снизу вверх), 2 – ПЦР-фрагмент при использовании праймеров secYsubF – secYsubR (б)

В дальнейшем, результаты полногеномного секвенирования штамма 10-4 (номер доступа в NCBI: JAVHKKX010000000, номер генома в GenBank/JGI: GCA_035825195.1) подтвердили его принадлежность к *B. subtilis* (100%) (глава 9.1). На рисунке 3.3 представлено филогеномное древо *B. subtilis* 10-4, построенное на основе данных полного генома и демонстрирующее его систематическое положение.

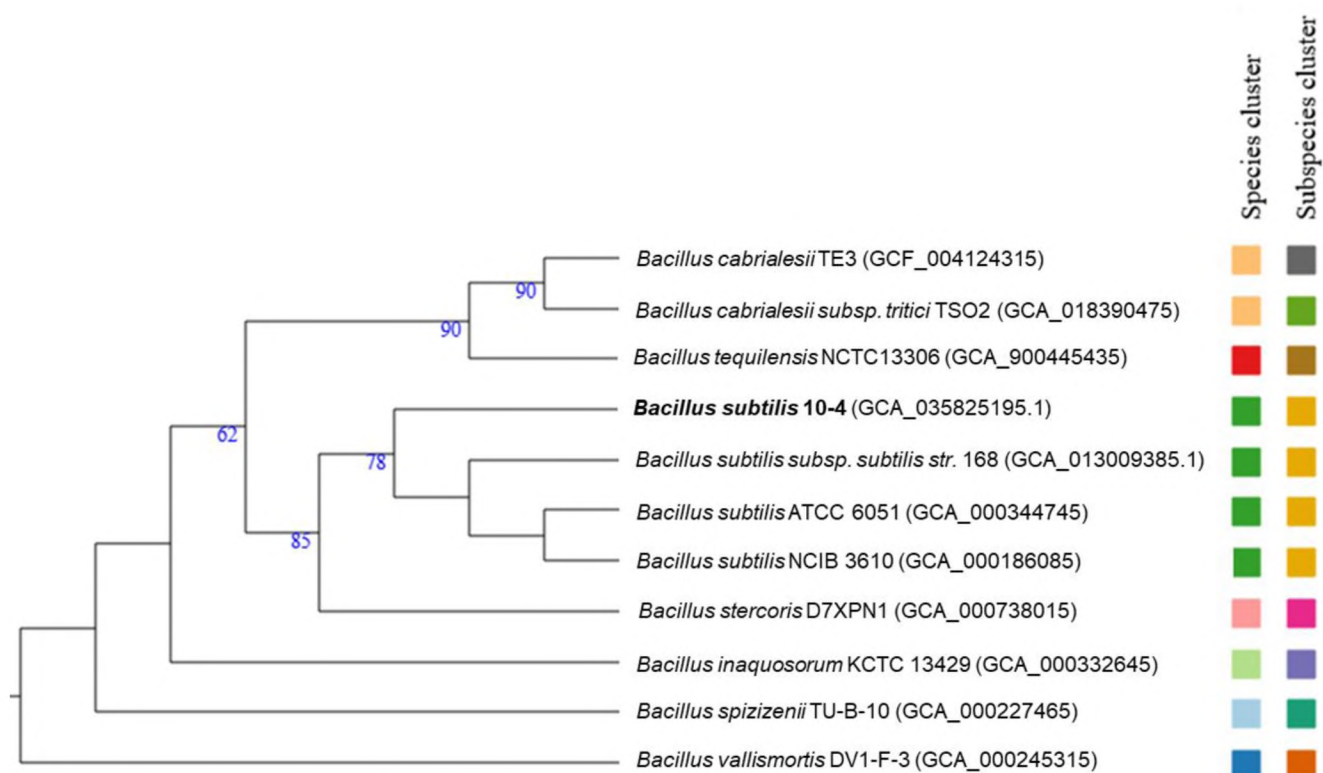


Рис. 3.3. Филогеномное дерево BLAST Distance Phylogeny (GBDP), показывающее положение *Bacillus subtilis* 10-4. Построено с использованием сервера TYGS, выведено с помощью FastMe 2.1.6.1 на основе расстояний GBDP, рассчитанных по последовательностям генома. Длина ветвления масштабируется по формуле d_5 на основе расстояний GBDP. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 60 %), определенная с помощью pseudo-bootstrap GBDP-анализа на 100 повторов, средняя поддержка ветвей 80,8%. В скобках указаны номера геномов в GenBank/JGI

Антагонистическая активность. Дальнейшие анализы показали, что *B. subtilis* 10-4 помимо *F. culmorum* также подавляет *in vitro* рост ряда других фитопатогенов – возбудителей экономически опасных заболеваний растений, включая *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana* (ранее известный как *Helminthosporium sativum*), *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans* (табл. 3.1, рис. S2–3).

Таблица 3.1 – Антагонистическая активность *B. subtilis* 10-4 по отношению к фитопатогенам – возбудителям болезней растений (26Д – референсный штамм, основа биопрепарата Фитоспорин-М)

<i>Bacillus subtilis</i>	Зона ингибирования роста, мм					
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Alternaria alternata</i>
10-4	33±0,5	19,5±0,4	3±0,2	18±0,1	22±0,9	15±0,5
26Д	21,5±0,3	13±0,2	1±0,2	15±0,5	21±0,8	17±0,7

Причем, зона ингибирования роста патогенов была достоверно выше и превосходила по показателям референсный штамм *B. subtilis* 26Д (табл. 3.1), что свидетельствует о его перспективности в качестве биоинокулянта для защиты растений. Действительно, *in planta* эксперименты с растениями подтвердили способность *B. subtilis* 10-4 к подавлению болезней сахарной свеклы (Ласточкина и др., 2018), пшеницы (рис. 3.18, глава 3.7) (Lastochkina et al., 2020b) и картофеля (Lastochkina et al., 2020; Pusenкова, Lastochkina, 2024), обусловленный синтезом бактериями низкомолекулярных метаболитов с антимикробными свойствами (рис. S4–5), включая липопептиды сурфактины с изоформами C13–C15 (рис. S6) (Lastochkina et al., 2021b), что согласуется с данными других авторов для референсного штамма 26Д (Cherepanova et al., 2021). Геномный анализ *B. subtilis* 10-4 позволил детектировать наличие генов, кодирующих синтез сурфактинов (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*, *nasB*, *zinU*, *yckB*, *ycxD*, *tcyA*, *ubiX*, *yclE*) (глава 9.2.3), которые рассматриваются как ключевые метаболиты, обуславливающие помимо биоконтроля и другие PGP-свойства, включая колонизацию корней и индукцию иммунитета растений. Сообщалось, что сурфактин участвует в латеральном расширении колоний, колонизации бактериями поверхностей растений (Stoll et al., 2021; Munakata et al., 2022) и ИСУ (Maksimov et al., 2020).

3.2. Ростстимулирующие и физико-химические свойства *B. subtilis* 10-4

Оценка ростстимулирующих свойств (PGP-traits). Выявлено, что *B. subtilis* 10-4, аналогично референсному штамму 26Д, продуцирует ИУК, сидерофоры и проявляет способность к фиксации атмосферного азота (табл. 3.2). Эти свойства, согласно литературным данным, вносят важный вклад в стимуляцию ростовых процессов растений (Duca et al., 2014; Benedetto et al., 2017; Tang et al., 2023; Rana et al., 2024). Тесты показали, что штамм 10-4 отрицателен по оксидазе и положителен по каталазе, не утилизирует галактозу и не образует индолы и сероводород, положителен по реакции Фогеса-Проскауэра и отрицателен по активности фенилаланиндезаминазы. Хотя по большинству изученных признаков штаммы 10-4 и 26Д были близки друг к другу, но выявлены различия в способности утилизировать инозитол и солибилизировать фосфаты (табл. 3.2). В частности, штамм 10-4 (в отличие от 26Д) не

проявлял фосфат-соллюбилизирующей активности на среде Пиковской. Данный результат согласуется с современными представлениями о том, что не все PGP-бактерии способны к соллюбилизации фосфатов на агаровой среде Пиковской с трикальцийфосфатом (Кадырова и др., 2022).

Таблица 3.2 – Некоторые ростстимулирующие и физико-химические свойства *B. subtilis* 10-4 (по сравнению с референсным штаммом 26Д)

Свойства	<i>Bacillus subtilis</i>	
	10-4	26Д
ИУК, мкг/л	$5,80 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$
Продукция сидерофоров, см	$1,20 \pm 0,1$	$1,18 \pm 0,08$
Соллюбилизация фосфатов, мг/л	–	+
Фиксация атмосферного азота, мкг N ₂ /мл/ч	$0,08 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,03$
Оксидазная активность	–	–
Каталазная активность	+	+
Утилизация инозитола	–	+
β-галактозидазная активность	–	–
Уреазная активность	+	+
Фенилаланин дезаминазная активность	–	–
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+

Примечание: “+” положительная реакция (активность детектируется тестом); “–” отрицательная реакция (активность отсутствует)

Продукция ауксинов. Ауксины – ключевые фитогормоны, регулирующие широкий спектр физиологических процессов растений от корнеобразования до плодоношения (включая деление, удлинение, дифференциацию клеток растений, прорастание семян, развитие корней и вегетативный рост) (Etesami, Glick, 2024). Среди разнообразных механизмов PGP-бактерий, продукция ауксинов, в частности индол-3-уксусной кислоты (ИУК), относится к ключевым факторам, стимулирующим рост и развитие растений, а также адаптацию к стрессам и колонизацию (Pandey et al., 2017; Кузьмина и др., 2022; Etesami, Glick, 2024). Многочисленные исследования показали, что около 80% PGP бактерий синтезируют ИУК, в значительной степени зависящее от предшественника L-триптофана, который считается основным субстратом для ее образования (Spaepen et al., 2007; Sessitsch et al., 2012; Tang et al., 2023). Интересно, что выработка ИУК более распространена среди эндофитных бактерий, чем среди эпифитных. К примеру, из 363 эпифитных и 373 эндофитных бактерий сои доля эндофитных бактерий, продуцирующих ИУК, составила 34%, а для эпифитов – 21% (Kuklinski-Sorbal et al., 2004). Из 25 изолятов эндофитов моркови 9 (36%) обладали

активностью ИУК от 2 до 15 мкг/мл (Благова и др., 2014). В наших экспериментах штамм *B. subtilis* 10-4 продуцировал 5,8 мкг/мл ИУК в присутствии предшественника L-триптофана (табл. 3.2), что согласуется с имеющимися в литературе сведениями о триптофан-зависимом механизме синтеза ИУК в микроорганизмах. На сегодняшний день известны различные триптофан-зависимые пути синтеза ИУК микроорганизмами, причем один штамм может содержать более одного пути, которые не всегда существуют отдельно и могут формировать интерактивные эффекты. Например, в метагеноме эндофитов были обнаружены гены синтеза ИУК из триптофана тремя путями: индол-3-ацетамидным (ИАА), индол-3-пируватным (ИП) и триптаминавым (ТАМ) (Sessitsch et al., 2012; Pandey et al., 2017; Zhang et al., 2019a; Etesami, Glick, 2024). Сообщалось, о наличии ИП-пути синтеза ИУК у многих ассоциированных с растениями бактерий (*Azospirillum brasilense*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium tuberculosis*) и непатогенных штаммов *Erwinia herbicola* (Koga et al., 1991; Costacurta, Vanderleyden, 1995; Patten, Glick, 1996; Manulis et al., 1998). Фермент индолил-3-пируватдекарбоксилаза (Ipdc), кодируемый геном *ipdc* (или *ppdc*) катализирует превращение индол-3-пирувата в индол-3-ацетальдегид, который при помощи индол-3-ацетальдегид дегидрогеназы (*iad1*) окисляется до ИУК (Prinsen et al., 1993; Spaepen et al., 2007; Werther et al., 2008; Федоров и др., 2010). ИАА-путь характерен для фитопатогенов (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*) и некоторых непатогенных бактерий (*Bradyrhizobium* spp., *Streptomyces* spp.). Ключевым ферментом ИАА-пути является ФАД⁺-зависимая триптофан-2-монооксигеназа (*iaaM*) (Emanuele et al., 1995), преобразующая триптофан в индол-3-ацетамид, которая затем гидролизует ацетамидгидролазой (*iaaH*) до ИУК. Основным путем биосинтеза ауксинов в растениях считается ТАМ-путь, ключевой фермент которого триптофандекарбоксилаза (*tam*, *udc*) изучен у многих растений. Однако функционирование ТАМ-пути у бактерий остается не совсем ясной, хоть и была выявлена триптофандекарбоксилазная активность для *Micrococcus perditreus* (Facchini et al., 2000). Не исключено использование бактериями *Bacillus* spp. триптамина для продукции ИУК, поскольку это основной путь, обнаруженный среди изученных на сегодняшний день геномов (Zhang et al., 2019a). Триптофан-зависимая продукция ИУК в микроорганизмах может осуществляться также

и через индол-3-ацетальдегидный путь при помощи фермента оксидазы боковой цепи триптофана, что было впервые обнаружено у *Pseudomonas fluorescens* (Oberhaensli et al., 1991). Однако механизмы, ответственные за синтез ИУК у бактерий, биосинтетические пути, присутствующие у грамположительных бактерий, в частности в *Bacillus* spp., остаются не совсем ясными. По результатам функциональной аннотации и биоинформатического анализа генома *B. subtilis* 10-4, проведенного в главе 9, установлено наличие пула генов, ассоциированных с синтезом триптофана (*trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpP*, *trpD*, *trpE*, *trpF*, *TRPs*, *TSa*, *TSb*, *APRT*, *PRAI*, *epsN*). Кроме того, в геноме штамма 10-4 были детектированы гены, вовлеченные в биосинтез ИУК через ИП-путь (гены аминотрансферазы (*yugH*, *dapX*), альдегид дегидрогеназы (*aldHT*, *aldY*, *alkH*, *dhaS*, *yfmT*), индол-3-пируват декарбоксилазы (*IPAC*)), ИАА-путь (гены индол-ацетамидгидралазы (*IAN*), нитрилазы 1 (*N3*)) и индол-3-ацетальдегидный путь (ген индол-ацетальдегид дегидрогеназы (*IAD*)).

Продукция ИУК зависит от доступности триптофана в среде (например, в корневых экссудатах растений) (Bais et al., 2006; Шапошников и др., 2011; Olanrewaju et al., 2017). Как растения, так и бактерии могут иметь триптофан-зависимые и независимые пути (Tang et al., 2023; Duca, Glick, 2020). Выявленная нами способность штамма 10-4 продуцировать ауксины при культивировании на среде LB (1147 нг/мл) может свидетельствовать о потенциальном наличии триптофан-независимого механизма биосинтеза ИУК у штамма 10-4 или же об использовании бактериями собственного триптофана для дальнейшего синтеза ИУК. Наличие *trp*-оперона в геноме 10-4 может указывать на (i) автономию в синтезе триптофана, то есть бактерия не зависит от экзогенного триптофана, что теоретически облегчает запуск синтеза ИУК при наличии альтернативных ферментов; (ii) адаптацию к бедным средам, к примеру, в ризосфере, где триптофан лимитирован. Вместе с тем, триптофан-независимый механизм может играть второстепенную роль, потенциально действуя как компенсаторный механизм для повышения уровня ИУК, когда основные триптофан-зависимые пути нарушены или менее активны (Tang et al., 2023). Существование подтверждается косвенно: мутанты бактерий, неспособные синтезировать триптофан, всё равно продуцируют ИУК. Хотя биохимические механизмы остаются неизученными, предполагается использование

альтернативных предшественников (например, индола или антраниловой кислоты) (Сырова и др., 2022).

Продукция сидерофоров. Способность *B. subtilis* 10-4 продуцировать сидерофоры (таблица 3.2) является еще одним важным признаком RGP-бактерий, значительно влияющим на рост растений (Pandey et al., 2017; Pieterse et al., 2014). Сидерофоры – низкомолекулярные соединения (масса <1000 Да), обладающие высокой специфичностью к хелатированию ионов Fe^{3+} . Их синтез позволяет бактериям эффективно конкурировать за железо в ризосфере и эндофитных нишах, что критически важно в условиях его дефицита (Pieterse et al., 2014; Pandey et al., 2017; Ghazanfar et al., 2024). Эндофиты, секретирующие сидерофоры, образуют комплексы Fe^{3+} -сидерофор, которые транспортируются в растительные клетки через специфические рецепторы. Внутри клетки Fe^{3+} восстанавливается до Fe^{2+} , становясь доступным для синтеза ключевых биомолекул (гем и железосерные кластеры, предшественники ДНК, АТФ). В геноме *B. subtilis* 10-4 идентифицированы кластеры генов, ассоциированные с синтезом сидерофоров (*dhbC*, *FeuA*, *FeuB*, *dhbB*, *FeuC*, *dhbE*, *dhbF*, *yuiI*, *dhbA*, *HypI*, *Fe-ABC1*, *X-ABC3*, *X-ABC2*) (глава 9.2.2).

Фиксация атмосферного азота (N_2). С использованием газовой хроматографии, а также безазотистой среды Эшби нами было обнаружено, что *B. subtilis* 10-4 обладает способностью к азотфиксации (табл. 3.3). Согласно данным литературы, эндофиты могут быть вовлечены во весь азотный цикл, поскольку белковые домены участвуют в N_2 -фиксации. Микробный азотный цикл почти полностью представлен в метагеноме эндофитов, хотя разные его стадии требуют различной концентрации кислорода: согласно данным о генах, аэробная (нитрификация), микроаэробная (азотфиксация) и анаэробная (денитрификация) части цикла участвуют в этом процессе (Sessitsch et al., 2012; Rana et al., 2024). Проведенный нами анализ полного генома *B. subtilis* 10-4 позволил выявить кластеры генов, ассоциированные с метаболизмом азота, включая регуляцию азотистого обмена (*glnG*, *nrgB*), денитрификацию (*NarG*, *NorD*, *NarH*, *NarJ*, *NorQ*, *NarI*), ассимиляцию (*amt*, *GOGDP2*, *GOGDP1*, *GOGATF*, *PII*, *GSI*, *NsrR*), аммонификацию нитратов и нитритов (*NarH*, *NarJ*, *NarG*, *NiR1b*, *NarI*, *NiR1a*), что детально будет рассмотрено далее в главе 9.2.

Солюбилизация фосфатов. Фосфор, составляющий 0,2–10,8% от сухого веса растения, является важным компонентом для поддержания их жизни и играет важную роль в процессах метаболизма углерода, энергетического обмена и образования мембран, а также в синтезе ключевых биомолекул АТФ, нуклеиновых кислот и фосфолипидов (Cordell, Neset, 2014; Kour et al., 2021). В агроэкосистемах дефицит доступного фосфора – один из ключевых лимитирующих факторов урожайности, снижающий продуктивность культур на 30–50% (Chen et al., 2023). У бактерий транспорт неорганических фосфатов осуществляется высокоаффинной АТФ-зависимой системой, активируемой при дефиците фосфора (*pst*, phosphate-specific transport) и низкоаффинным протонным симпортером, работающим в условиях избытка фосфора (*pit*, phosphate inorganic transport) (Danylovych et al., 2004; Hsieh, Wanner, 2023). В результате функциональной аннотации с помощью Prokka в геноме *B. subtilis* 10-4 (глава 9) обнаружены гены *pstS1* (phosphate-binding protein PstS1), *pstC* (phosphate transport system permease protein PstC), *pstA* (phosphate transport system permease protein PstA), *pstB3* (phosphate import ATP-binding protein PstB 3), а также *pitA* (low-affinity inorganic phosphate transporter 1). Выявленные нами различия в Р-солюбилизирующей активности у *B. subtilis* 10-4 и 26Д (табл. 3.2), вероятно, могут быть обусловлены ограничениями самой методики, в которой используется один тип фосфата (трикальцийфосфат); так как бактерии могут солюбилизовать определенные формы фосфатов и быть неактивными в отношении других (Кадырова и др., 2022). В пользу проявления способности *B. subtilis* 10-4 повышать усваиваемость растениями фосфатов из почвы могут служить данные о повышении накопления под их влиянием содержания фосфора в листьях и клубнях картофеля (табл. S10). Это согласуется с данными литературы о том, что инокуляция фосфат-солюбилизирующими *B. megaterium* CNPMS B119 и *B. subtilis* CNPMS B2084 улучшала усвоение фосфора и урожайность кукурузы, а также способствовала его накоплению в зернах (de Oliveira-Paiva et al., 2024). Проведение комплексных исследований, включая молекулярные (поиск генов, ассоциированных с солюбилизацией и другими PGP признаками), а также *in planta* анализы по оценке влияния бактериальных штаммов на рост и развитие растений позволяют более полно оценить проявление ими полезных свойств.

3.3. Оценка фитотоксичности клеток *B. subtilis* 10-4 в отношении высших однодольных и двудольных растений

Установлено, что *B. subtilis* 10-4 при предпосевном способе обработки семян в широком диапазоне концентраций (0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ/мл) не оказывал угнетающего воздействия на рост однодольных и двудольных растений (овса и редьки, соответственно) (табл. 3.3, рис. 3.4).

Таблица 3.3 – Результаты теста на фитотоксичность *B. subtilis* 10-4 для высших однодольных и двудольных растений

Параметр	Концентрация <i>B. subtilis</i> 10-4, КОЕ/мл								
	0 (H ₂ O)	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Овес (<i>Avena sativa</i> L., сорт Яков)									
Длина гл. корня, см	$1,6 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,6$	$2 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,8$	$2 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,6$
% от контроля	100 ^e	100 ^e	106 ^d	113 ^{cd}	125 ^b	131 ^a	119 ^c	125 ^b	113 ^{cd}
Редька (<i>Raphanus sativus</i> L., сорт Тамбовчанка)									
Длина гл. корня, см	$2,1 \pm 1,1$	$2,1 \pm 1,3$	$2,1 \pm 0,8$	$2,7 \pm 1,3$	$2,8 \pm 1,0$	$2,7 \pm 1,4$	$2,9 \pm 1,4$	$2,3 \pm 1,0$	$2,1 \pm 1,1$
% от контроля	100 ^e	100 ^e	100 ^f	127 ^c	127 ^c	132 ^b	136 ^a	105 ^d	100 ^e

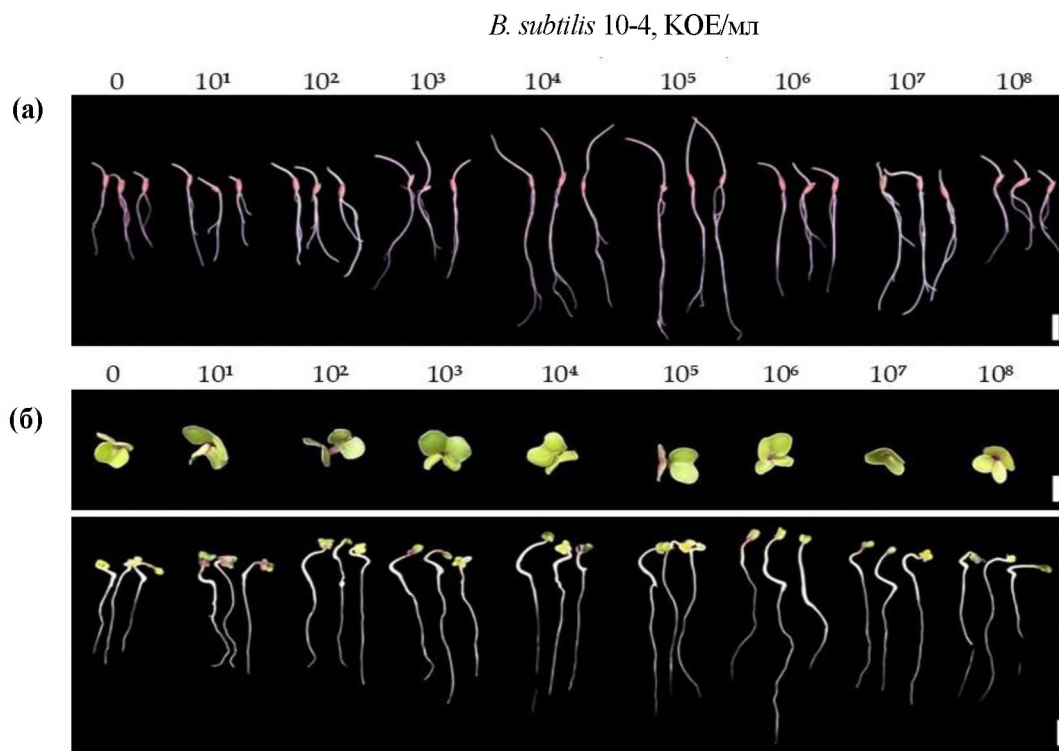


Рис. 3.4. Отсутствие фитотоксичности и дозо-зависимое положительное влияние *B. subtilis* 10-4 на рост однодольных (овес) (а) и двудольных (редька масличная) (б) растений. На фото представлены 5-сут тест-растения. Шкала: 0,5 см

При использовании концентрации 10^1 КОЕ/мл для овса, 10^8 и 10^2 КОЕ/мл для редьки, рост растений не отличался от контрольных вариантов. Во всех остальных концентрациях отмечено увеличение длины главного корня растений на 106–131% (овес) и на 105–136% (редька). Максимальное увеличение длины корня в сравнении с контролем показали концентрации 10^5 КОЕ/мл для овса (на 131%) и 10^6 КОЕ/мл для редьки (на 137%). Таким образом, клетки *B. subtilis* 10-4 не проявляют фитотоксичности на однодольные и двудольные растения в ранние стадии развития и демонстрируют потенциал в качестве безопасных биоинокулянтов для сельского хозяйства.

3.4. Анализ влияния инокуляции семян клетками штамма *B. subtilis* 10-4 в разных концентрациях на рост растений пшеницы

Для оценки способности *B. subtilis* 10-4 регулировать ростовые процессы растений, далее в лабораторных условиях было изучено влияние инокуляции семян яровой мягкой пшеницы в диапазоне концентраций (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ/мл) на прорастание, линейные размеры проростков, их сырую и сухую массу. Обнаружено, что инокуляция семян клетками *B. subtilis* 10-4 увеличивала энергию их прорастания во всех вариантах от 7% (10^7 КОЕ/мл) до 20% (10^5 КОЕ/мл) по сравнению с контролем (рис. 3.5а). Применение концентраций 10^8 , 10^6 , 10^5 и 10^4 КОЕ/мл заметно увеличивало линейные размеры корней и побегов, причем явное превосходство наблюдалось при использовании концентрации 10^5 КОЕ/мл, где эти показатели превышали контрольные на 23% и 30% соответственно (рис. 3.5б). При использовании концентрации 10^7 КОЕ/мл длина проростков была сопоставима с контрольными. Результаты показали, что сырая и сухая биомасса 6-сут проростков в контрольном варианте составила 2,26 г и 0,37 г, соответственно, тогда как в вариантах с инокуляцией варьировала от 2,62 г (+16%) и 0,42 г (+14%) до 3,23 г (+42%) и 0,47 г (+27%) с максимальными значениями при применении концентрации 10^5 КОЕ/мл (рис. 3.5в).

В целом, анализируя приведенные данные, можно определённо сказать, что инокуляция *B. subtilis* 10-4 оказывает стойкий стимулирующий эффект на показатели роста проростков пшеницы на протяжении всего опыта. При этом установлено, что влияние бактерий на интенсивность ростовых процессов растений носит выраженный дозо-зависимый характер (рис. 3.5а–г).

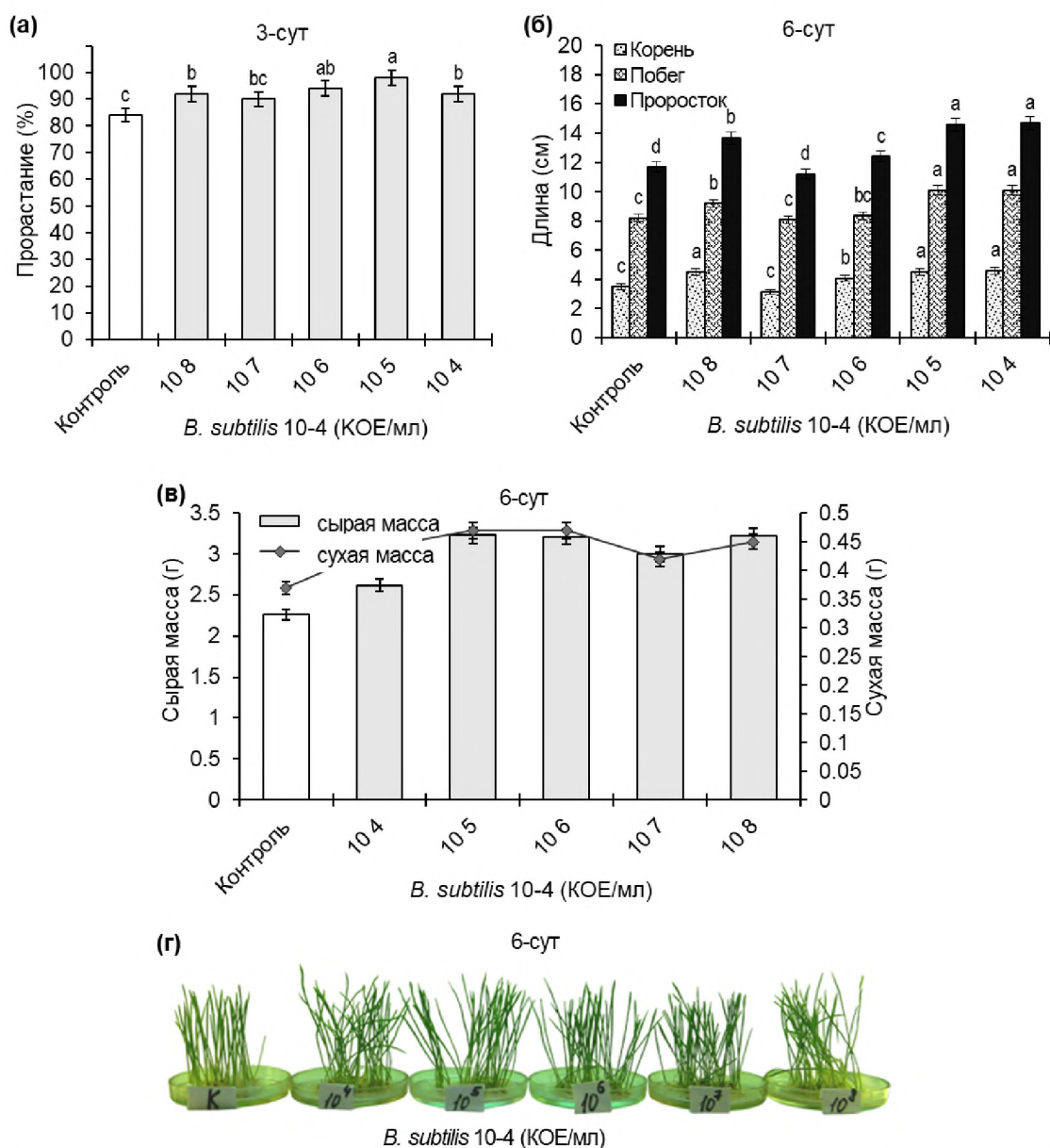


Рис. 3.5. Влияние предпосевной инокуляции семян яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Башкирская26) *B. subtilis* 10-4 в разных концентрациях на прорастание семян (а), линейные размеры проростков (б), их сырую и сухую биомассу (в). Репрезентативные фото 6-сут проростков (г)

Сопоставление полученных данных позволило выявить наиболее оптимальную по ростстимулирующему эффекту концентрацию *B. subtilis* 10-4 которая составила 10⁵ КОЕ/мл. Механизмы наблюдаемого эффекта, вероятно, связаны со способностью бактерий колонизировать внутренние ткани растений, модулируя синтез различных фитогормонов и сигнальных молекул. Это, в свою очередь, может активировать процессы клеточного деления и дифференцировки, стимулируя развитие как корневой системы, так и надземной биомассы (Dusa et al., 2014; Rana et al., 2024). Полученные результаты, демонстрирующие дозо-зависимый эффект штамма *B. subtilis* 10-4 на

ростовые параметры пшеницы, согласуются с общепринятой в литературе парадигмой, согласно которой влияние PGP-бактерий на растения носит нелинейный характер (Kloepper et al., 1980; Lugtenberg, Kamilova, 2009).

Таким образом, эксперименты с использованием в качестве модельного объекта пшеницы подтвердили дозо-зависимое влияние *B. subtilis* 10-4 при предпосевной инокуляции на проращивание семян и интенсивность ростовых процессов растений (рис. 3.5). В качестве оптимальной в стимуляции роста отобрана концентрация 10^5 КОЕ/мл, демонстрирующая увеличение энергии прорастания (на 20%), длины корней (на 30%) и побегов (на 23%), накопление сырой и сухой биомассы (на 42% и 27%) по сравнению с контролем (рис. 3.5), которая использовалась в дальнейших экспериментах.

3.5. Анализ эндофитности штамма *B. subtilis* 10-4 на растениях пшеницы, фасоли и картофеля

Колонизация внутренних тканей растения бактериями является одним из наиболее важных свидетельств их эндофитных свойств и фактором, влияющим на биологическую активность в растительно-микробных взаимодействиях (Allard-Massicotte et al., 2016; Mageshwaran1 et al., 2022; Zhao et al., 2023a). Наблюдение за поверхностно-стерилизованными сегментами растений пшеницы позволило выявить рост бактериальных колоний с морфолого-культуральными свойствами, идентичными исходному инокулянту *B. subtilis* 10-4 (рис. 3.6). При этом в контроле (без инокуляции) рост бактерий отсутствовал. Молекулярная идентификация выделенных бактерий с использованием RAPD-анализа подтвердила их генетическое соответствие исходному штамму 10-4 (рис. 3.6). Аналогичные данные были получены при оценке эндофитности *B. subtilis* 10-4 на растениях фасоли (рис. 3.7), гороха (Ласточкина и др., 2023), картофеля (рис. 3.8). Это согласуется с исследованиями, где эндофитные *B. subtilis* демонстрируют стабильную колонизацию тканей растений, включая корни и стебли, даже в условиях стресса (Mageshwaran et al., 2022). Важную роль в успешной колонизации может играть способность штамма 10-4 синтезировать ИУК и, вероятно, другие сигнальные молекулы, такие как СК. В литературе сообщалось о вовлечении ИУК и СК в формирование растительно-микробных взаимодействий (Etesami, Glick, 2024).

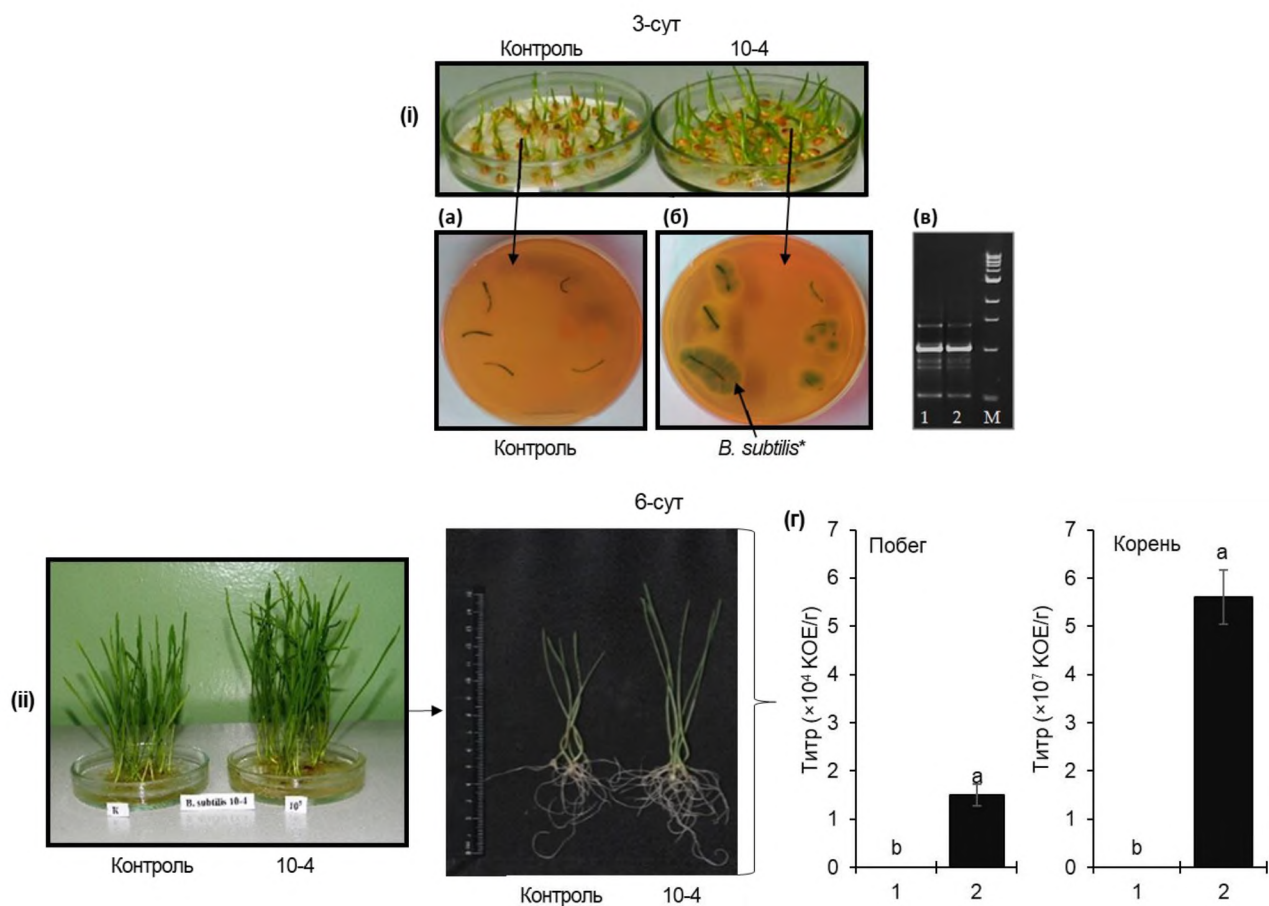


Рис. 3.6. Способность *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани проростков пшеницы: (а) отсутствие роста бактерий *B. subtilis* вокруг поверхностно-стерилизованных сегментов корней и побегов у неинокулированных проростков (Контроль); (б) рост бактерий *B. subtilis* (*колонии от светло-зеленого до зеленого цвета) вокруг поверхностно-стерилизованных сегментов проростков, инокулированных *B. subtilis* 10-4; (в) электрофореграмма ПААГ после RAPD-ПЦР анализа: М – ДНК-маркер; 1 – ДНК инокулята *B. subtilis* 10-4; 2 – ДНК бактерий, выросших вокруг сегментов растений на хромогенной среде *Bacillus* ChromoSelect Agar*; (г) титр эндофитных *B. subtilis* в корнях и побегах 6-сут проростков. Репрезентативные фото 3-сут (i) и 6-сут (ii) проростков

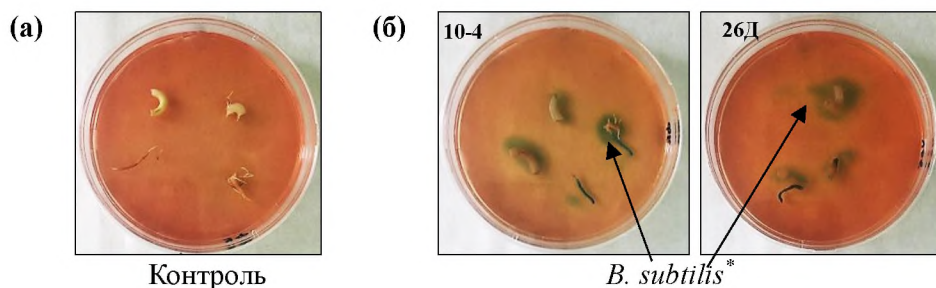


Рис. 3.7. Способность *B. subtilis* 10-4 и 26Д колонизировать внутренние ткани проростков фасоли при предпосевной инокуляции семян. (а) отсутствие роста бактерий *B. subtilis* вокруг поверхностно-стерилизованных сегментов корней и листьев у контрольных (неинокулированных) проростков; (б) рост бактерий *B. subtilis* (*колонии от светло-зеленого до зеленого цвета) вокруг поверхностно-стерилизованных сегментов инокулированных проростков

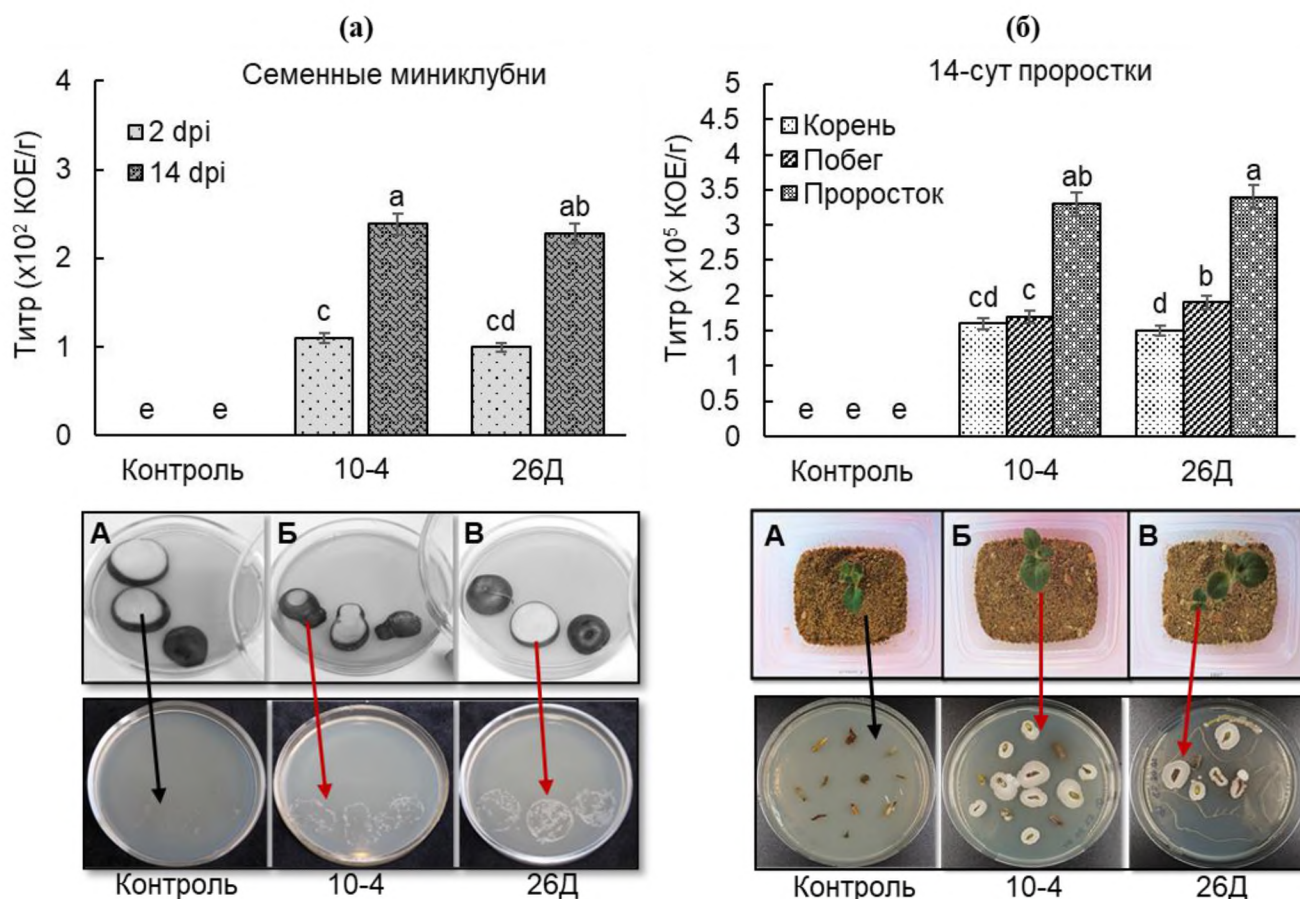


Рис. 3.8. Способность *B. subtilis* 10-4 и 26Д колонизировать внутренние ткани семенных мини клубней (а) и проростков (корни и побеги) (б) картофеля при предпосевной инокуляции. Красными стрелками указан рост бактерий в чашках Петри на среде LB в местах отпечатков поверхностно-стерилизованных срезов мини клубней и вокруг сегментов проростков, выращенных из инокулированных семенных клубней; черными стрелками указано отсутствие роста бактерий в чашках Петри на LB среде у контрольных (не инокулированных) в местах отпечатков срезов семенных клубней и вокруг сегментов проростков, выращенных из контрольных (не инокулированных) семян. dpi – дни после инокуляции

3.6. Оценка толерантности клеток *B. subtilis* 10-4 к экстремальным условиям культивирования *in vitro* и *in vivo*

Устойчивость штамма 10-4 к стрессам оценивали при культивировании жидкой и твердой средах LB в присутствии ПЭГ-6000 (осмотический стресс), AcCd2 (тяжелые металлы), гербицид Sekator® Turbo (пестициды), NaCl (засоление).

Тест на устойчивость к дефициту воды (ПЭГ) и пестицидам (гербицид).

Оценка толерантности к различным концентрациям гербицида (Гб) Sekator® Turbo и осмотического стресса (ПЭГ-6000) показала, что штамм *B. subtilis* 10-4 (как и референсный штамм 26Д) проявил устойчивость к этим стресс-факторам (рис. 3.9).

Как видно из рисунка 3.9, выявлено зависящее от концентрации снижение роста бактериальных клеток в течение культивирования *in vitro* (рис. 3.9а,б), но штаммы 10-4 и 26Д сохраняли способность к росту (хотя и медленнее, чем контрольные) как в присутствии полиэтиленгликоля, препятствующему поступлению воды в клетки (рис. 3.9а), так и гербицида (рис. 3.9б,в). Результаты, основанные на данных оптической плотности (OD_{600}), также показали, что оба штамма были более устойчивы к ПЭГ (рис. 3.9а), чем к гербициду (рис. 3.9б). Кроме того, эти штаммы осветляли питательную LB среду с гербицидом (рис. 3.9г), что можно было наблюдать визуально и по данным оптической плотности. Так, значение оптической плотности LB среды с Гб (0,5 мл/л) составляло в среднем 1,9, тогда как в присутствии штаммов через 24 часа инкубации не превышало 0,2. Интересно отметить, что с увеличением концентрации гербицида бактериям требовалось больше времени для осветления раствора и начала роста (рис. 3.9б). Вероятно, *B. subtilis* 10-4 и 26Д наряду с устойчивостью к Гб также могут ускорять его деструкцию, свидетельствуя о перспективности их применения в защите растений от гербицидного прессинга. Согласно, данным полногеномного анализа с помощью Prokka (глава 9) в геноме штамма 10-4 детектированы гены, кодирующие фермент эстеразу (*estA*, *estB*), которая играет важную роль как в растениях, так и микробах способствуя естественному разложению гербицидов в окружающей среде (Dutta et al., 2024). Кроме того, был обнаружен ген *phnO*, кодирующий фермент аминокилфосфонат N-ацетилтрансферазу, что свидетельствует о потенциале штамма 10-4 в детоксикации гербицидов на основе аминокилфосфонатов (Hove-Jensen et al., 2012; Jin et al., 2022).

В литературе имеются данные о разложении гербицидов эндофитными бактериями (Гарипова, 2014; Cope-Selby et al., 2017; Lafi et al., 2017) используя механизмы внеклеточного осаждения, секвестрации, внутриклеточного накопления, биотрансформации в менее токсичные формы (Lafi et al., 2017; Khare et al., 2018). Выявленный рост *B. subtilis* 10-4 в присутствии Гб (рис. 3.9б–г) и наличие генов *estA*, *estB* и *phnO* указывают, как на способность бактерий выживать в условиях воздействия

гербицидов, так и на потенциальный механизм деградации отдельных их компонентов через гидролиз эфирных связей.

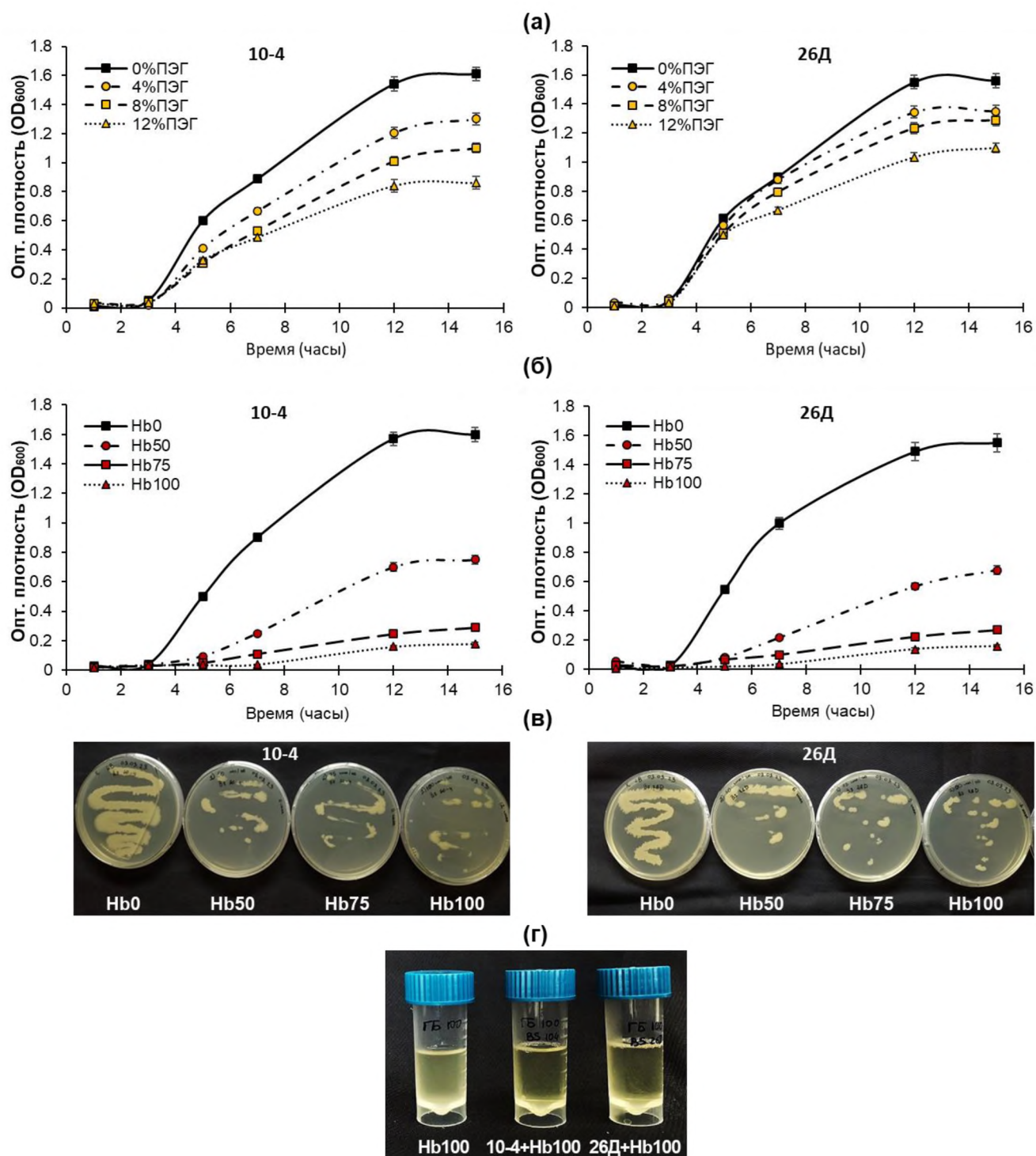


Рис. 3.9. Кривые роста *B. subtilis* 10-4 и 26Д в жидкой LB среде с добавлением гербицида (Hb) Sekator® Turbo в разных концентрациях [0 мл/л (Hb0), 0,25 мл/л (Hb50), 0,375 мл/л (Hb75) и 0,5 мл/л (Hb100)] (а) и ПЭГ-6000 (0%, 4%, 8% и 12%) (б). Репрезентативные фотографии, демонстрирующие способность бактерий расти на агаризованной LB среде с Hb (в) и обесцвечивать жидкую среду LB, содержащую 5 мл/л гербицида (Hb100), после 24 ч инкубации при 37 °C (180 об/мин) (г)

Вместе с тем, далее представляло интерес оценить способность толерантных к Гб и ПЭГ штаммов придавать растениям устойчивость к этим стрессам. Так как при анализе эффективности использования регуляторов роста для защиты растений от воздействия стрессовых факторов среды часто применяют тест на всхожесть семян (Шакирова, Безрукова, 1997), инокулированные клетками *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл) семена пшеницы проращивали в чашках Петри с разными концентрациями Гб и ПЭГ.

Из данных, представленных на рисунке 3.10 и таблице 3.4 видно, что с увеличением концентрации стрессоров всхожесть семян и дальнейший рост проростков (длина корней и побегов) поступательно уменьшались.

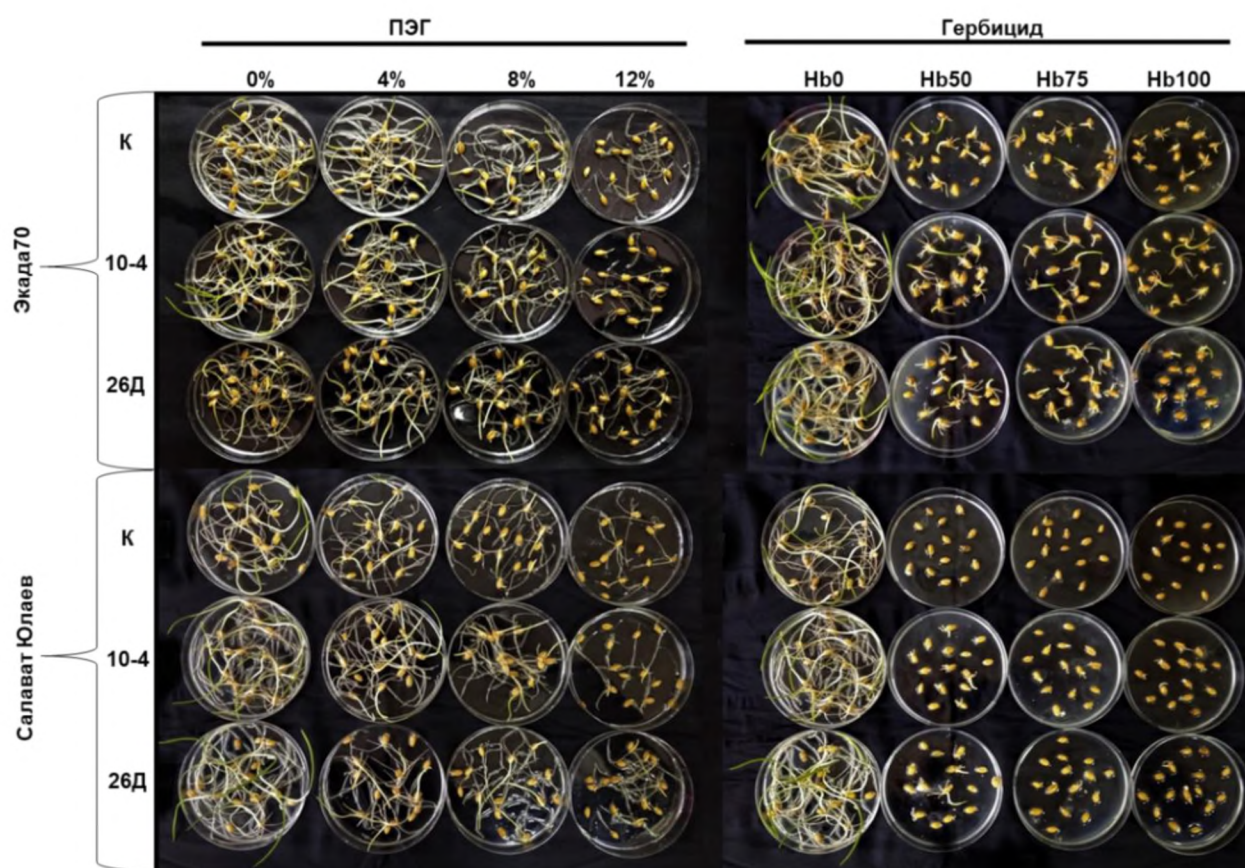


Рис. 3.10. Репрезентативные фото влияния различных концентраций гербицида Sekator® Turbo (0 мл/л (Hb0), 0,25 мл/л (Hb50), 0,375 мл/л (Hb75), 0,5 мл/л (Hb100)) и ПЭГ (0%, 4%, 8%, 12%) на всхожесть инокулированных *B. subtilis* 10-4 и 26Д семян пшеницы (7-сут)

Однако, инокуляция *B. subtilis* оказала защитный эффект на все исследуемые показатели роста, демонстрируя способность этих бактерий придавать растениям физиологическую устойчивость к засухе и гербицидам.

Таблица 3.4 – Влияние гербицида Sekator® Turbo и ПЭГ на прорастание и всхожесть семян, а также рост проростков пшеницы (*T. aestivum* L.) сортов Экада70 (Э70) и Салават Юлаев (СЮ), инокулированных *B. subtilis* (штаммы 10-4 и 26Д)

Концентрация ПЭГ (%)	3-сут		7-сут		Длина побега (см)		Длина корня (см)	
	Прорастание (%)		Всхожесть (%)					
	Э70	СЮ	Э70	СЮ	Э70	СЮ	Э70	СЮ
0 (контроль)	99 ^a	80 ^a	99 ^a	82 ^a	6.8 ^a	5.3 ^a	5.8 ^a	5.4 ^a
4	84 ^d	73 ^c	84 ^d	73 ^c	5.7 ^c	4.9 ^c	5.2 ^c	4.8 ^d
4 + (штамм 10-4)	93 ^b	80 ^a	95 ^b	82 ^{ab}	6.2 ^b	5.0 ^{bc}	5.9 ^a	4.9 ^c
4 + (штамм 26Д)	86 ^c	76 ^b	88 ^c	78 ^b	6.1 ^b	5.1 ^b	5.6 ^b	5.2 ^b
8	72 ^g	67 ^e	73 ^e	67 ^e	4.9 ^e	4.0 ^f	4.3 ^e	3.7 ^f
8 + (штамм 10-4)	87 ^e	70 ^d	88 ^c	70 ^d	5.3 ^d	4.5 ^{de}	5.1 ^c	4.2 ^e
8 + (штамм 26Д)	84 ^f	69 ^d	84 ^d	69 ^d	5.0 ^{de}	4.6 ^d	4.9 ^d	4.8 ^d
12	68 ^k	60 ^g	68 ^g	60 ^j	3.8 ^j	3.1 ^j	3.8 ^g	2.9 ^j
12 + (штамм 10-4)	72 ^g	63 ^f	73 ^e	64 ^f	4.2 ^f	3.7 ^g	4.4 ^e	3.2 ^g
12 + (штамм 26Д)	70 ^j	62 ^f	71 ^f	62 ^g	4.0 ^{fg}	3.9 ^f	4.1 ^f	3.7 ^f

Концентрация гербицида (Hb)	3-сут		7-сут		Длина побега (см)		Длина корня (см)	
	Прорастание (%)		Всхожесть (%)					
	Э70	СЮ	Э70	СЮ	Э70	СЮ	Э70	СЮ
Hb0 (контроль)	98 ^a	86 ^a	98 ^a	86 ^a	4.2 ^a	4.6 ^a	6.1 ^a	6.6 ^a
Hb50	53 ^d	27 ^f	55 ^f	25 ^f	1.7 ^d	0.5 ^d	0.9 ^e	0.1 ^f
Hb50 + (штамм 10-4)	76 ^b	67 ^b	78 ^b	67 ^b	2.2 ^b	0.9 ^{bc}	1.5 ^b	0.8 ^c
Hb50 + (штамм 26Д)	67 ^c	53 ^c	68 ^d	54 ^c	1.9 ^c	1.0 ^b	1.2 ^c	1.3 ^b
Hb75	46 ^f	23 ^g	47 ^g	14 ^k	1.3 ^f	0.3 ^e	0.7 ^f	0.05 ^g
Hb75 + (штамм 10-4)	73 ^{bc}	46 ^d	76 ^c	49 ^d	1.7 ^d	0.5 ^d	1.4 ^{bc}	0.3 ^d
Hb75 + (штамм 26Д)	60 ^d	33 ^e	63 ^e	37 ^e	1.5 ^e	0.4 ^d	1.1 ^d	0.2 ^e
Hb100	37 ^j	14 ^k	41 ^k	15 ^k	0.5 ^k	0.07 ^g	0.4 ^g	0.03 ^j
Hb100 + (штамм 10-4)	48 ^e	19 ^j	48 ^g	19 ^j	1.0 ^g	0.2 ^f	1.0 ^{de}	0.1 ^e
Hb100 + (штамм 26Д)	43 ^g	23 ^g	43 ^j	24 ^{fg}	0.7 ^h	0.3 ^e	0.8 ^{ef}	0.2 ^e

Тест на устойчивость к ацетату кадмия ($Cd(CH_3COO)_2$) и хлориду натрия ($NaCl$). Оценка толерантности к Cd показала, что клетки *B. subtilis* 10-4 способны расти в присутствии различных концентраций Cd как в жидкой (рис. 3.9а), так и твердой среде LB (рис. 3.11б). Так, при 24-часовом культивировании в жидкой среде LB наблюдалось дозозависимое ингибирование роста бактериальных клеток под действием Cd (рис. 3.11а). Однако штамм 10-4 проявил устойчивость к токсическому действию Cd, сохраняя способность к росту, хотя и с снижением скорости роста по сравнению с контролем, демонстрируя наиболее выраженное ингибирование роста при концентрации Cd 1 мМ. Оценка роста штамма 10-4 на твердой среде LB, содержащей ацетат Cd, после 24-часовой инкубации подтвердила выявленную ранее тенденцию (рис. 3.11б).

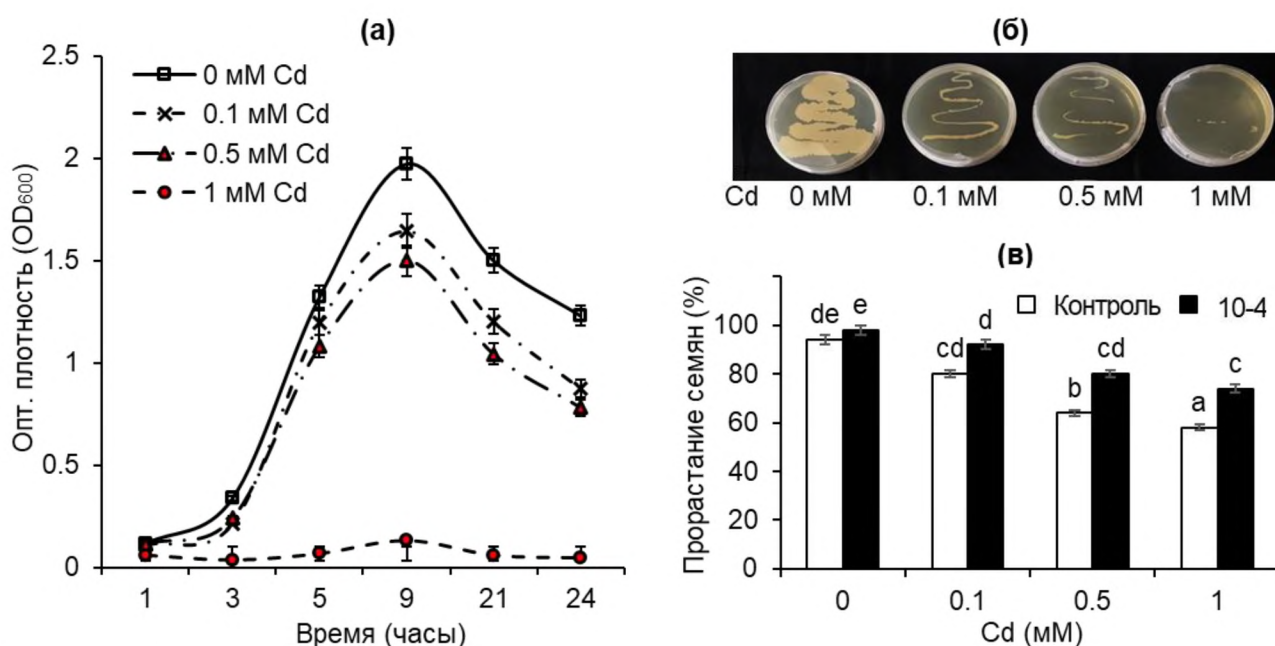


Рис. 3.11. Рост клеток *B. subtilis* 10-4 в присутствии ацетата кадмия (Cd) (0, 0,1, 0,5 и 1 mM) в жидкой среде LB (а) и фотографии роста бактерий в агаризованной среде LB, содержащей различные концентрации Cd (0, 0,1, 0,5 и 1 mM) (после 24 ч инкубации при 37 °C) (б); и влияние бактериальной инокуляции на прорастание семян пшеницы сорта Экада70 в условиях Cd стресса (0, 0,1, 0,5 и 1 mM) (в)

Результаты оценки влияния возрастающих концентраций ацетата Cd (0–1 mM) (рис. 3.11в) и NaCl (0–2%) (рис. 3.12б) на прорастание семян пшеницы выявили дозозависимое снижение их всхожести. Однако, предпосевная инокуляция семян *B. subtilis* 10-4 достоверно повышала их всхожесть семян в присутствии всех концентраций Cd (0, 0,1, 0,5 и 1 mM) (рис. 3.11в) и NaCl (рис. 3.12б).

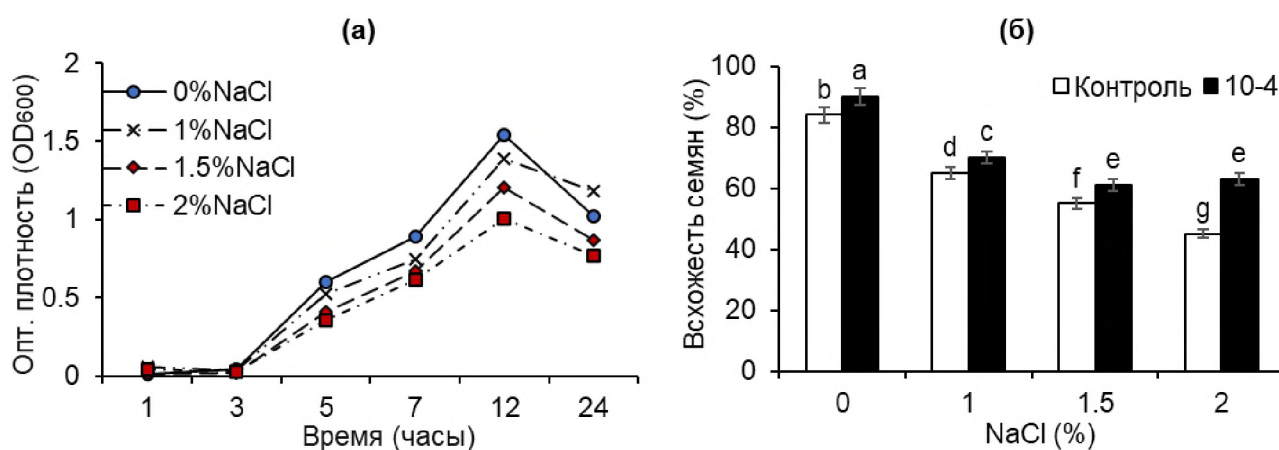


Рис. 3.12. Рост клеток *B. subtilis* 10-4 в присутствии хлорида натрия (NaCl) (0, 1, 1,5, 2%) в жидкой среде LB (а) и влияние бактериальной инокуляции на всхожесть семян пшеницы сорта Башкирская26 при воздействии NaCl засоления (б)

Итак, Cd- и NaCl-толерантный штамм *B. subtilis* 10-4 при инокуляции проявляет выраженный протекторный эффект, ослабляя ингибирующее действие Cd- и NaCl-индуцированного стресса на прорастание семян пшеницы. Сходный протекторный эффект штамма 10-4 наблюдался и при прорастании семян фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) в условиях NaCl стресса (табл. S1).

Таким образом, результаты демонстрируют способность клеток штамма *B. subtilis* 10-4 к росту на жидких и твердых питательных средах с добавлением широкого диапазона концентраций ПЭГ-6000 (имитация осмотического стресса/засухи), Гб (пестициды) (рис. 3.9), Cd (тяжелые металлы) (рис. 3.11) и NaCl (засоление) (рис. 3.12). Это свидетельствует о толерантности исследуемых бактерий к абиотическим стрессорам: осмотическому (засухе), ксенобиотикам (гербицидам), тяжелым металлам (Cd) и засолению. Кроме того, результаты свидетельствуют об эффективности применения этих бактерий при предпосевной инокуляции для достоверного повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам различной этиологии, проявляя выраженный протекторный эффект на процессы прорастания и, как следствие, потенциально на раннее развитие и последующий рост растений (рис. 3.10, 3.11в, 3.12б, табл. 3.4, табл. S1).

3.7. Морфофизиологические параметры и устойчивость различных растений к стрессовым факторам среды под влиянием эндофитных штаммов *B. subtilis*

Далее была проведена комплексная оценка влияния инокуляции семян эндофитными *B. subtilis* на основные морфофизиологические процессы разных видов растений (агрокультур) (злаковых, амарантовых, бобовых, пасленовых) и физиолого-биохимические механизмы их устойчивости к различным по природе стрессам и их комбинациям (засоление, водный дефицит, Cd стресс, заражение возбудителем альтернариоза, водный дефицит + заражение возбудителем фузариоза, почвенная засуха + гербицидный стресс), определяющим особенности роста, фотосинтеза, окислительного и осмотического статуса. Результаты продемонстрировали проявление ростстимулирующего и протекторного эффекта на клеточном и организменном (фенотипическом) уровнях инокулированных растений (рис. 3.13) сахарной свеклы

(табл. 3.5) (Пусенкова и др., 2015; 2016; Ласточкина и др., 2018), картофеля (рис. 3.14) (Pusenкова et al., 2023; Pusenkova, Lastochkina, 2024), фасоли (табл. S1) (Lastochkina et al., 2021), гороха (рис. 3.15) (Ласточкина и др., 2023), пшеницы яровой (рис. 3.16, рис. 3.17) (Lastochkina et al., 2017; 2020a) и озимой (рис. 3.18) (Lubyanova et al., 2023) в норме и при действии разных стресс-факторов: NaCl засоление (Lastochkina et al., 2017; 2021; Ласточкина и др., 2023), ПЭГ-индуцированное обезвоживание (Maslennikova, Lastochkina, 2021; Lastochkina et al., 2020a; 2022b; 2023b; Lubyanova et al., 2023), Cd стресс (Maslennikova et al., 2023), поражение *A. alternata* (альтернариозом) (Ласточкина и др., 2018), а также комбинациям засухи с фузариозом (Lastochkina et al., 2020b; 2021b) и гербицидом (Lastochkina et al., 2023), что позволяет отнести *B. subtilis* 10-4 к природным регуляторам роста с широким спектром защитного действия.

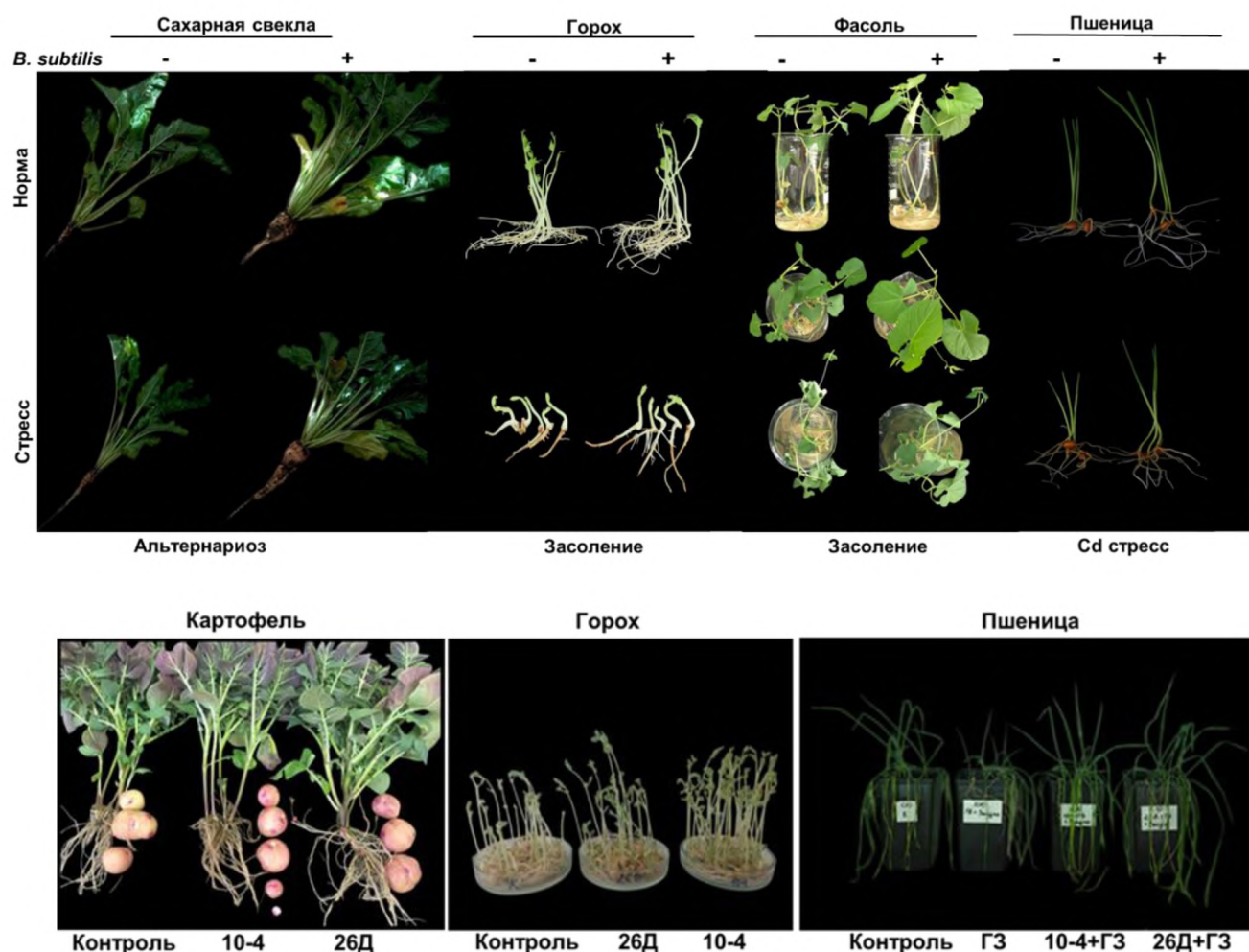


Рис. 3.13. Репрезентативные фотографии (примеры) ростстимулирующего и защитного действия эндофитных бактерий *B. subtilis* (10-4, 26Д) на разные растения в норме и стрессовых условиях. ГЗ – комбинированное воздействие гербицида и засухи

Во всех экспериментах универсальные (общие) реакции растений в ответ на инокуляцию *B. subtilis* включали улучшение (в разной степени) параметров роста (всхожесть, длина корней и побегов, биомасса), архитектуры корневой системы (удлиненные корни, ускоренное формирование боковых корней) (рис. 3.13–3.18, табл. 3.5, табл. 3.6), обуславливающей повышение усвоения элементов минерального питания и поглощения воды из более глубоких слоев при стрессе, а также снижение уровня вызываемых стрессами окислительных (МДА) (рис. 3.20) и осмотических (пролин) повреждений растений (рис. 3.21, рис. 3.22), поддержание повышенного уровня фотосинтетических пигментов при стрессе (рис. 3.19, рис. S7), что отражалось в формировании улучшенной (в сравнении с контролем) урожайности (табл. 3.5, табл. 3.7, табл. 3.8). Например, обработка растений сахарной свеклы *B. subtilis* 10-4, наряду с коммерческими бациллярными биопрепаратами, как на основе эндофита *B. subtilis* 26Д (Фитоспорин-М), так и на основе метаболитов *B. subtilis* (Витаплан), стимулировала ростовые процессы (табл. 3.5) и синтез фотосинтетических пигментов Хл а, Хл b в контрольных (неинфицированных патогеном) растениях (в 1,2–1,9 раза) и препятствовала их деградации при заражении *A. alternata*, что отразилось в увеличении площади листовой поверхности (до 30 %) и массы листьев (в 1,8–2,9 раза) (рис. S7), а также повышении массы корнеплодов и их сахаристости в сравнении с контролем (табл. 3.5) (Ласточкина и др., 2018).

Таблица 3.5 – Накопление массы листьев и корнеплодов у растений сахарной свеклы (сорт Кампай), а также сахаристость корнеплодов в норме и при инфицировании *Alternaria alternata* под влиянием *B. subtilis* 10-4 и коммерческих бациллярных биопрепаратов (Фитоспорин-М, Витаплан) (2013 г., полевые эксперименты)

Вариант	Масса наземной части, г			Масса корнеплодов, г			Саха ристо сть, %
	2–3 пары настоящи х листьев	4–6 пар настоящи х листьев	Уборка урожая	2–3 пары настоящи х листьев	4–6 пар настоящих листьев	Уборка урожая	
Здоровые (незараженные <i>A. alternata</i>)							
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
Зараженные <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

Инокуляция семенных миниклубней картофеля эндوفитными бактериями *B. subtilis* 10-4 и 26Д способствовала более раннему появлению ростков и стимулировала их рост в контролируемых условиях. В течение первых 15–30 дней вегетации наблюдалось увеличение высоты растений и длины корней по сравнению с неинокулированным контролем (рис. 3.14).

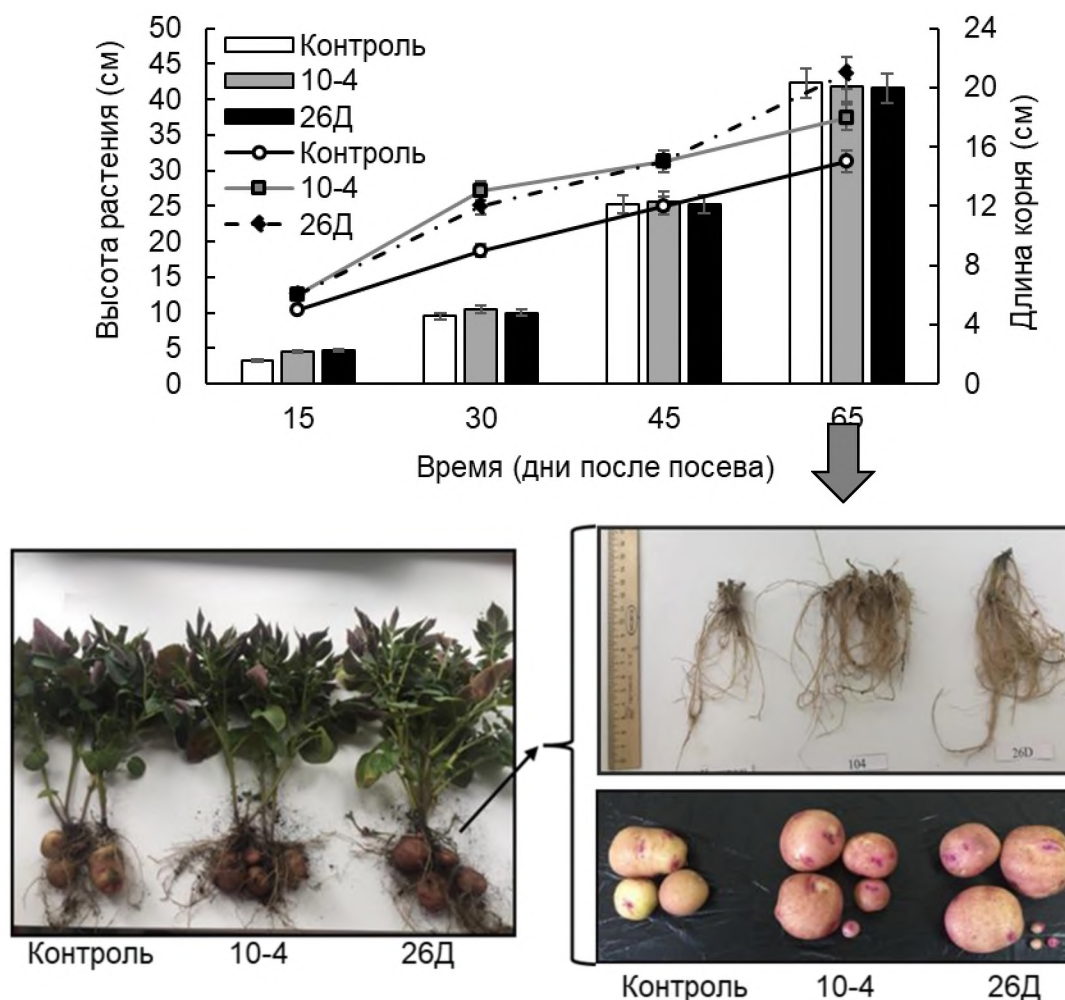


Рис. 3.14. Влияние предпосадочной инокуляции семенных миниклубней эндوفитами *B. subtilis* (штаммы 10-4 и 26Д) на длину побегов и корней растений картофеля (сорт Башкирский) в вегетационных опытах в контролируемых условиях

Несмотря на то, что к концу вегетационного периода (65 дней поле посева) значимых различий в высоте растений между вариантами не выявлено, инокуляция положительно повлияла на содержание фотосинтетических пигментов (Хл а, Хл b, Кар), площадь листьев (рис. S8), содержание пролина (рис. S9) и формирование корневой системы растений (рис. 3.14). Это, по-видимому, способствовало повышенной (в сравнении с контролем) урожайности (табл. S1) и накоплению в

клубнях и листьях макро- (рис. S10) и микроэлементов (табл. S2) (Pusenкова et al., 2023). В результате инокуляции эндофитами выявлено увеличение веса столонов, количества и размера клубней (табл. S1). Хотя общее содержание сухого вещества и крахмала в клубнях существенно не отличалось от контроля, наблюдалось снижение уровня редуцирующих сахаров (табл. S3) и увеличение размера крахмальных зерен (рис. S11). Эти результаты демонстрируют потенциал колонизации семенных миниклубней картофеля эндофитными *B. subtilis* (10-4 и 26Д) (рис. 3.8) для повышения качества семенного материала, урожайности клубней и улучшения их качественных показателей в полевых условиях. Данное положение нашло достоверное подтверждение в результатах проведенных нами полевых исследований (Пусенкова и др., 2024; Пусенкова, Ласточкина, 2025).

Физиология бобовых растений уникальна из-за одновременного влияния ризобияльных и эндофитных неризобияльных микроорганизмов (Vasileva et al., 2020). Чувствительный к засолению горох (*Pisum sativum* L.) – важная культура, чей рост угнетается избытком почвенных солей.

Засоление, как и другие абиотические стрессы, вызывает окислительный и осмотический стресс, нарушает водный баланс (снижение поглощения воды корнями и усиление потери листьями) и приводит к каскаду нарушений: дисбалансу питательных веществ, повреждению мембран, сбоям в антиоксидантной защите, закрытию устьиц и угнетению фотосинтеза (Mukhopadhyay et al., 2021).

Как видно из рисунка 3.15, засоление тормозило ростовые процессы растений, что было ожидаемым и согласуется с имеющимися в литературе данными (Gupta et al., 2021a; 2021b). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 оказывала стимулирующий в норме и защитный при засолении эффекты на проростки гороха, что отразилось в улучшении энергии прорастания и всхожести семян, длины корней и накоплении их сухой массы (рис. 3.15). Эти данные совпадают с литературными о благотворном влиянии PGP-бактерий на рост и развитие различных видов растений в условиях абиотических стрессов, включая засоление (Gupta et al., 2021a; 2021b; Sofy et al., 2021).

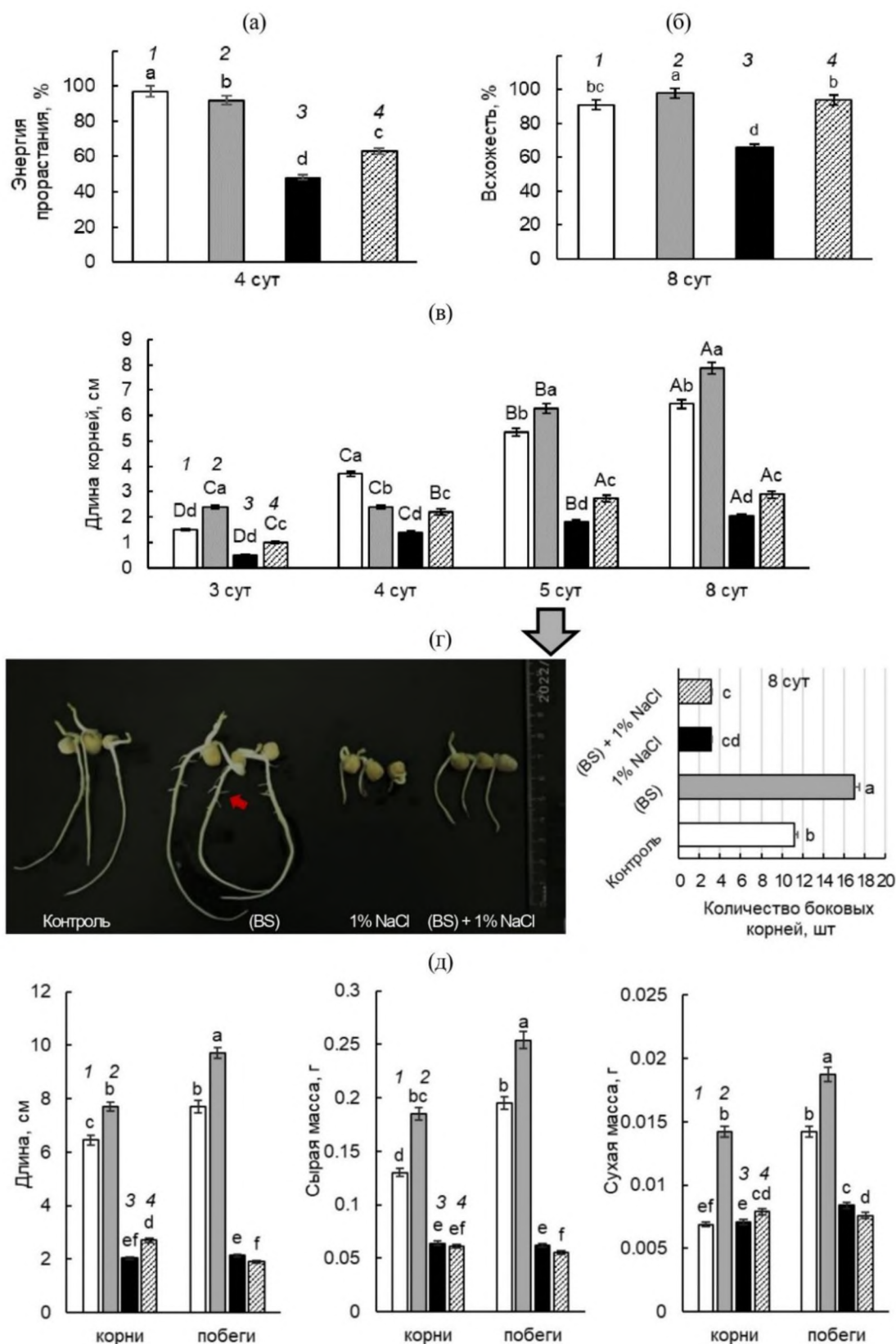


Рис. 3.15. Влияние *B. subtilis* 10-4 (BS) на энергию прорастания (а), всхожесть (б), длину корней (в), количество боковых корней (г), а также длину побегов и накопление сырой и сухой массы корней и побегов (д) проростков гороха (сорт Памяти Хангильдина) в норме и при засолении (1% NaCl). 1 – контроль, 2 – BS, 3 – NaCl, 4 – BS+NaCl. Красной стрелкой указано начало формирования боковых корней у 5-сут проростков

Однако результаты взаимодействия эндофитного штамма *B. subtilis* 10-4 с растениями гороха, и, в частности, с районированным сортом гороха Памяти Хангильдина, а также их влияние на лигнификацию корней (рис. 3.23а) представлены нами впервые. Выявленная при инокуляции *B. subtilis* 10-4 стимуляция роста главного и боковых корней при засолении (рис. 3.15в,г) свидетельствует о защищенности растений от стресса и поддержку их водно-питательного режима. Кратковременное торможение роста корня в длину на 4-е сутки в норме у бактеризованных проростков, вероятно, связано с модуляцией фитогормонального баланса (Barnawal et al., 2017; Eichmann et al., 2021), перераспределением ресурсов или инициацией боковых корней. Действительно, к 5-м суткам у бактеризованных уже сформировались боковые корни, отсутствовавшие в контроле (рис. 3.15г). Обнаруженные эффекты влияния штамма 10-4 на рост растений гороха (рис. 3.15) могут быть связаны с такими его характеристиками как продукция ИУК, сидерофоров, а также фиксацией атмосферного азота (табл. 3.2), которые модулируют развитие растений и инициируют симбиотическое взаимодействие.

Учитывая позитивное влияние штамма 10-4 на горох, исследования были расширены на другую важную бобовую культуру – фасоль обыкновенную (*Phaseolus vulgaris* L.) для оценки универсальности выявленных механизмов взаимодействия. Для более четкого выявления эффекта бактерий, следуя подходу Gebeyaw (2020), использовали семена со сниженной всхожестью и повышенный уровень солевого стресса (2%NaCl).

Выявлено, что предпосевная инокуляция *B. subtilis* 10–4 и 26Д достоверно повысила всхожесть семян фасоли: с 39% в контроле до 54% (10–4) и 80% (26Д) как в норме, так и при солевом стрессе (табл. S4). Это подтверждает потенциал данных штаммов для улучшения качества семян. Параллельно выявлена выраженная штамм-специфичность физиологического ответа растений: обработка 10-4 и 26Д вызывала различные реакции в норме и при стрессе (табл. S4). Наблюдаемые различия, вероятно, связаны со штамм-специфичными особенностями метаболизма бактерий, включая синтез регуляторов роста растений и других биологически активных соединений.

У 14-суточных растений фасоли в норме инокуляция не влияла на содержание Хл а и Кар, но снижала уровень Хл b (рис. S12). При стрессе (2% NaCl) у контрольных растений наблюдалось увеличение общего пула фотосинтетических пигментов (Хл а+Хл b+Кар). Инокуляция 10-4 усиливала этот эффект, тогда как 26Д не вызывала изменений (рис. S12а–г). Повышенное накопление Кар при стрессе (особенно при обработке 10-4) (рис. S12в) может выполнять защитную функцию, нейтрализуя АФК и предотвращая фотоокислительные повреждения (Андриянова, Тарчевский, 2000; Cuttriss, Pogson, 2004; Gill, Tuteja, 2010), хотя их динамика при экстремальных нагрузках вариабельна (Demirevska-Kerova et al., 2006). Штамм-специфичность эффектов и умеренная роль пигментов в стрессоустойчивости предполагают вовлечение дополнительных механизмов защиты: модуляции гормонального статуса, оптимизации корневой архитектуры и потенциальной поставки CO₂ эндофитами (до 57% от усвояемого растениями по данным Rho et al., 2018), что поддерживает фотосинтез при закрытых устьицах. Увеличение размера листьев у обработанных растений (рис. S12д,е) также согласуется с улучшением фотосинтетической эффективности.

Результаты дальнейших исследований показали, что предпосевная инокуляция *B. subtilis* 10-4 оказала на ростовые процессы стимулирующий в норме и защитный при воздействии 2%NaCl (рис. 3.16), 12%ПЭГ (табл. 3.6) и 1 мМ ацетата кадмия (Cd) (рис. 3.17) на растения мягкой яровой и озимой пшеницы при воздействии 12%ПЭГ (табл. 3.6) в начальные стадии онтогенеза, а также на растения яровой пшеницы при комбинированном воздействии 12%ПЭГ и фузариоза (*F. culmorum*) (рис. 3.18).

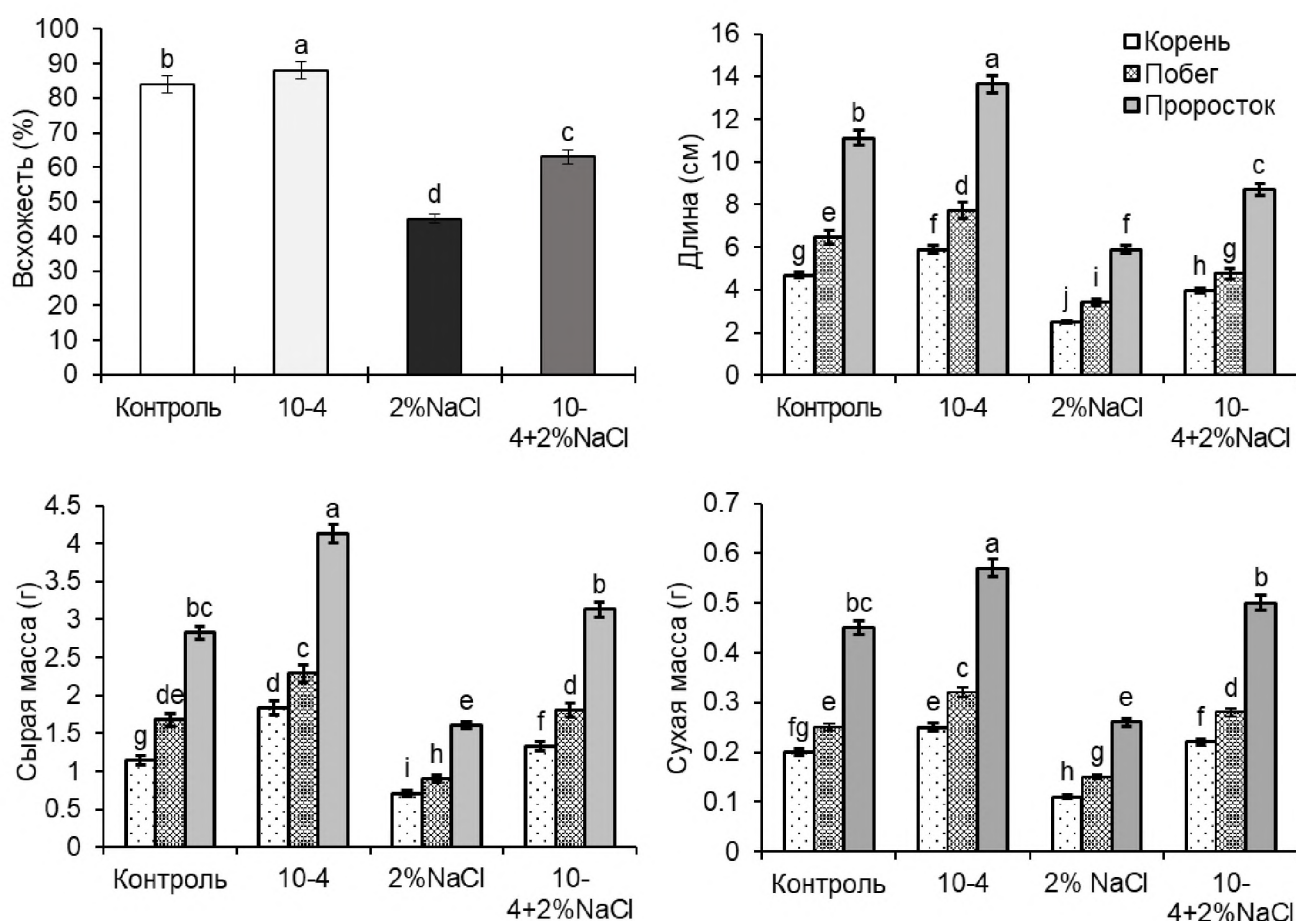


Рис. 3.16. Влияние *B. subtilis* 10-4 на всхожесть и параметры роста (длина, сырая и сухая масса) 6-сут проростков яровой пшеницы сорта Башкирская26 в норме и при засолении (2% NaCl)

Таблица 3.6 – Влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* 10-4 и 24 ч воздействия 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ) на параметры роста 7-сут проростков сортов яровой (Экада70) и озимой пшеницы (Скипетр)

Пшеница	Обработка	Корень			Побег			Площадь флагового листа, см ²
		Длина, см	Сырая масса, г	Сухая масса, г	Длина, см	Сырая масса, г	Сухая масса, г	
Яровая	Контроль	8,7±1,1	56,9±2,8	4,82±0,24	14,6±1,2	100,7±5,0	9,74±0,47	3,5±0,30
	10-4	8,6±1,1	58,6±3,0	5,61±0,28	14,4±1,0	109,2±5,4	11,35±0,56	3,6±0,30
	ПЭГ	8,4±1,7	52,6±2,6	4,85±0,24	14,2±0,8	94,8±4,7	9,91±0,50	3,2±0,16
	10-4+ПЭГ	8,8±1,5	53,8±2,7	5,52±0,28	14,2±1,1	97,7±4,9	11,29±0,50	3,4±0,25
Озимая	Контроль	11,1±1,7	54,0±2,7	4,17±0,20	16,1±1,2	95,5±4,7	9,24±0,49	3,2±0,35
	10-4	12,5±1,8	65,3±3,2	4,53±0,23	17,5±1,3	100,9±5,0	10,40±0,52	3,6±0,30
	ПЭГ	9,2±1,4	50,5±2,5	4,01±0,20	15,9±1,5	89,3±4,4	9,18±0,46	3,1±0,35
	10-4+ПЭГ	11,6±1,2	52,5±2,6	4,27±0,21	16,7±1,1	90,7±4,5	9,52±0,48	3,3±0,30

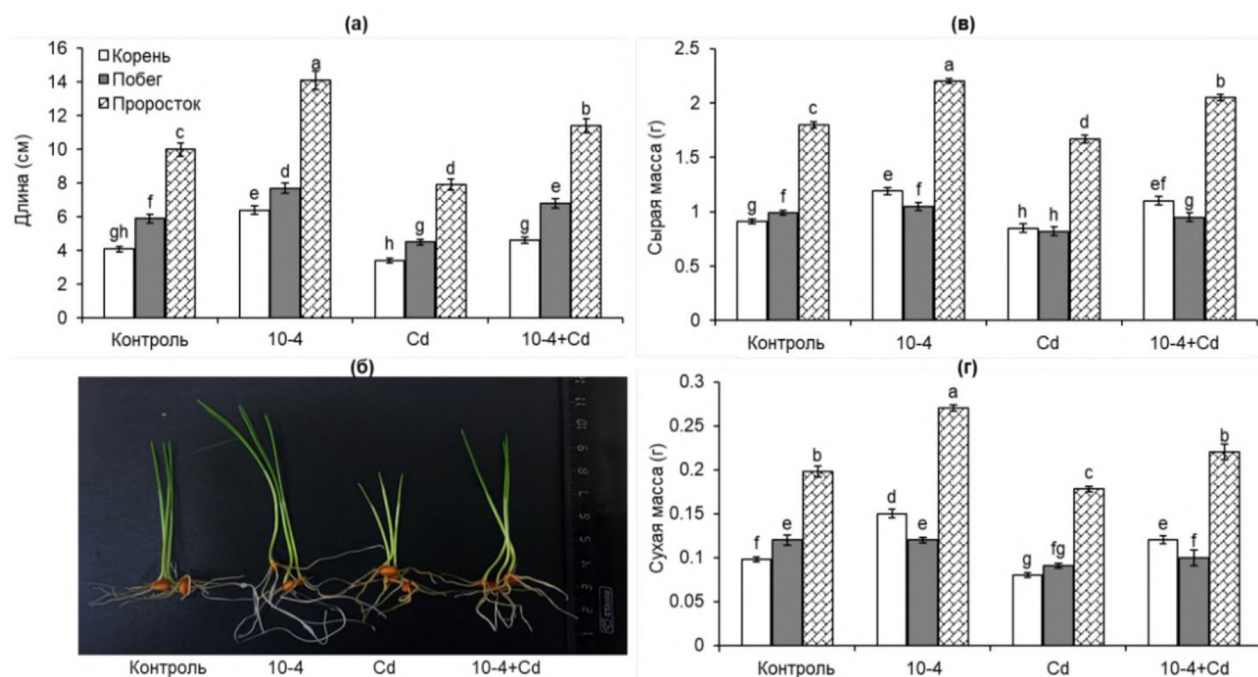


Рис. 3.17. Длина корней, побегов и проростков (а), их внешний вид (б), а также сырая (в) и сухая (г) биомасса 5-сут проростков пшеницы сорта Экада70, инокулированных *B. subtilis* 10-4 и подвергнутых 24 ч воздействию Cd-стресса

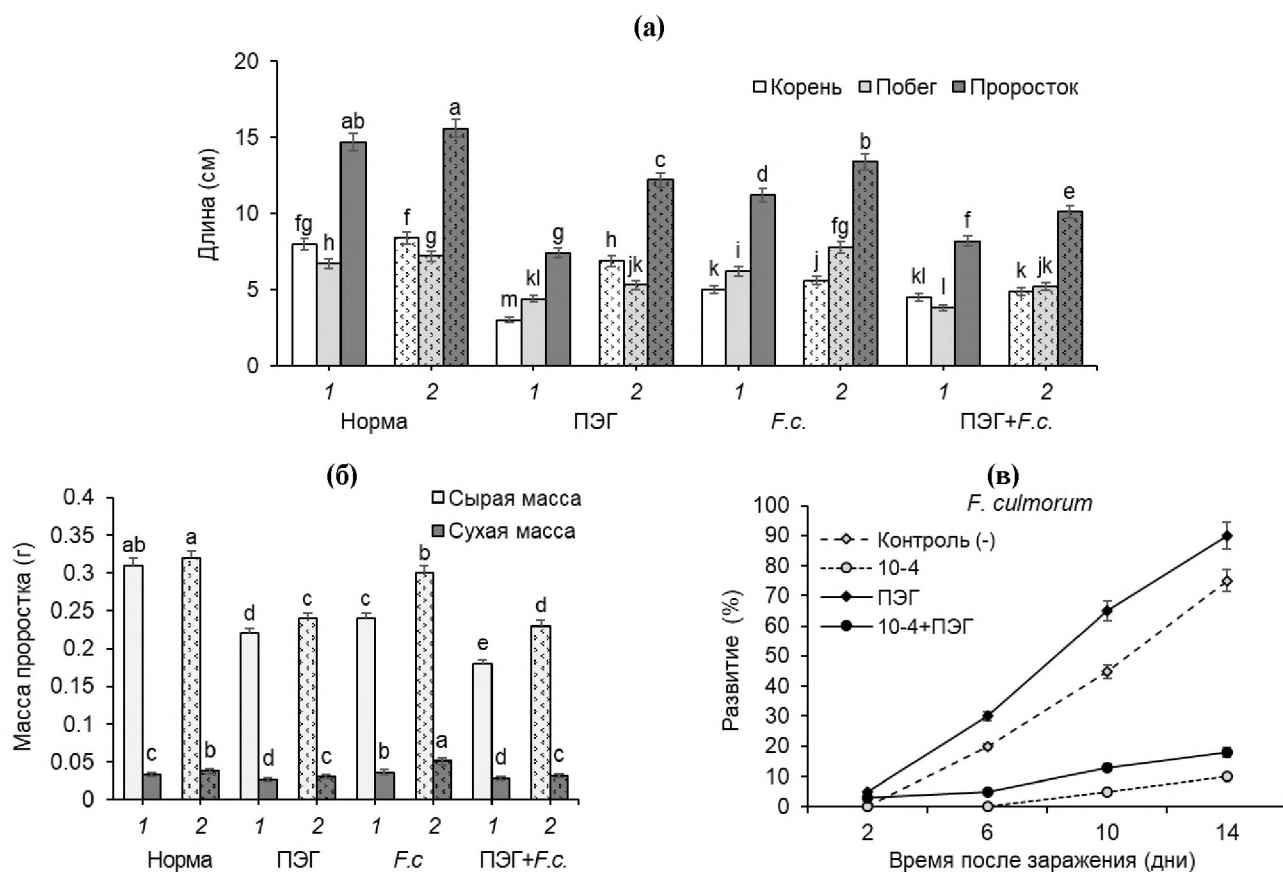


Рис. 3.18. Влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 на длину 14-сут проростков пшеницы сорта Омская35 (а), накопление их сырой и сухой массы (б) при комбинированном воздействии 12%ПЭГ и *F. culmorum* (*F.c.*), а также развитие фузариоза (*F. culmorum*) при водном дефиците, моделированном 12%ПЭГ-6000 (ПЭГ) (в). Время воздействия комбинированного стресса – 11 суток

Стрессовые воздействия влекут за собой различные физиологические изменения: дисбаланс питательных веществ, разрыв мембран, нарушение способности к детоксикации АФК, колебания синтеза и активности антиоксидантных ферментов, уменьшение устьичного отверстия и минимизацию фотосинтетической активности (Marček et al., 2019; Mickky et al., 2020; Tatar et al., 2023). В связи с этим, далее нами была проведена оценка влияния исследуемых эндофитов при различных стрессах на содержание фотосинтетических пигментов, а также МДА и пролина – как маркеров уровня окислительных и осмотических повреждений, соответственно, на различных видах растений.

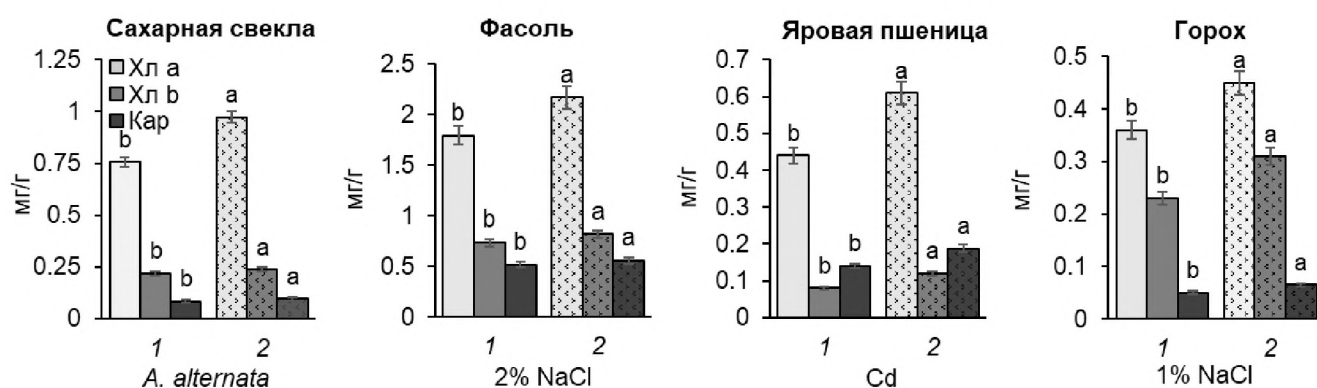


Рис. 3.19. Влияние *B. subtilis* 10-4 на содержание фотосинтетических пигментов (Хл а, Хл b, Кар) в различных видах растений [сахарной свеклы сорта Кампай (35-сут, стресс поражение *A. alternata* – 23 сут), фасоли сорта Золотистая (14-сут, стресс 24 ч), яровой пшеницы сорта Экада70 (5-сут, стресс Cd – 24 ч), гороха сорта Памяти Хангильдина (4-сут, стресс 1%NaCl – 24 ч)] при воздействии разных стрессов [натрий-хлоридное засоление (NaCl), ацетат Cd, инфицирование возбудителем альтернариоза *A. alternata*). 1 – контроль (без инокуляции), 2 – инокуляция 10-4

Результаты показали, что инокуляция *B. subtilis* 10-4 достоверно повышала содержание Хл а, Хл в и Кар (поддерживала повышенный их уровень) у всех изученных растений при различных стрессах в лабораторных (рис. 3.19) и полевых условиях (рис. S7, рис. S8), свидетельствуя о защите их пигментного комплекса, что согласуется с известной способностью PGP-бактерий активировать антиоксидантную систему, нейтрализующую АФК, индуцируемые стрессами и вызывающие деградацию хлорофиллов (Gupta et al., 2021a; 2021b; Sofy et al., 2021). Накопление денатурированных белков и продуктов ПОЛ при стрессе служит как первичным медиатором повреждений, так и индуктором защитных механизмов. Концентрация МДА (конечный продукт ПОЛ)

является ключевым индикатором тяжести окислительного стресса (Morales, Munne-Bosch, 2019; Hasanuzzaman et al., 2020). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 снижала (в разной степени) стресс-индуцированное накопление МДА во всех вариантах (рис. 3.20), указывая на ослабление степени окислительных повреждений. Подобные эффекты описаны в литературе и связываются с контролем PGP-бактериями уровня АФК за счет модуляции активности антиоксидантных ферментов (Gupta et al., 2021a; 2021b; Sofy et al., 2021).

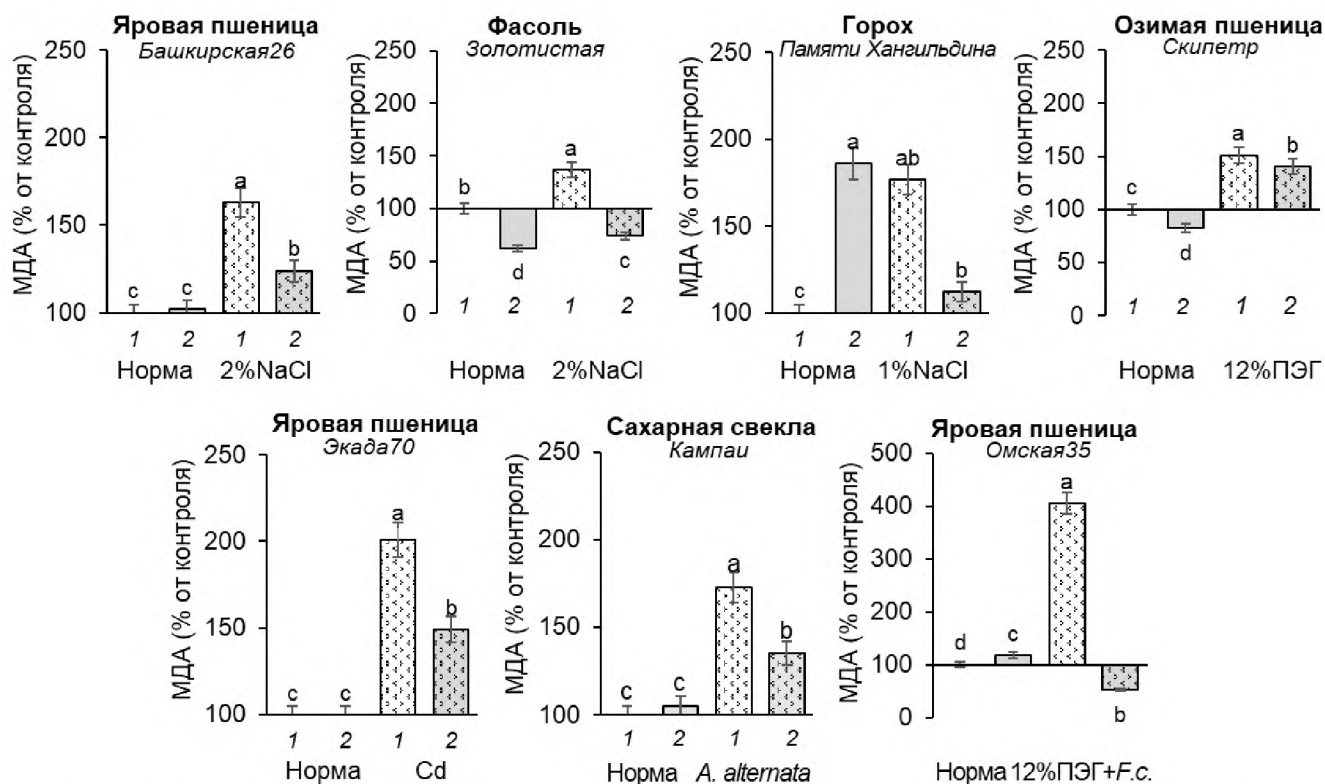


Рис. 3.20. Влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 в норме и при стрессовых воздействиях на концентрацию МДА в растениях яровой пшеницы сортов Башкирская26 (4-сут, стресс 2%NaCl – 24 ч), Экада70 (5-сут, стресс Cd – 24 ч), Омская35 (14-сут, стресс ПЭГ+F.c. – 11 сут), озимой пшеницы сорта Скипетр (7-сут, стресс 12%ПЭГ – 24 ч), сахарной свеклы сорта Кампай (35-сут, стресс поражение *A. alternata* – 23 сут), фасоли сорта Золотистая (14-сут, стресс 2%NaCl – 24 ч), гороха сорта Памяти Хангильдина (4-сут, стресс 1%NaCl – 24 ч)]. NaCl – натрий-хлоридное засоление, ПЭГ – дефицит влаги, Cd – кадмиевый стресс, *A. alternata* – поражение возбудителем альтернариоза, ПЭГ+F.c. – комбинированное воздействие водного дефицита (12%ПЭГ) и фузариоза (*F. culmorum*). 1 – контроль (без инокуляции), 2 – инокуляция 10-4

Иная картина выявлена в нормальных условиях произрастания: бактериальная инокуляция не вызывала значимых изменений уровня МДА у растений сахарной свеклы и яровой пшеницы (хотя и наблюдалась тенденция к увеличению); но достоверно

снижала его у растений озимой пшеницы и фасоли, одновременно повышая у гороха (рис. 3.18). Эти различия согласуются с двойственной ролью МДА – не только как маркера окислительного повреждения, но и как сигнальной молекулы, участвующей в адаптационных процессах (Morales, Munné-Bosch, 2019; Hasanuzzaman et al., 2020).

Колонизация эндوفитами на начальном этапе взаимодействия обычно вызывает у растений иммунный ответ, сходный с таковым против патогенов, но позже мутуалисты избегают защитных реакций хозяина и способны успешно колонизировать растения (Hardoim et al., 2015; Власова и др., 2023). Одним из механизмов защиты эндوفитов от иммунного ответа растений является детоксикация АФК с помощью ферментов СОД, КАТ, пероксидазы, алкил гидропероксидредуктазы и других (Bhore et al., 2010; Tian et al., 2015; Shahzad et al., 2016; Afzal et al., 2019). При соединении MAMPs с соответствующими рецепторами могут высвобождаться АФК, которые запускают каскад реакций, обеспечивающих иммунный ответ. Изъятие АФК из среды с помощью указанных ферментов тормозит иммунный ответ (Sessitsch et al., 2012). Повышение МДА в инокулированных растениях может отражать адаптационные процессы, а не только окислительное повреждение, поскольку МДА способен активировать защитные гены (Morale, Munné-Bosch, 2019). Это согласуется с концепцией МДА как маркера чувствительности растений к эндوفитам (Garipova et al., 2022) и объясняет противоречивые литературные данные: варьирование уровня МДА без корреляции с угнетением роста (Deivanai et al., 2014; Tamošiūnė et al., 2018) и его связь с зонами клеточного деления (Schmid-Siebert et al., 2012). Например, в экспериментах с саженцами яблони было отмечено варьирование концентрации МДА в зависимости от инокуляции разными штаммами, при этом более высокий уровень симптомов окислительного стресса в одних случаях согласовывался с негативным влиянием штамма на рост побегов, в других – уровни МДА были сопоставимы с таковыми у штаммов, стимулирующих рост и пролиферацию побегов (Tamošiūnė et al., 2018). При инокуляции риса эндوفитные бактерии вызывали контрастные реакции растений по уровню МДА, сохраняя при этом растения метаболически сбалансированными без признаков угнетения роста (Deivanai et al., 2014). Высокие уровни МДА были обнаружены в делящихся клетках в зоне пролиферации клеток кончика корня *Arabidopsis* (Schmid-

Siegert et al., 2012). Выявленное нами существенное увеличение МДА в инокулированных растениях гороха в норме (рис. 3.20), вероятно, отражает системную перестройку под действием сигнальных факторов бактерий, запустивших адаптационные процессы растения, включая клеточное деление (появление боковых корней) (рис. 3.15г), благодаря продукции бактериями стимулирующих рост соединений (табл. 3.1), аналогично данным о связи МДА с зонами клеточного деления (Schmid-Siegert et al., 2012). Выявленное снижение уровня МДА в норме у инокулированных растений фасоли и озимой пшеницы (рис. 3.20), вероятно, может быть связано с несколькими взаимосвязанными механизмами, включая активацию антиоксидантных систем даже в отсутствие стресса; улучшение метаболического статуса (бактериальные фитогормоны, осмопротекторы оптимизируют клеточный метаболизм, повышают эффективность фотосинтеза и стабилизируют мембраны); улучшение минерального питания; штаммоспецифичные эффекты (реакция растений может зависеть от способности конкретного штамма продуцировать биологически активные соединения); преадаптация к стрессу (снижение МДА в норме может отражать состояние "метаболической готовности" к потенциальному стрессу вследствие индукции эндоситом слабой сигнальной нагрузки, активируя гены защитных путей, например, синтез осмопротекторов или шаперонов). Для понимания сложных процессов окислительно-восстановительной биологии имеет значение баланс между продукцией, элиминацией и передачей сигналов МДА, обуславливающий выживаемость растений в условиях стресса (Morale, Munné-Bosch, 2019).

Для поддержания водного гомеостаза при стрессе растения активируют экспрессию генов шаперонов, протеаз и их ингибиторов, а также синтезируют низкомолекулярные осмопротекторы (аминокислоты, сахара, бетаины) (Morale, Munné-Bosch, 2019; Hasanuzzaman et al., 2020). Особую роль играет пролин (Kavi et al., 2015) – многофункциональная молекула, выполняющая осморегуляторную, антиоксидантную и стабилизирующую функции, чья аккумуляция координируется с редокс-системой. В наших экспериментах различные стрессовые воздействия достоверно увеличивали содержание пролина у всех изученных видов растений (рис. 3.21). Это согласуется с литературными данными и свидетельствует об активации ферментов биосинтеза

пролина, который выполняет ключевые регуляторные функции: модулирует синтез белков и действует как сигнальная молекула в онтогенезе (Wang et al., 2014), регулирует экспрессию генов циклина и биосинтез лигнина (Kavi et al., 2015; Guan et al., 2019). Результаты наших исследований выявили видо- и сортоспецифичность влияния эндофитных бактерий *B. subtilis* 10-4 на пул пролина (рис. 3.21).

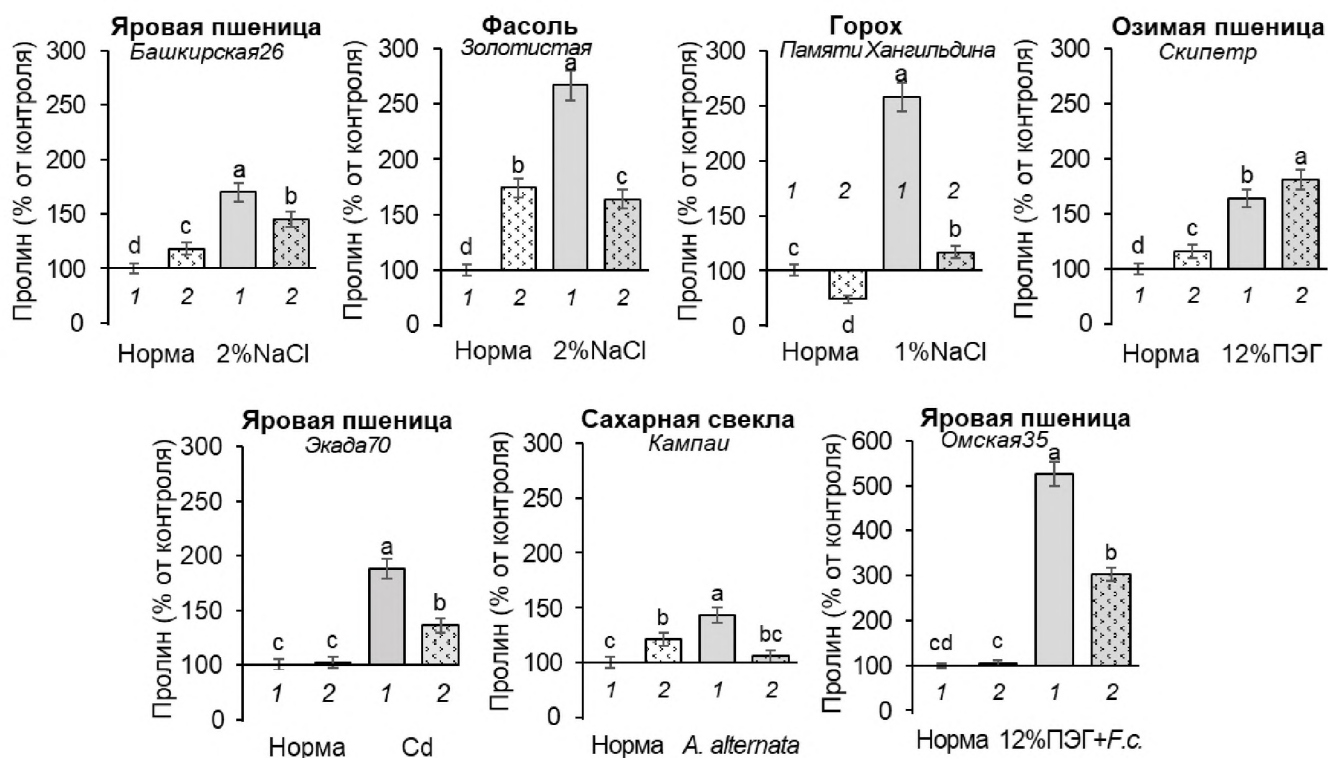


Рис. 3.21. Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* 10-4 в нормальных и стрессовых условиях на содержание пролина в растениях яровой пшеницы сортов Башкирская26 (4-сут, стресс 2%NaCl – 24 ч), Экада70 (5-сут, стресс Cd – 24 ч), Омская35 (14-сут, стресс 12%ПЭГ+*F. culmorum* (F.c.) – 11 сут), озимой пшеницы сорта Скипетр (7-сут, стресс 12%ПЭГ – 24 ч), сахарной свеклы сорта Кампай (35-сут, стресс – поражение возбудителем альтернариоза (*A. alternata*) – 23 сут), фасоли сорта Золотистая (14-сут, стресс 2% NaCl – 24 ч), гороха сорта Памяти Хангильдина (4-сут, стресс 1%NaCl – 24 ч). 1 – контроль (без инокуляции), 2 – инокуляция 10-4

Так, в норме инокуляция повышала содержание пролина у растений фасоли (сорт Золотистая), сахарной свеклы (Кампай), озимой (Скипетр) и яровой пшеницы (Башкирская26), не влияла на растения яровой пшеницы сортов Экада70 и Омская35, но снижала у растений гороха (Памяти Хангильдина) (рис. 3.21). При различных стрессовых воздействиях (1% и 2%NaCl, 12%ПЭГ, Cd, альтернариоз (*A. alternata*), 12%ПЭГ+фузариоз (F.c.)) инокуляция подавляла накопление пролина у всех культур, кроме озимой пшеницы, где наблюдалось дополнительное его накопление (рис. 3.21).

Эти данные согласуются с литературными данными о видоспецифичных эффектах: например, инокуляция *B. cereus* BST YS1_42 и *B. marisfavi* CHR JH 203 подавляла вызываемое засолением накопление пролина у растений гороха и оказывала защитный эффект на их рост, тогда как в норме, напротив, наблюдалось увеличение его накопления (Gupta et al., 2021), что подтверждает сложную контекст-зависимую природу регуляции осмолитов PGP-бактериями.

Повышение пролина при бактериальной инокуляции в норме может отражать его участие в поддержании водного баланса, белковом обмене и синтезе соединений, регулирующих рост и преадаптацию к дефициту воды. Однако, остается спорным вопрос: накопление пролина является симптомом стрессовых повреждений или показателем устойчивости к стрессу (Moura et al., 2010). Неоднозначный характер связи между содержанием пролина и стресс-устойчивостью растений может быть обусловлен различной силой стрессовых воздействий в разных экспериментах и сложным взаимодействием пролина с другими стресс-протекторными системами, в частности, с ферментативной антиоксидантной (Четина и др., 2016). Вероятно, выявленные изменения пролина (рис. 3.20) в сочетании с защитой роста растений (рис. 3.13–3.18), подтверждают его полифункциональность: осморегуляция, защита макромолекул от АФК (Moura et al., 2010) и возможное участие в биосинтезе лигнина (Guan et al., 2019). Обращает на себя внимание, что под действием различных стрессов инокуляция *B. subtilis* 10-4 снижала уровень накопления пролина у всех исследованных растений, кроме озимой пшеницы (рис. 3.21). Согласно сложившимся представлениям, пролин служит маркером осмотического стресса, отражающим адаптивную перестройку метаболизма. Как показали результаты сравнительной оценки водного обмена у озимой и яровой пшениц, инокуляция оказывала защитное действие на параметры водного обмена у обоих растений при ПЭГ-индуцированном дефиците воды (рис. 3.22) (Lubyanova et al., 2023).

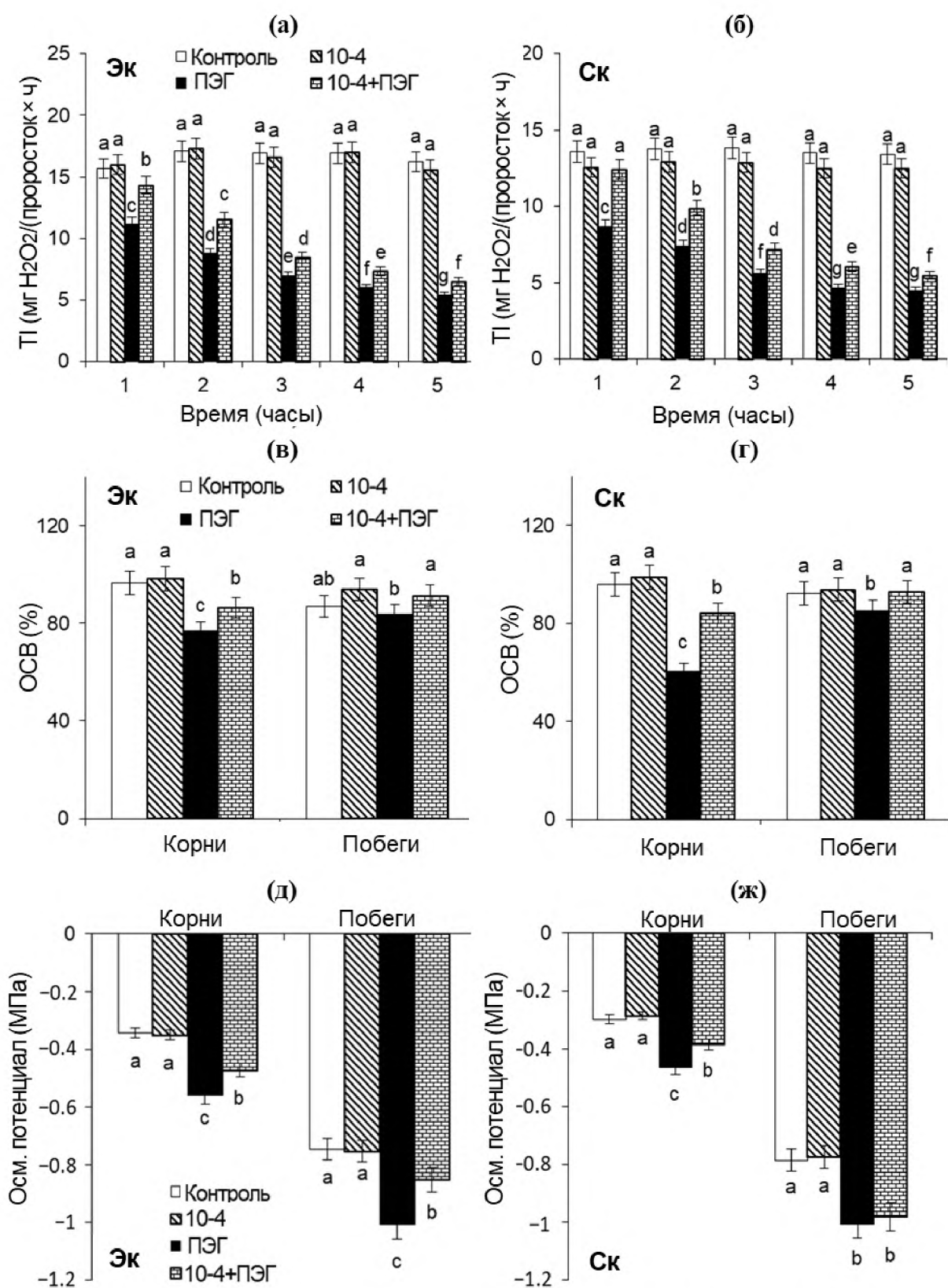


Рис. 3.22. Влияние предпосевной инокуляции семян эндофитом *B. subtilis* 10-4 на интенсивность транспирации (ТИ) листьев (а,б), относительное содержание воды (ОСВ) (в,г) и осмотический потенциал корней и побегов (д,ж) 7-сут проростков яровой пшеницы сорта Экада70 (Эк) и озимой пшеницы сорта Скипетр (Ск) в условиях дефицита воды, модулированного 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ) в течение 5 ч

Регулирование водного статуса сельскохозяйственных культур имеет жизненно важное значение для обеспечения устойчивости к засухе. Одной из первых физиологических реакций растений, вызванных дефицитом воды, является уменьшение устьичной щели (Marček et al., 2019; Mickky et al., 2020; Tatar et al., 2023) и интенсивность транспирации напрямую связана с этим процессом. Установлено, что положительное влияние *B. subtilis* 10-4 на различные параметры роста (длина корней и побегов, накопление сырой и сухой биомассы) (табл. 3.6) сопровождалось позитивным их влиянием на водный баланс уязвимых к засухе молодых проростков яровой и озимой пшеницы (рис. 3.22), включая увеличение интенсивности транспирации (TI) (рис. 3.22а,б), относительного содержания воды (ОСВ) (рис. 3.22в,г), осмотического потенциала клеточного сока (рис. 3.22д,ж) в сравнении с контрольными растениями, подвергнутыми стрессу. Вероятно, выявленные различия в накоплении пролина могут объясняться тем, что озимая пшеница использует пролин не только как осмолит, но и как криопротектор для защиты мембран при температурных колебаниях. Отсутствие в литературе сравнительных данных по влиянию эндофитов на водный обмен у озимых и яровых форм пшеницы подчеркивает новизну наших результатов.

Обнаруженные эффекты подтверждают, что эндофитные бактерии *B. subtilis* 10-4 реализует защиту через видоспецифичные физиологические пути: у яровой пшеницы – преимущественно через оптимизацию осморегуляции, у озимой – через комбинацию осмопротекции и поддержания гидратации тканей: большее поглощение воды, что отражается на сырой массе, длине растений (табл. 3.6), интенсивности транспирации (TI) и ОСВ (рис. 3.22). Эти данные расширяют концепцию RGP-действия бактерий, указывая на необходимость учета фенотипических особенностей растения-хозяина при разработке биопрепаратов.

Параллельно с регуляцией осмотических процессов, ключевым элементом стрессоустойчивости является укрепление клеточных стенок. Поскольку пролин служит предшественником для синтеза ключевых фенилпропаноидов (Kavi Kishor et al., 2015), логично предположить его вовлеченность в лигнификацию – процесс, критичный для укрепления эндо- и экзодермального апопластических барьеров,

играющих важную роль в защите клеточной стенки растений в целом при стрессах (Xie et al., 2018). Среди различных фенольных соединений клетки лигнин отвечает за придание механической прочности и долговечности тканей и важен для правильного роста и развития растений (Xie et al., 2018; Jha, 2017) благодаря облегчению тока воды и поддержанию структурной целостности сосудов ксилемы во время стресса. Между тем, компромисс между ростом и защитой растений имеет основополагающее значение для оптимального роста и адаптации растений в меняющейся биотической/абиотической среде. Считается, что этот процесс включает перераспределение ресурсов по разным путям. Часто наблюдалось, что среди вторичных компонентов клеточной стенки изменение биосинтеза лигнина приводит к изменениям как в росте, так и в защите. Однако, как регулируется этот процесс, на сегодняшний день остается в значительной степени неясным и непредсказуемым из-за ограниченного понимания лежащих в их основе механизмов (Xie et al., 2018). Следует отметить, что к моменту начала наших исследований сведения о влиянии эндофитов на лигнификацию растений отсутствовали, а в отношении RGP-бактерий были единичными. Например, *Pseudomonas aeruginosa* и *B. megaterium* защищали кукурузу от повреждений, вызванных засолением, наряду с усилением роста растений, регулированием содержания воды, повышением содержания фенолов, флавоноидов и антиоксидантных ферментов, что сопровождалось усилением лигнификации (Jha, 2017). Наши данные продемонстрировали значимое усиление лигнификации в клетках корней при инокуляции эндофитами в условиях засоления (рис. 3.23а) и Cd стресса (рис. 3.23б), свидетельствуя об укреплении барьерных свойств растений. Этим, вероятно, обусловлено снижение уровня повреждающего действия фитопатогенов на инокулированные растения пшеницы и потери ими воды при дефиците влаги, а также способность растений в условиях Cd стресса снижать накопление ионов Cd в корнях и препятствовать их транслокации в надземные части (побеги) (рис. 3.22в).

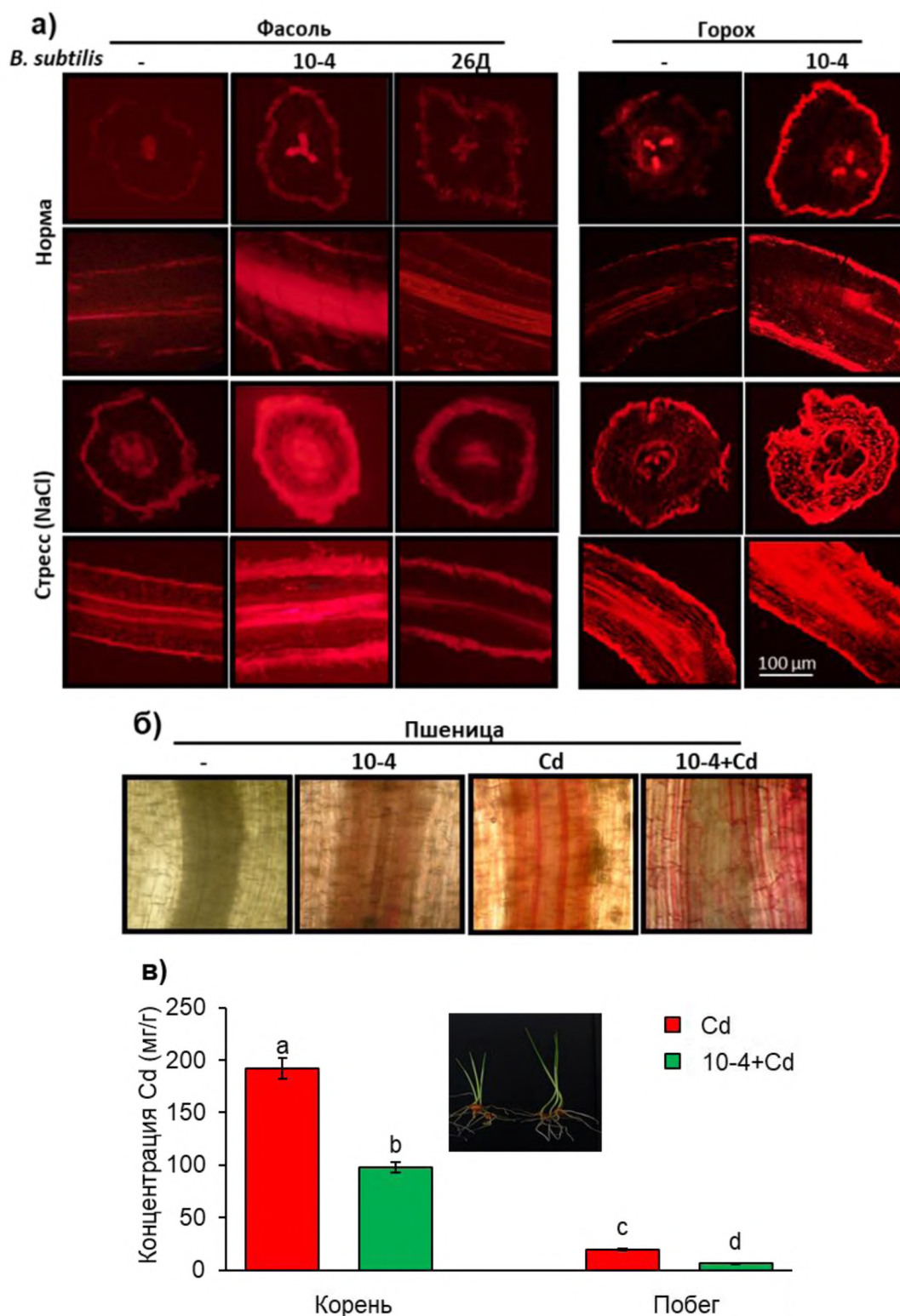


Рис. 3.23. Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* (10-4, 26Д) на лигнификацию клеточных стенок корней растений фасоли (сорт Золотистая) (14-сут, стресс 2%NaCl – 24 ч) и гороха (сорт Памяти Хангильдина) (8-сут, стресс 1%NaCl – 96 ч) в норме и при натрий-хлоридном засолении (NaCl) (а), пшеницы (сорт Экада70) (5-сут, стресс 1 мМ Cd – 24 ч) в норме и при действии ацетата кадмия (Cd) (б) и на накопление Cd растениями (в). На снимках представлены продольные (i) и поперечные (ii) срезы корней, визуализированные с помощью обычного светового и флуоресцентного сканирующего микроскопа Biozero BZ-8100E («Keyence Co.», Япония)

Madhaiyan с соавт. (2007) была показана способность эндофитных бактерий *Methylobacterium oryzae* и *Burkholderia* sp. повышать толерантность растений томатов к никелю и кадмию, хотя механизмы не были рассмотрены. В выявленное повышение устойчивости инокулированных растений, существенный вклад может вносить способность бактерий еще до воздействия стрессоров ускорять отложение лигнина в клеточных стенках корней (рис. 3.23а,б), формируя барьер против токсичных ионов и снижая окислительные (рис. 3.19) и осмотические повреждения (рис. 3.21, 3.22). Это, однако, не препятствует проявлению ростстимулирующего действия (рис. 3.13, табл. S4), вероятно, благодаря продукции бактериальных ауксинов и других рострегулирующих метаболитов (табл. 3.2).

Основываясь на сведениях о способности пролина влиять на рост и развитие растений путем координации с биосинтезом лигнина (Guan et al., 2019), можно предположить, что выявленное в норме снижение пролина в обработанных штаммом 10-4 растениях гороха (рис. 3.21) связано с его расходом для синтеза лигнина (рис. 3.23), вносящего важный вклад в защиту растений от осмотических (рис. 3.21, 3.22) и окислительных (рис. 3.20) повреждений клеток при засолении благодаря корням, имеющим прочный барьер (рис. 3.23а,б), что препятствует проникновению токсичных ионов в клетки (рис. 3.23в). Вместе с тем, у растений фасоли и гороха в норме инокуляция одним и тем же штаммом 10-4 сопоставимо усиливала лигнификацию клеток корней (рис. 3.23а), тогда как приводила к повышению содержания пролина для фасоли, а для гороха, напротив, достоверно снижала (рис. 3.21), указывая на альтернативные регуляторные пути.

Эти данные подчеркивают сложную видовозависимую природу взаимодействия "эндофит-растение" в контроле лигнификации. Вместе с тем, усиленная эндофит-опосредованная лигнификация корней не только повышает стрессоустойчивость, но и формируя функционально оптимизированную корневую систему (увеличение механической прочности проводящих пучков, повышение эффективности водопоглощения) может напрямую влиять на продуктивность растений в полевых условиях, что подтверждается данными по урожайности (табл. 3.7).

Таблица 3.7 – Влияние инокуляции эндофитными бактериями *B. subtilis* 10-4 и 26Д на урожайность различных 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 ^c	44,3 ^c	25,4 ^c	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%)

Вместе с тем прибавка продуктивности растений в полевых условиях значительно варьировала в зависимости от вида растения. Существенная прибавка в урожае сахарной свеклы, на наш взгляд, может быть связана с синергетическим положительным взаимодействием бактерий с биологически активными соединениями, которыми была пропитана производителем защитная оболочка семян. Касательно других культур, семена не подвергались дополнительным протравливаниям и обработкам, а максимальная прибавка была отмечена для яровой пшеницы (2020 г.) в вариантах с применением штаммов 10-4 (+30%) и 26Д (+21%). Максимальная вариация эффективности инокуляции была отмечена для фасоли: в зависимости от штамма прибавка урожая варьировала от 4% (10-4) до 39% (26Д).

Таблица 3.8 – Структурный анализ и продуктивность мягкой яровой пшеницы сорта Башкирская26 (2020 г., полевые опыты)

Вариант	Число продуктивных стеблей (шт./раст.)	Длина колоса средняя (см)	Длина колоса суммарная (см)	Количество семян (шт./раст.)	Масса семян (г/раст.)	Урожай (ц/га)
Контроль	1,03±0,03 ^c	6,23±0,19 ^c	6,37±0,18 ^c	19,3±1,2 ^c	0,63±0,04 ^c	24,3±1,2 ^c
<i>B. subtilis</i> 10-4	1,97±0,17 ^a	6,97±0,14 ^a	13,45±1,12 ^a	37,3±3,4 ^a	1,30±0,13 ^a	38,5±1,9 ^a
<i>B. subtilis</i> 26Д	1,40±0,09 ^b	6,40±0,22 ^b	8,57±0,55 ^b	25,7±1,6 ^b	0,93±0,06 ^b	29,4±1,5 ^b

Следует отметить, что вегетационный сезон 2020 года характеризовался как умеренной засухой, так и развитием эпифитотии листовых болезней на пшенице. Синергическое действие абиотического (засуха) и биотического (патогены) стрессов обусловило высокий уровень поражения растений в контроле: степень развития болезней достигла 51% (табл. 3.9). Предпосевная инокуляция семян эндофитами достоверно снизила развитие листовых болезней, вызываемых фитопатогенными грибами рода *Alternaria*, до 36% (10-4) и 41% (26Д). Биологическая эффективность *B. subtilis* 10-4 и 26Д составила 31% и 21%, соответственно.

Таблица 3.9 – Распространенность и развитие листовой болезни (альтернариоза) мягкой яровой пшеницы сорта Башкирская26 (2020 г., полевые опыты)

Вариант	Степень развития (%)	Распространенность (%)	Биологическая эффективность (%)
Контроль	51,23±2,64 ^c	100 ^a	- ^c
<i>B. subtilis</i> 10-4	35,77±2,97 ^a	100 ^a	31 ^a
<i>B. subtilis</i> 26Д	41,03±2,96 ^b	100 ^a	21 ^b

В целом, полученные результаты по индукции системной устойчивости к патогенам согласуются с представленными выше данными об *in vitro* фунгистатической активности и протекторном действии исследуемых эндофитов на растения в условиях абиотических стрессов (засуха, засоление, тяжелые металлы) и подтверждают общий вывод об их эффективности как перспективных естественных биорегуляторов роста и индукторов фитоиммунитета для повышения продуктивности и комплексной устойчивости растений к широкому спектру неблагоприятных факторов. Это согласуется с современными литературными данными, демонстрирующим потенциал эндофитных PGP-бактерий рода *Bacillus* в индукции системной устойчивости (MIST) растений.

Вместе с тем отзывчивость растений на инокуляцию и степень проявления полезных свойств *B. subtilis* варьировала в зависимости от вида растения, стрессового фактора, предполагая наличие множественных систем регуляции взаимодействия растений с микроорганизмами и необходимости детального изучения явления специфичности их действия на растения в стрессовых условиях. Феномен неодинаковой отзывчивости растений на бактериальную инокуляцию описан в литературе (Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Маркова и др., 2023). Результаты комплексного анализа публикаций относительно эффективности использования коммерческого биопрепарата Фитоспорин-М (в основе эндофита *B. subtilis* 26Д), проведенного автором настоящей диссертации [и изложенного в обзоре (Пусенкова и др., 2020)], позволили установить, что прибавка биологической урожайности яровой пшеницы при использовании Фитоспорина-М в разные годы на разных сортах пшеницы может существенно колебаться (от 2,6 до 146,3%). Это предполагает, что одним из ключевых факторов эффективности применения эндофитных бактерий *B. subtilis* становится фактор сорта, на котором он используется.

Разнообразие сортов мягкой пшеницы, возделываемой в нашей стране, как уже упоминалось нами ранее, разделяется на ряд агроэкологических групп (экотипов), сформировавшихся в ходе естественного и искусственного отборов в разных, различающихся по природно-климатическим особенностям регионах нашей страны (Якубцинер, 1957; Жученко, 2002). Наиболее распространенными в России экотипами пшеницы, имеющими важное экономическое значение, являются лесостепной западносибирский (ЛСЗС) и степной волжский (СВ), представляющие, соответственно, Западную Сибирь и Поволжье – крупнейшие регионы-производители яровой пшеницы. Растения этих экотипов обладают разными стратегиями адаптации к недостатку влаги в начальные этапы онтогенеза: растения ЛСЗС экотипа характеризуются быстрым ростом в ранние фазы развития и замедленным во второй половине вегетации для избегания летней засухи (Мухитов, Самуилов, 2012); тогда как растения СВ экотипа – замедленным ростом в ранние фазы развития для избегания весенней засухи и быстрый рост во вторую половину вегетации (Цыганков, 2011). Хотя в мировой науке, как уже ранее отмечалось, исследовалась сортоспецифичность культурных растений при инокуляции PGP-бактериями (Aldesuquy, Ghanem, 2015; Курамшина и др., 2019; Маркова и др., 2023), однако, к моменту начала нашей работы, сведения о влиянии PGP-бактерий, включая эндофитные *B. subtilis*, на растения пшеницы с разными стратегиями адаптации к засухе отсутствовали, что обуславливает высокую степень новизны и значимости проводимых исследований. Детальное изучение естественных механизмов эндофит-опосредованной устойчивости растений является крайне важным для активного управления ими с целью повышения продуктивности растений. В связи с этим, далее нами было проведено комплексное изучение особенностей влияния эндофитных бактерий *B. subtilis* на физиолого-биохимические и молекулярные механизмы устойчивости мягкой яровой пшеницы с различными стратегиями адаптации к засухе на начальных этапах онтогенеза.

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

4.1. Инокуляция эндофитными *B. subtilis* по-разному модулирует прорастание семян и рост проростков пшеницы с контрастными стратегиями адаптации в условиях дефицита воды на ранних этапах онтогенеза

Ранний этап онтогенеза, во время которого растения наиболее чувствительны к дефициту влаги, представляет собой критически важную фазу в их развитии. В результате проведенного анализа выявлено разнонаправленное влияние *B. subtilis* (10-4, 26Д) на засухоустойчивость растений пшеницы, различающихся (контрастных) по стратегии адаптации к обезвоживанию на начальных этапах онтогенеза и принадлежащих к разным экотипам (рис. 4.1, рис. 4.2, табл. 4.1). Как видно, инокуляция способствовала лучшему прорастанию семян сортов Саратовская55 и Экада70 (представители СВ экотипа) (рис. 4.1а) в условиях моделируемого дефицита влаги, тогда как практически не оказывала (при умеренном стрессе), или, напротив, в некоторых случаях, даже ингибировала (при сильном стрессе) прорастание семян сортов Омская35 и Салават Юлаев (представители ЛСЗС экотипа) (рис. 4.2б). Следует отметить, что в контроле (без инокуляции) растения исследуемых сортов демонстрировали изначально разный уровень засухоустойчивости, по всей видимости, обусловленный их стратегиями адаптации в начальные этапы онтогенеза (Мухитов, Самуилов, 2007). Семена сортов Саратовская55 и Экада70 (рис. 4.1а) лучше прорастали на градиенте сахарозы в сравнении с семенами сортов Омская35 и Салават Юлаев (рис. 4.2б). Это согласуется с данными о лучшей засухоустойчивости сортов СВ экотипа Саратовской селекции на ранних этапах онтогенеза относительно сортов Омской селекции (Мухитов, Самуилов, 2007). Что касается выявленного улучшения прорастания инокулированных семян сортов СВ экотипа (рис. 4.1а), то это также согласуется с данными литературы о повышении устойчивости пшеницы к дефициту влаги и хлоридному засолению под влиянием обработки штаммами *B. subtilis* (включая 26Д) (Хайруллин и др., 2007). Однако, в случае сортов ЛСЗС экотипа, выявленный ингибирующий эффект инокуляции

на прорастание семян, вероятно, связан с особенностями жизненного цикла яровых мягких пшениц этого экотипа, характеризующегося замедленным темпом развития и кущения, что позволяет им хорошо переносить весеннюю засуху (Якубцинер, 1957).

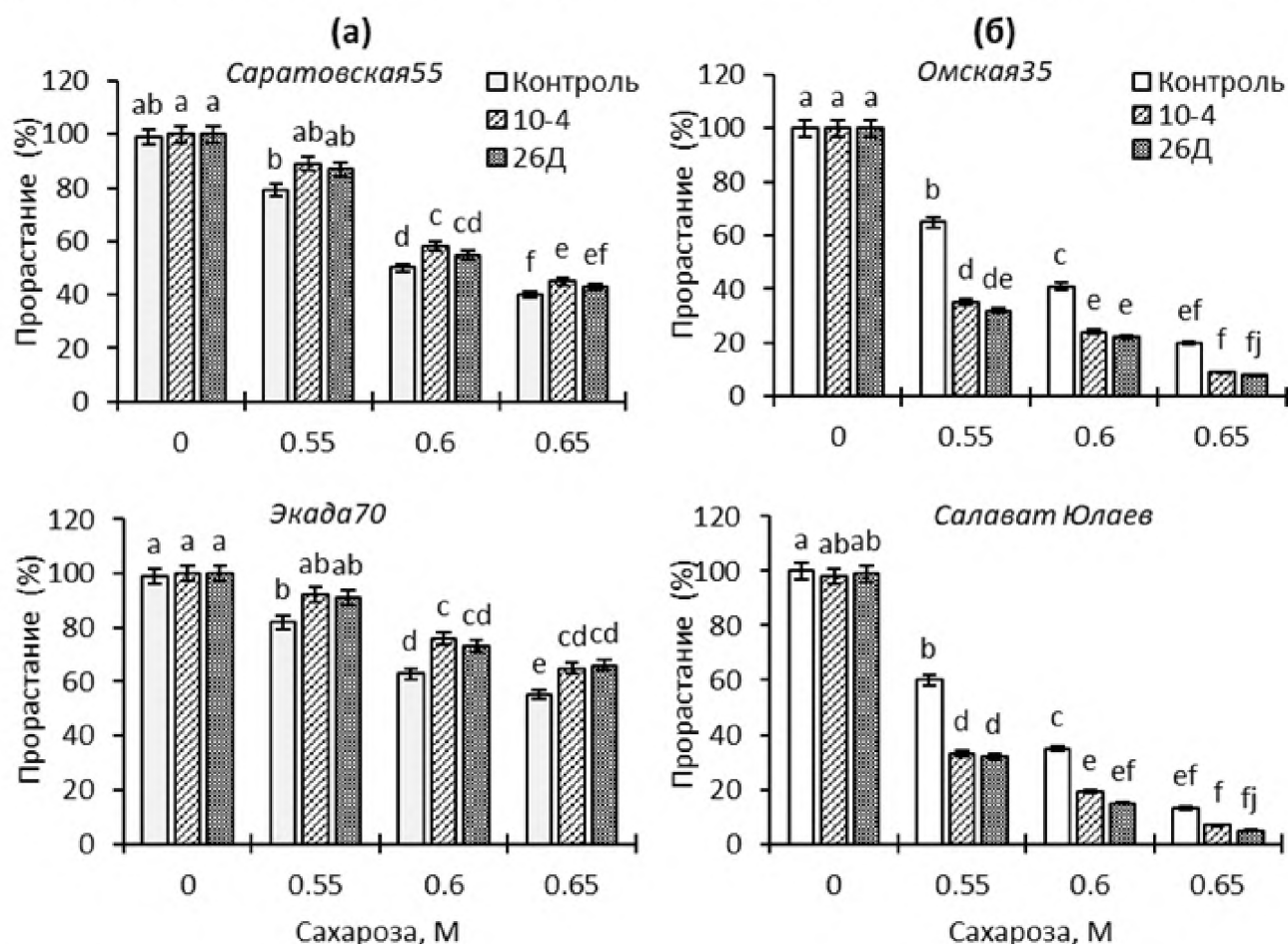


Рис. 4.1. Влияние возрастающего дефицита влаги и инокуляции эндофитными бактериями *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на прорастание семян мягкой яровой пшеницы сортов степного волжского (Саратовская55, Экада70 (а)) (устойчивые) и лесостепного западносибирского (Омская35, Салават Юлаев (б)) (чувствительные) экотипов в присутствии высоких концентраций сахарозы (0,55М (16 атм.), 0,6М (18 атм.), 0,65М (20 атм.)) через 5 суток после посева (5-сут проростки)

Поскольку хорошо известно, что лидирующая роль в регуляции жизнедеятельности растений на всех этапах развития отводится гормональной системе (Shakirova et al., 2010), а микроорганизмы, в свою очередь, являются продуцентами метаболитов с гормональными и сигнальными функциями (Максимов и др., 2015), то не исключено, что наблюдаемый эффект связан с дисбалансом гормонального статуса растений в моделируемых условиях засухи под влиянием обработки бактериями. Примененная методика оценки засухоустойчивости, коррелирующая с полевыми

показателями (Удовенко, 1988; Мухитов, Самуилов, 2007), позволила провести сравнительный анализ с литературными данными по эффективности Фитоспорина-М (на основе *B. subtilis* 26Д) для яровой мягкой пшеницы в засушливые годы с учетом экотипической принадлежности сортов. Так, предпосевная обработка Фитоспорином-М семян сорта Салават Юлаев (представитель ЛСЗС экотипа) (Зыкин, Кираев, 2011) в относительно засушливом 2010 г. обеспечила прибавку урожайности на 15% по сравнению с контролем (Веселов и др., 2013). В слабо засушливом 2006 г. зафиксирован максимальный эффект на сорте Юго-Восточная 2 – прибавка урожайности на 77.5%; в засушливом 2009 г. показатель снизился до 30.5% (Соловых, Каплин, 2012). Хотя нам не встретилось прямое указание на экотипическую принадлежность сорта Юго-Восточная 2, тем не менее, ряд его адаптивных признаков позволяет ассоциировать его со СВ экотипом. Подробный анализ эффективности применения Фитоспорина-М на яровой мягкой пшенице, в т.ч. в контексте экотипов, представлен в нашей обзорной работе (Пусенкова и др., 2021). Необходимо отметить, что засухоустойчивость как комплексный признак может формироваться поэтапно и временное подавление бактериями прорастания семян в условиях моделируемой засухи (рис. 4.1б) не исключает позитивного их вклада на последующих этапах онтогенеза. Не исключено, что бактерии могут замедлить прорастание для избегания стресса на критически уязвимой стадии с целью сохранения ресурсов и потенциала устойчивости при формировании проростков. В подтверждение этому предположению ранее нами наблюдалось недолговременное торможение роста корней в длину относительно контроля у бактеризованных 4-сут проростков гороха в норме, вероятно, в связи с модуляцией бактериями фитогормонального баланса в корнях (Barnawal et al., 2017; Eichmann et al., 2021), перераспределением ресурсов в сторону побега и перехода к закладке боковых корней. Так, на 5-е сутки инокулированные проростки имели сформировавшиеся боковые корни при отсутствии таковых в контроле (рис. 3.13) (Ласточкина и др., 2023).

Дальнейшие эксперименты в нормальных условиях произрастания показали выраженное положительное влияние инокуляции *B. subtilis* на линейные размеры (длину корней и побегов) 6-сут проростков Экада70 (до 30%) (рис. 4.2а), тогда как этот эффект для сорта Салават Юлаев были менее выражен (около 13%) (рис. 4.2б).

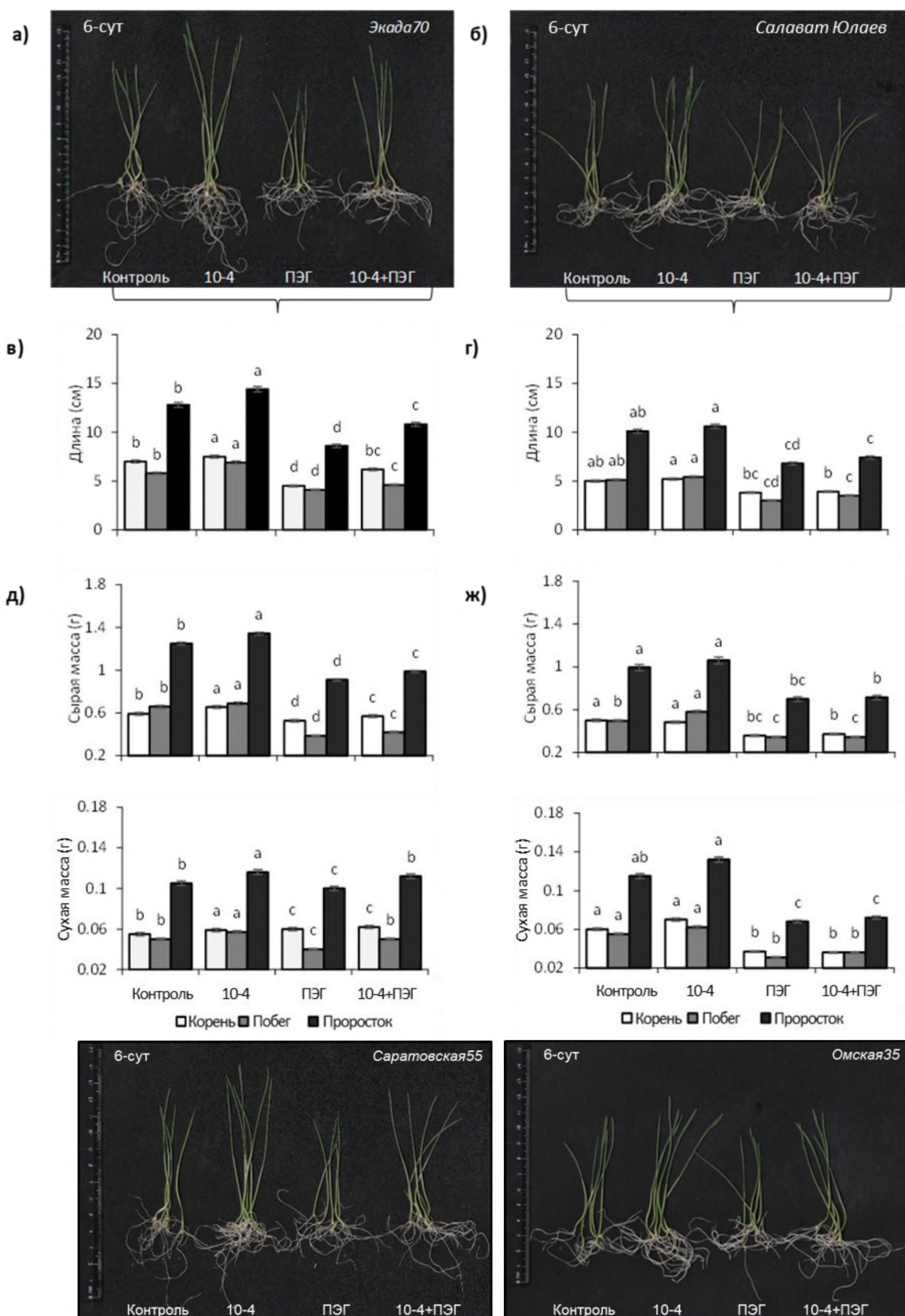


Рис. 4.2. Репрезентативные фотографии инокулированных *B. subtilis* 10-4 шестисуточных проростков пшеницы сортов Экада70 (а) и Салават Юлаев (б) в норме и после 24 ч воздействия 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ), линейные размеры их корней и побегов (в, г), накопление сырой и сухой биомассы (д, ж)

Таблица 4.1 – Влияние инокуляции семян эндофитными бактериями *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на линейные размеры корней и побегов, накопление сырой и сухой биомассы, содержание хлорофиллов (Хл) в шестисуточных проростках пшеницы в норме и при 24 ч воздействии 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ)

Варианты	Длина	Длина	Побег		Корень		Хл (a+b), мг/г сырой массы
	побега, см	корня, см	Сырая масса, г	Сухая масса, г	Сырая масса, г	Сухая масса, г	
Экада70 (степной волжский экотип)							
Контроль	6,9 ^b	5,8 ^b	0,51 ^b	0,05 ^b	0,55 ^c	0,055 ^b	1,23 ^c
10-4	7,9 ^a	7,5 ^a	0,59 ^a	0,06 ^a	0,66 ^a	0,060 ^{ab}	1,38 ^a
26Д	7,4 ^a	7,0 ^a	0,54 ^a	0,06 ^a	0,62 ^a	0,058 ^{ab}	1,31 ^a
ПЭГ	5,1 ^d	4,5 ^c	0,39 ^c	0,04 ^c	0,53 ^d	0,052 ^c	1,10 ^d
10-4+ПЭГ	6,6 ^c	6,2 ^b	0,51 ^b	0,05 ^b	0,60 ^b	0,062 ^a	1,31 ^b
26Д+ПЭГ	6,4 ^c	6,1 ^b	0,49 ^b	0,05 ^b	0,59 ^b	0,056 ^a	1,29 ^b
Салават Юлаев (лесостепной западносибирский экотип)							
Контроль	5,1 ^{ab}	5,0 ^{ab}	0,49 ^b	0,055 ^b	0,50 ^b	0,06 ^b	1,14 ^{ab}
10-4	5,4 ^a	5,2 ^a	0,57 ^a	0,062 ^a	0,58 ^a	0,07 ^a	1,19 ^a
26Д	5,4 ^a	5,2 ^a	0,59 ^a	0,063 ^a	0,59 ^a	0,07 ^b	1,22 ^a
ПЭГ	3,0 ^{bc}	3,8 ^b	0,34 ^{cd}	0,031 ^d	0,35 ^d	0,037 ^c	0,81 ^c
10-4+ПЭГ	3,3 ^b	3,9 ^b	0,34 ^{cd}	0,036 ^c	0,37 ^c	0,036 ^c	1,09 ^b
26Д+ПЭГ	3,4 ^b	3,9 ^b	0,36 ^c	0,039 ^c	0,36 ^c	0,037 ^c	1,12 ^b

Сходная картина наблюдалась и для растений сортов Саратовская55 и Омская35. Применение *B. subtilis* увеличивало длину побегов и корней (на 14% и 29%), сырой (на 15% и 20%) и сухой массы побегов и корней (на 14% и 9%) (рис. 4.2а,в,д), содержание Хл (a+b) (на 12%) для растений сорта Экада70 (рис. 6.1а), в то время как для растений сорта Салават Юлаев отмечено увеличение сырой и сухой массы наземной части (на 16% и 13%) и корней (на 14% и 17%) (рис. 4.2ж) при незначительных изменениях в их длине (рис. 4.2б,г) и содержании Хл (a+b) в листьях (рис. 6.1б).

К простому способу визуальной оценки защитного действия различных препаратов на растения в условиях стресса можно отнести анализ ростовых характеристик. Из рисунка 4.2. видно, что воздействие дефицита влаги привело к торможению роста корней и побегов пшеницы примерно в 1,5–2 раза у изученных сортов. Обработка *B. subtilis* 10-4 значительно уменьшила в 1,3–1,5 раза степень негативного воздействия обезвоживания на ростовые процессы проростков сорта Экада70 (рис. 4.2а,в), что, очевидно, свидетельствует о явном антистрессовом действии эндофита. В то же время для растений сорта Салават Юлаев антистрессовый

эффект эндофита был менее выражен (рис. 4.2б,г). Аналогичные эффекты *B. subtilis* 10-4 наблюдались при накоплении сырой и сухой биомассы (рис. 4.2д,ж).

Таким образом, хотя бактериальная инокуляция по-разному влияла на прорастание семян исследуемых сортов пшеницы в условиях моделируемой дефицита влаги (рис. 4.1), однако на стадии проростков обеспечивала эффективную защиту растений СВ экотипа при отсутствии такого же уровня защитной реакции у инокулированных растений ЛСЗС экотипа (Lastochkina et al., 2020a). Вероятно, наблюдаемые эффекты могут быть связаны с перенастройкой бактериями адаптивных реакций исследуемых сортов пшеницы, направленных на повышение выживаемости растений. Торможение бактериями прорастания семян ЛСЗС экотипа при стрессе может являться элементом адаптивной стратегии, минимизируя энергозатраты на ранних этапах в пользу долгосрочной адаптации.

4.2. Анализ влияния эндофитных бактерий *B. subtilis* на концентрацию пролина в растениях пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями при дефиците влаги

Для поддержания водного гомеостаза между основными внутриклеточными компартментами в условиях обезвоживания важная роль принадлежит совместимым осмолитам, в частности, пролину (Ozturk et al., 2021; Du et al., 2023). Как видно из рисунка 4.3, в нормальных условиях произрастания содержание пролина в растениях различалось в зависимости от сорта и их принадлежности к экотипам: растения сортов Экада70, Саратовская55 характеризовались изначально более высоким содержанием пролина (рис. 4.3а,б), чем растения сортов Салават Юлаев, Омская35 (рис. 4.3в,г). Недостаток влаги приводил к транзиторному накоплению этого осмолита во всех растениях, однако, амплитуда колебаний и скорость ответа была достоверно выше у растений сортов Салават Юлаев, Омская35 (рис. 4.3), что свидетельствует об их большей чувствительности к обезвоживанию и согласуется с их адаптивными стратегиями.

Инокуляция *B. subtilis* предотвращала стресс-индуцированное накопление пролина в проростках сортов Экада70 и Саратовская55 (рис. 4.3а,б), тогда как в проростках сорта Омская35 поддерживала повышенный его уровень (рис. 4.3г), а у

сорта Салават Юлаев приводила к его дополнительному накоплению (рис. 4.3в). Вероятно, выявленное дополнительное накопление пролина может вносить вклад в стабилизацию работы антиоксидантной системы растений, предотвращая нарушения структур и проницаемости клеточных мембран компартментов клеток при стрессе.

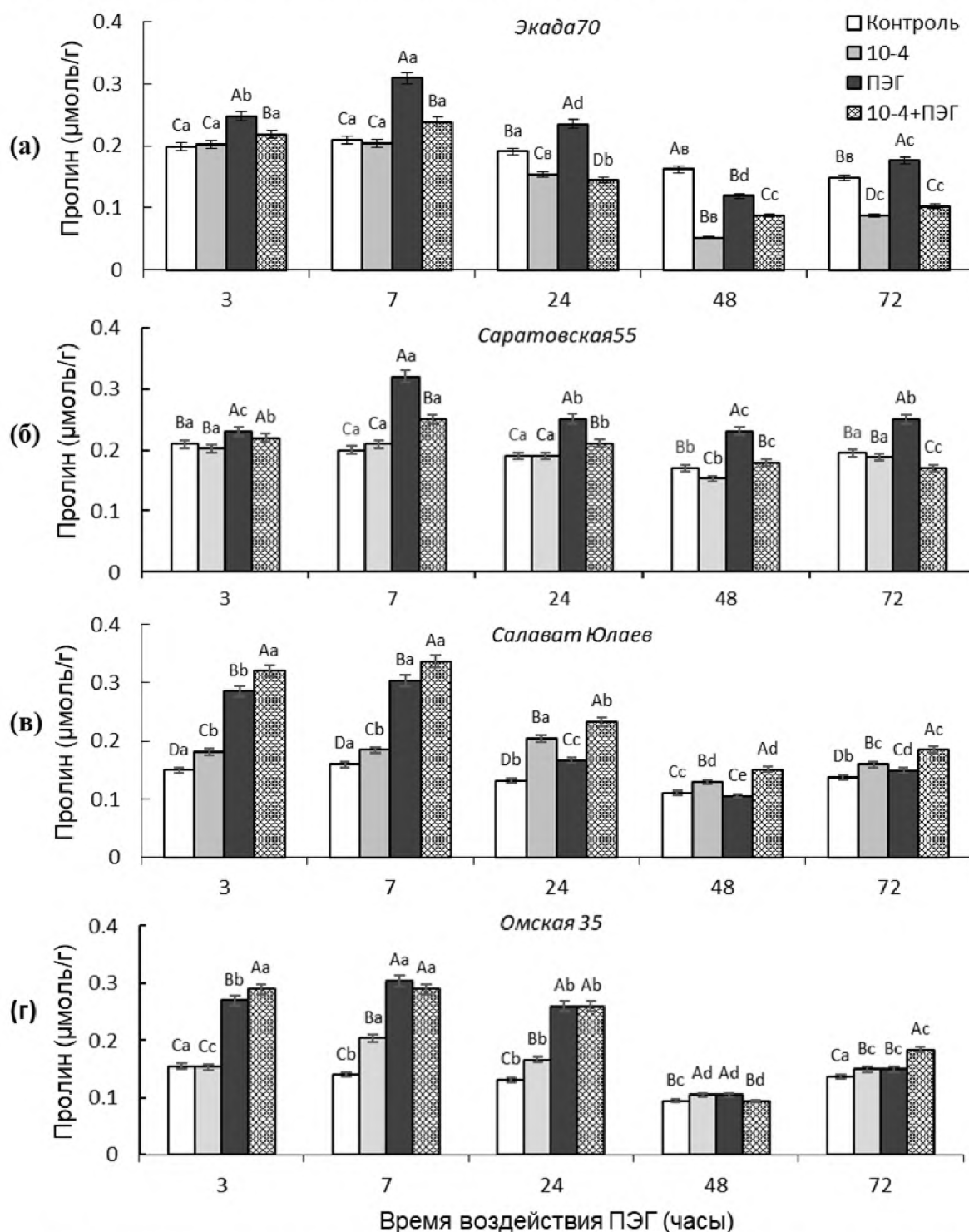


Рис. 4.3. Влияние инокуляции семян клетками штамма *B. subtilis* 10-4 на концентрацию пролина в проростках пшеницы (4–6 суточных) в норме и в условиях дефицита влаги, моделированном 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ) (4 суточные проростки подвергались стрессу в течение 72 ч)

4.3. Влияние инокуляции семян эндофитными *B. subtilis* на проницаемость и целостность мембранных структур клеток пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями в условиях недостатка воды

В условиях дефицита воды растения испытывают окислительный стресс в результате избыточного образования АФК, что может привести к повреждению мембранных структур (Kirova et al., 2021). Предотвращение повреждения клеточных мембран является решающим фактором для того, чтобы растения могли противостоять стрессу. Выявлено, что проростки обоих экотипов, инокулированные *B. subtilis* 10-4 и подвергнутые обезвоживанию, показали снижение стресс-индуцированного накопления МДА и выход электролитов (табл. 4.2), являющихся индикаторами окислительного повреждения мембран. Наши данные согласуются с имеющимися в литературе о способности некоторых PGP-бактерий снижать выработку АФК и повышать активность антиоксидантных ферментов растений при стрессе (Ali et al., 2011; Abd El-Daim et al. 2014; 2019; Park et al., 2017), а также снижать уровни выхода электролитов и МДА по сравнению с неинокулированными растениями в условиях засухи (Gontia-Mishra et al., 2016). Примечательно, что бактериальная обработка оказала более выраженный защитный эффект на растения сорта Экада70, о чем свидетельствует более существенное уменьшение концентрации МДА и выхода электролитов при стрессе. При этом, сама инокуляция штаммом 10-4 вызывала незначительные изменения в уровне накопления МДА и выходе электролитов, что свидетельствует о вполне благоприятном влиянии бактерии на растения обоих экотипов (табл. 4.2).

Таблица 4.2 – Влияние ПЭГ-индуцированного дефицита воды на концентрацию МДА и выход электролитов инокулированных и неинокулированных *B. subtilis* 10-4 проростков пшеницы (6-сут)

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

4.4. Влияние эндофитов *B. subtilis* на водоудерживающую способность растений пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями при обезвоживании

Как видно из рис. 4.4., воздействие дефицита воды снижало в 2–2,5 раза водоудерживающую способность (ВС) листьев растений сортов Омская35, Салават Юлаев (рис. 4.4б) и практически не влияло на этот показатель у растений сортов Саратовская55, Экада70 (рис. 4.4а).

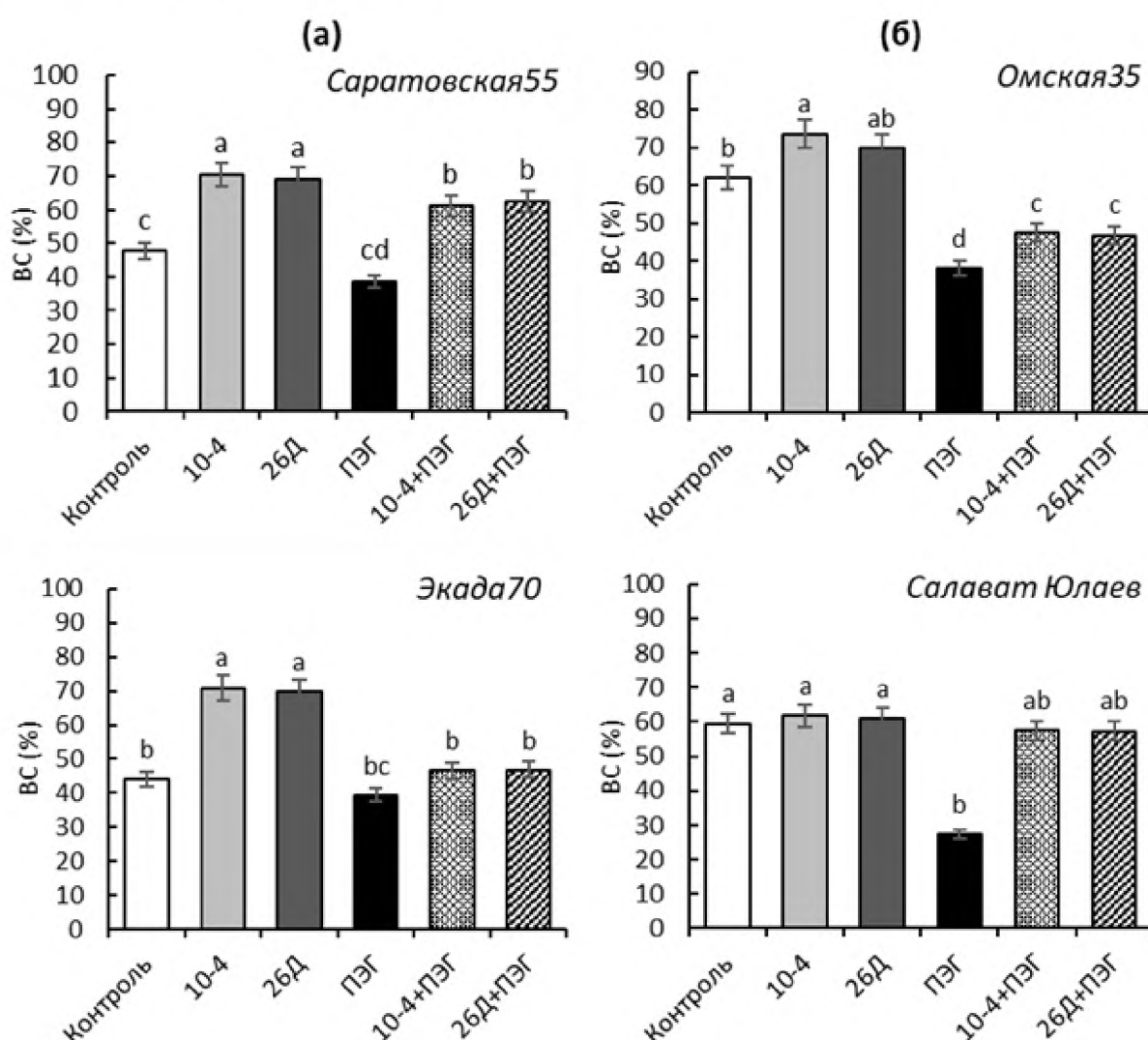


Рис. 4.4. Влияние *B. subtilis* (10-4, 26Д) на водоудерживающую способность (ВС) листьев 21-сут растений пшеницы сортов Саратовская55, Экада70 (а) и Омская35, Салават Юлаев (б) в нормальных условиях произрастания и при воздействии дефицита влаги (12% ПЭГ-6000) через 21 день после посева. Время воздействия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

Обработка штаммами *B. subtilis* 10-4 и 26Д повышала ВС листьев всех исследуемых сортов в норме и при стрессе (рис. 4.4): практически полностью предотвращала вызванное обезвоживанием снижение этого показателя и восстанавливала до контрольных значений, причем у растений сорта Саратовская55 значения превышали контрольные (рис. 4.4а), а у растений сорта Омская55 действие стресса снижалось (рис. 4.4б). В целом, инокуляция штаммами *B. subtilis* повышала устойчивость проростков к дефициту воды с максимальным эффектом на сортах степного волжского экотипа (Экада70, Саратовская55). Однако полученные результаты показывают, что в ответ на инокуляцию *B. subtilis* растения каждого из экотипов могут иметь различные механизмы действия, приводящие к схожему эффекту на уровне морфологии. Причем, наиболее выраженный защитный эффект, как на уровне клеток (табл. 4.1, рис. 4.4), так и на уровне целого организма (без торможения ростовых процессов растений) проявлялся при применении эндофитных *B. subtilis* на сортах степного волжского экотипа (Экада70, Саратовская55) (рис. 4.1, рис. 4.2) (Ласточкина и др., 2017; Lastochkina et al., 2020a).

Таким образом, инокуляция улучшала рост у устойчивых к обезвоживанию проростков сортов Экада70, Саратовская55 (на 30%) и чувствительных проростков сортов Салават Юлаев, Омская35 (на 10%), но защитные эффекты на рост в условиях ПЭГ-индуцированного водного дефицита были выраженными у проростков устойчивых сортов на ранних стадиях онтогенеза. Такие различия в реакции растений на инокуляцию и воздействие водного дефицита, вероятно, обусловлены стратегиями реагирования этих сортов на засуху (Жуковский 1957; Жученко, 2002; Цыганков 2011). Для растений чувствительных сортов (ЛСЗС экотип) характерны медленные темпы развития и кущения на ранних стадиях онтогенеза, что позволяет им хорошо переносить весеннюю засуху (Жуковский 1957). Применение *B. subtilis* на этой стадии онтогенеза, вероятно, приводит к перекрытию программ развития растений, которые эволюционировали для сдерживания роста в течение этой фазы и демонстрируют повышенную всхожесть, продолжительную фазу кущения и быстрое развитие корневой системы. Как результат, инокуляция *B. subtilis* не оказала заметного защитного эффекта на подвергнутые обезвоживанию 6-сут чувствительные

проростки (Салават Юлаев) (рис. 4.2б,г,ж), но даже оказала ингибирующий эффект при прорастании семян в присутствии высоких концентраций сахарозы (рис. 4.1б). Напротив, устойчивые проростки сортов Экада70, Саратовская55 (СВ экотип) запрограммированы на интенсивный рост в начале вегетационного периода, обусловленного запасом весенней влаги в почве, и последующая засуха, характерная для лета, приводят к формированию хорошо разветвленной корневой системы, что способствует формированию урожая (Жуковский 1957). Применение клеток бактерий *B. subtilis* на этом этапе онтогенеза, скорее всего, усилило запрограммированную способность растений к быстрому росту, как в обычных условиях, так и в условиях стресса (рис. 4.2а,в,д). В то же время на клеточном уровне защитный эффект *B. subtilis* в условиях водного дефицита был проявлен заметно для обоих экотипов: снижение МДА, экзоосмоса электролитов (табл. 4.1), поддержание повышенного уровня хлорофиллов (рис. 6.1) и ВС листьев (рис. 4.4а). Вместе с тем, выявленные различия в накоплении пролина под влиянием эндофитов в растениях разных экотипов могут свидетельствовать о способности *B. subtilis* (одного и того же штамма) задействовать разные их пути защиты. Следовательно, понимание механизмов взаимодействия эндофитных *B. subtilis* с растениями пшеницы с разными (контрастными) стратегиями адаптации к водному дефициту является чрезвычайно важным.

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

5.1. 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 адаптации к стрессам (Shakirova et al., 2010; 2012; Backer et al., 2018). В нашем исследовании анализ эндогенных АБК, ИУК и ЦК у двух сортов пшеницы с разными (контрастными) адаптивными стратегиями при водном дефиците выявил более высокие исходные уровни ЦК и АБК у растений сорта Экада70 по сравнению с Салават Юлаев, тогда как уровни ИУК оставались сходными у растений обоих сортов на протяжении всего эксперимента (рис. 5.1). Очевидно, эти различия в гормональном статусе могут определять как устойчивость растений к стрессам, так и чувствительность к бактериальным фитогормональным соединениям.

В нормальных условиях произрастания инокуляция *B. subtilis* 10-4 повышала в проростках обоих исследуемых сортов пшеницы уровень ИУК в 1,5 (Салават Юлаев) и 2 раза (Экада70) (рис. 5.1а), тогда как уровни АБК и ЦК оставались относительно стабильными (рис. 5.1б,в). Это, вероятно, объясняет более выявленный выраженный рост растений сорта Экада70 по сравнению с растениями сорта Салават Юлаев (рис. 4.2). При дефиците воды у контрольных растений наблюдался ярко выраженный гормональный дисбаланс: резкое увеличение АБК (особенно у растений сорта Салават Юлаев) (рис. 5.1б) на фоне стойкого снижения ИУК (рис. 5.1а) и ЦК (рис. 5.1в), что отразилось в торможении роста растений обоих экотипов (рис. 4.2). Такие изменения были ожидаемыми, так как типичны для стрессового ответа растений (Llanes et al., 2016; Rowe et al., 2016). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 оказала ярко выраженный защитный эффект на растения при стрессе (особенно для растений сорта Экада70), о чем свидетельствуют существенно меньшие по амплитуде стресс-индуцированные перестройки в состоянии гормональной системы (рис. 5.1), а именно, поддержание

уровня ИУК близким к контролю (рис. 5.1а), снижение стресс-индуцированного накопления АБК (рис. 5.1б) и минимизация падения ЦК (рис. 5.1в), что отразилось в нормализации роста растений (рис. 4.2).

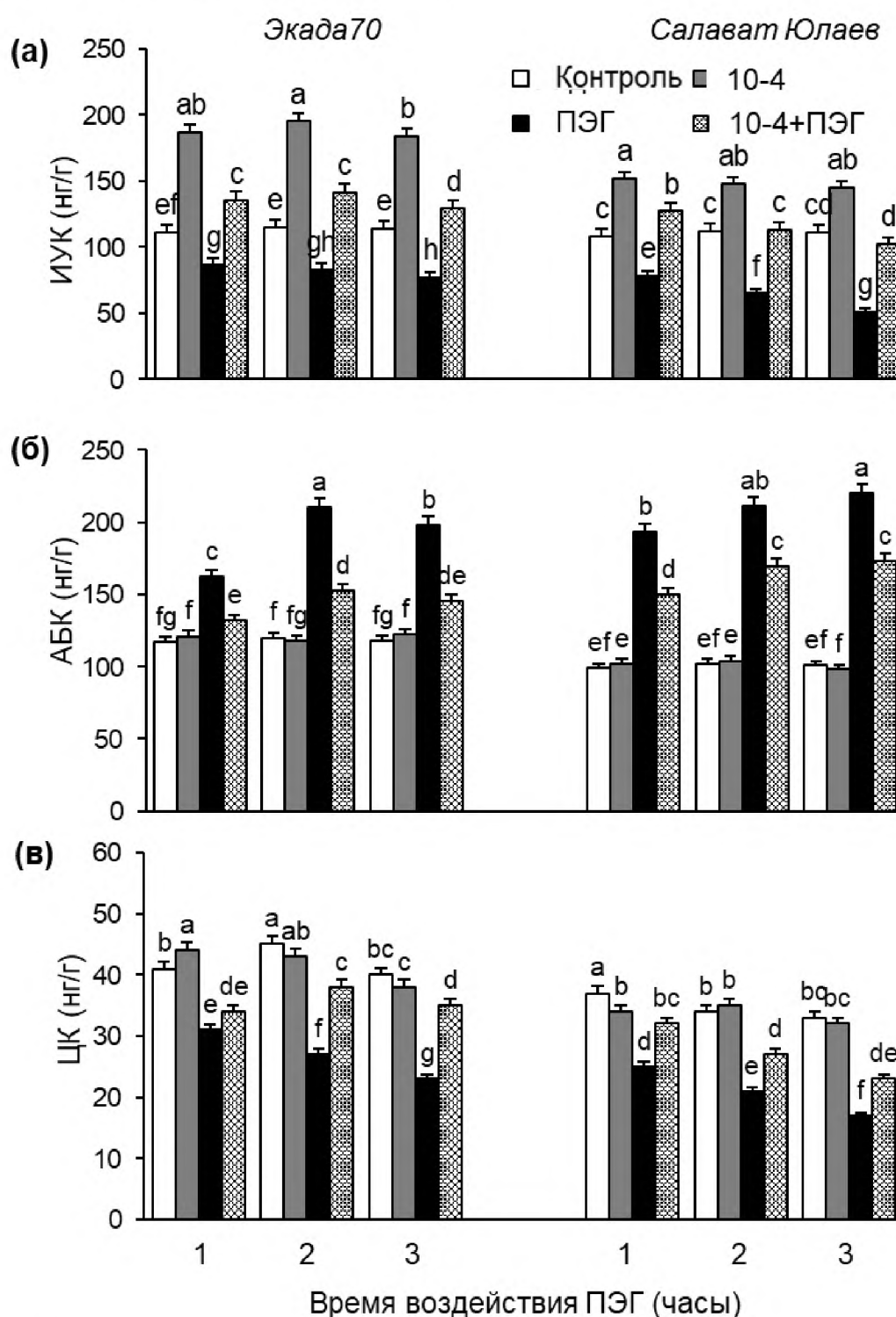


Рис. 5.1. Динамика содержания ИУК (а), АБК (б) и ЦК (в) в инокулированных и неинокулированных *B. subtilis* 10-4 проростках пшеницы (4-сут) сортов Экада70 (устойчивый) и Салават Юлаев (чувствительный) при воздействии дефицита влаги (12% ПЭГ-6000) в течение 3 ч

Результаты показали что соотношение ИУК и ЦК, фитогормонов активаторного типа действия, с одной стороны, и АБК, являющейся их антагонистом в регуляции процессов роста и развития, с другой, резко падает в условиях стресса: в 2,5 и 2 раза, соответственно для проростков сорта Экада70; в 4,7 и 4,2 раза, соответственно для проростков сорта Салават Юлаев (рис. 5.2). Бактериальная инокуляция препятствует падению этих показателей, и, более того, для растений сорта Экада70 практически полностью предотвращает снижение коэффициента отношения ИУК/АБК. Нужно отметить, что в нормальных условиях произрастания инокуляция *B. subtilis* 10-4 приводит к повышению коэффициентов отношения ИУК/АБК для растений обоих сортов с максимальным значением для сорта Экада70. Повышение устойчивости растений к обезвоживанию, очевидно, связано со стабилизацией баланса фитогормонов на уровне близком контрольному и поддержанием активности синтетических процессов на высоком уровне, обеспечивающем нормализацию ростовых процессов проростков.

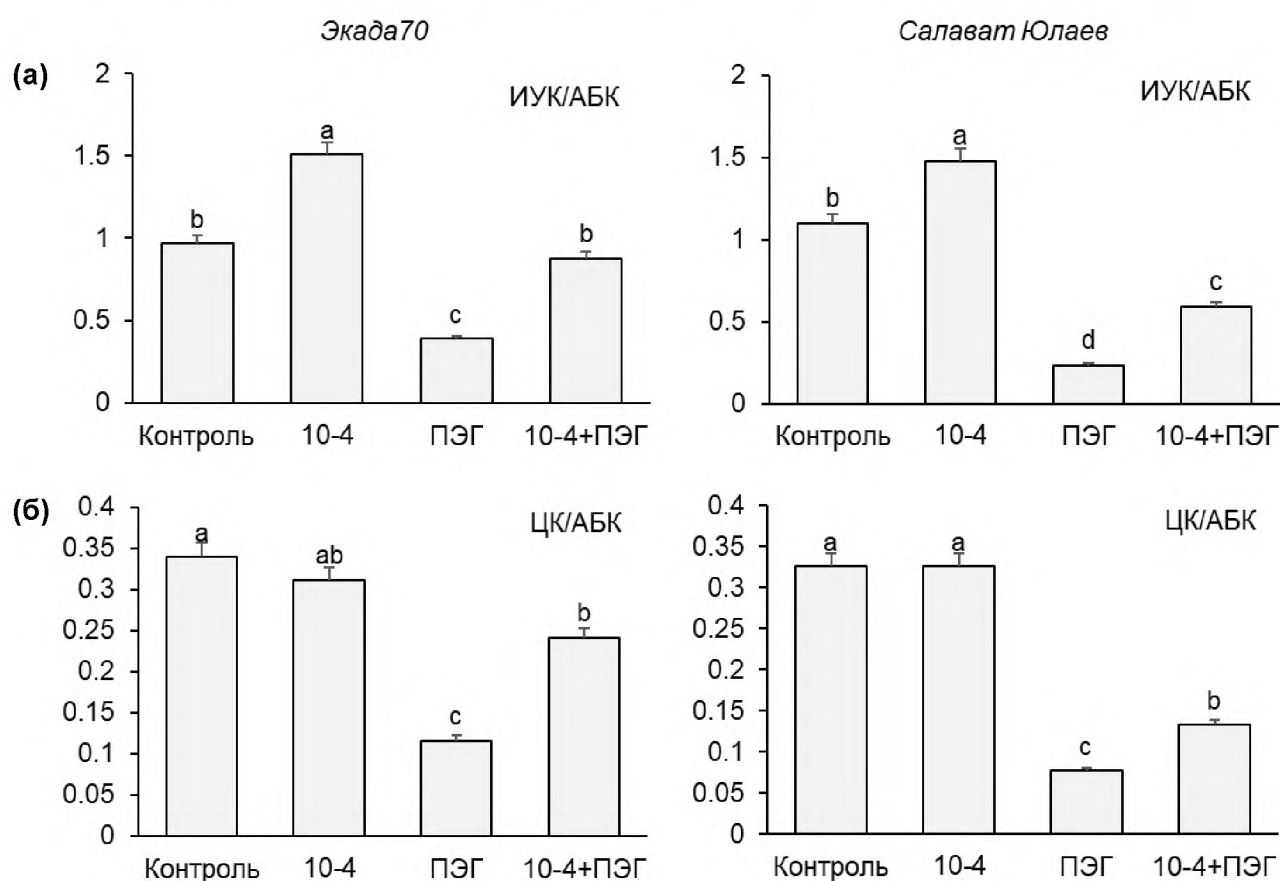


Рис. 5.2. Влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* 10-4 на индуцированное 12% ПЭГ изменение коэффициентов отношения ИУК/АБК (а) и ЦК/АБК (б) в 4-сут проростках пшеницы сортов Экада70 (устойчивый) и Салават Юлаев (чувствительный). Время воздействия ПЭГ 3 ч

Известно, что в условиях стресса АБК подавляет рост и перенаправляет ресурсы на защитные механизмы: регулирует закрытие устьиц, уменьшает потерю воды, активирует гены антистрессовой защиты (Shakirova et al., 2010; Salomon et al., 2014; Farooq et al., 2014; Kang et al., 2014; Kaushal, Wani, 2016; Vishwakarma et al., 2017). Значительные генотипические вариации накопления АБК в листьях пшеницы при водном стрессе наблюдались в многочисленных исследованиях (обзор Saradadevi et al. 2017). Сообщалось, что устойчивые генотипы пшеницы накапливают меньше АБК при стрессе, чем чувствительные (Quarrie 1981; Ji et al., 2011). В нашем исследовании засуха вызывала более значительное накопление АБК у восприимчивого сорта Салават Юлаев (рис. 5.1б), что коррелировало с угнетением роста (рис. 4.2). Инокуляция снижала уровень эндогенной АБК (рис. 5.1) и улучшала рост растений (табл. 4.1, рис. 4.2), что согласуется данными других работ (Kang et al., 2014; Barnawal et al., 2017; 2019; Jan et al., 2019; Kim et al., 2020). Снижение уровня АБК под действием PGP-бактерий может поддерживать фотосинтез за счёт регуляции устьиц (Salomon et al., 2014) и повышения усвоения азота через развитие корней (Azeem et al., 2023). В нашем исследовании инокуляция 10-4 увеличивала содержание хлорофилла при стрессе (табл. 4.1), что также наблюдалось у растений пшеницы, обработанных *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D (Feoktistova et al., 2023). Таким образом, колонизация растений PGP-бактериями может активировать комплекс механизмов защиты, включая модуляцию гормонального баланса (снижение АБК, поддержание ИУК), усиление фотосинтеза через повышение хлорофилла, улучшение усвоения ресурсов воды и минералов за счёт развития корней. Причем, эффективность этих механизмов зависит от генотипа растения, о чем свидетельствуют выявленные различия в реакции сортов Экада70 и Салават Юлаев.

Ауксины играют решающую роль в регуляции роста и развития растений повышая митотическую активность растительных тканей и стимулируя активность ферментов, участвующих в укреплении клеточной стенки, тем самым способствуя удлинению клеток и общему росту (Shakirova et al., 2012; Siddiqui et al., 2017). Наиболее распространенный в природе растительный гормон класса ауксинов ИУК (индол-3-уксусная кислота) является мощной сигнальной молекулой, играющей жизненно важную роль во взаимодействии растений с микроорганизмами и усилении роста

растений. Увеличивая пул ауксинов в растениях ИУК приводит к удлинению клеток, развитию сосудистой ткани и доминированию апикальной части (Poveda, González-Andrés, 2021). В нормальных условиях роста инокуляция *B. subtilis* 10-4 приводила к 1,5- (Салават Юлаев) и 2-кратному (Экада70) увеличению концентрации ИУК (рис. 5.1а) в растениях пшеницы, в то время как содержание АБК (рис. 5.1б) и ЦК оставалось относительно стабильным (рис. 5.1в). Кроме того, растения сорта Экада70 демонстрировали значительно более высокий уровень накопления ИУК, что очевидно обуславливает выявленное выраженное увеличение показателей роста этих растений при инокуляции (в сравнении с растениями сорта Салават Юлаев) (рис. 4.2, табл. 4.1).

Микроорганизмы, синтезирующие ИУК, играют ключевую роль в стимуляции роста растений при стрессе. Они регулируют активность стресс-ассоциированных генов (Korver et al., 2018), активируют ауксин-зависимую передачу сигналов (Gontia-Mishra et al., 2021), усиливают синтез антиоксидантов, осмопротекторов и фотосинтетических пигментов (Belimov et al., 2014; Siddiqui et al., 2017). Эти процессы механизмы в совокупности повышают устойчивость растений к неблагоприятным условиям. Обработка *B. subtilis* LDR2 повышала содержание ИУК и эффективность фотосинтеза в проростках пшеницы в условиях засухи благодаря способности бактерий модулировать синтез ИУК и ее сигнальный путь (Belimov et al., 2014). ИУК-продуцирующие PGP-бактерии стимулируют первичное удлинение корней и развитие боковых ответвлений (Yang et al., 2009; Vacheron et al., 2013; Raheem et al., 2018), а также повышают урожайность пшеницы при дефиците влаги (Raheem et al., 2018). Модификация корневой архитектуры под действием бактерий способствует лучшему поглощению воды и минералов (Cox et al., 2018; Meena et al., 2020). В соответствии с этими выводами в нашем исследовании инокуляция эндофитными *B. subtilis* 10-4 усиливала рост пшеницы и снижала негативное влияние засухи у обоих экотипов (рис. 4.2), что, вероятно, обусловлено бактериальным синтезом ИУК, АБК и СК (Lastochkina et al., 2023).

ЦК регулируют защитные реакции растений на биотические и абиотические стрессы (Ghanem et al., 2011; Veselov et al., 2017). Наши данные указывают на возможную роль ЦК в засухоустойчивости, на что указывает более высокий базовый уровень ЦК в устойчивом сорте Экада70 (рис. 5.1в). Однако, эндогенные ЦК, вероятно, не влияют

напрямую на физиологические эффекты штамма 10-4. Это подтверждается незначительными изменениями уровня ЦК у инокулированных растений в норме, в отличие от повышенного содержания ИУК (рис. 5.1а). Вероятно, это связано с тем, что штамм 10-4 преимущественно синтезирует ауксины, а не ЦК (Lastochkina et al., 2023). ЦК-продуцирующие PGP-бактерии, как показано, усиливают стрессоустойчивость за счёт повышения эндогенного ЦК в растениях (Liu et al., 2013; Akhtar et al., 2020). В нашем случае стимуляция роста и смягчение стресса эндофитом обусловлены его способностью синтезировать ИУК и АБК, модулируя гормональный баланс растений (рис. 5.1). Многочисленные исследования подтверждают, что 34% эндофитных PGP-бактерий продуцируют ИУК (Rana et al., 2020), однако данные о ЦК-синтезирующих бактериях среди эндофитов ограничены и касаются в основном ризосферных видов (Kudoyarova et al., 2019). Наши результаты показывают, что эндофит *B. subtilis* 10-4 синтезирует значительные количества ИУК (1147 нг/мл), минимальные АБК (85 нг/мл) и следы ЦК (3 нг/мл) (Lastochkina et al., 2023). Кроме того, полногеномное секвенирование подтвердило наличие у штамма 10-4 генов, потенциально связанных с синтезом ауксинов (*trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpP*, *trpD*, *trpE*, *trpF*, *trpS*, *dhaS*, *epsN*), что детально обсуждается далее в главе 9.2.

5.1.1. 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 устойчивости растений к засухе (Moura et al., 2010; Nedukha, 2022; Choi et al., 2023; Riaz et al., 2023). В условиях засухи растительная клетка теряет воду, при этом накопление лигнина способствует поддержанию осмотического баланса в клетках, уменьшая потерю воды, что позволяет растению приспособиться к засухе и легче пережить её (Liu et al., 2018). Учитывая способность *B. subtilis* 10-4 индуцировать повышение (в разной степени) устойчивости к водному дефициту у растений обоих экотипов пшеницы, одновременно модулируя содержание эндогенной АБК, представляло интерес изучение влияния бактериальной инокуляции на отложение в корнях пшеницы лигнина как АБК-регулируемого биохимического компонента клеток, вносящего важный вклад в формирование стресс-устойчивости растений (Liu et al., 2021;

Choi et al., 2023). 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 разными стратегиями адаптации к дефициту влаги. В связи с этим, далее была изучена взаимосвязь между колонизацией растений эндофитными бактериями *B. subtilis* 10-4, синтезом лигнина, суберина и их отложением в оболочках клеток.

При помощи световой и конфокальной микроскопии выявлено, что после 24 ч воздействия ПЭГ в корнях пшеницы усиливалось отложение лигнина, преимущественно в клеточных стенках центрального цилиндра и слабее – в клетках перидикла и первичной коры (рис. 5.2). Как видно (рис. 5.2, табл. 5.1), интенсивность лигнификации была выше у растений сорта Экада70, особенно в клетках центрального цилиндра и первичной коры, что может отражать генетическую адаптивность этих растений к стрессу на ранних этапах развития.

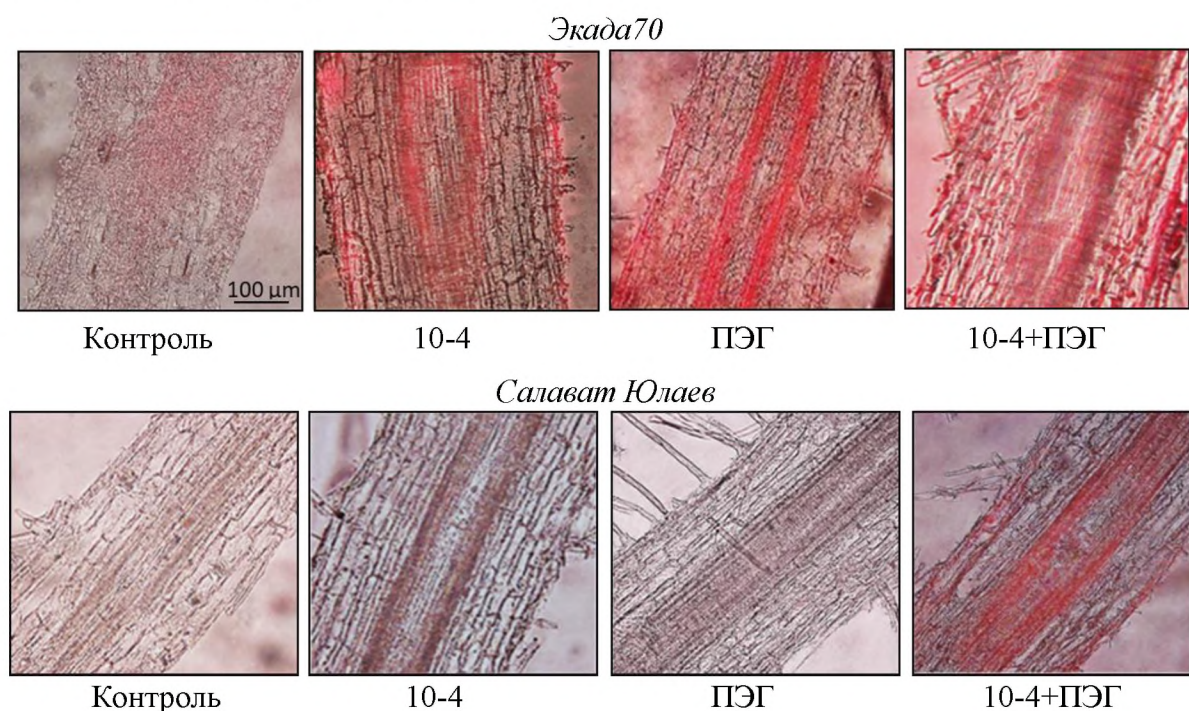


Рис. 5.2. Влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 на отложение лигнина в базальной части корней проростков пшеницы в норме и при дефиците влаги. 4-сут проростки, выращенные в нормальных условиях, были пересажены в 12% ПЭГ-6000 на 24 ч

Таблица 5.1 – Качественное определение лигнина в базальной части корней у неинокулированных и инокулированных *B. subtilis* 10-4 проростков пшеницы (5-сут) разных экотипов после 24 ч воздействия 12% ПЭГ-6000

Вариант	Лигнин	
	Экада70	Салават Юлаев
Контроль	+	+/-
10-4	+++	++
ПЭГ	+++	++/-
10-4+ПЭГ	++++	+++

“–” нет окрашивания; “+” слабое окрашивание; “++” среднее окрашивание; “+++” сильное окрашивание; “++++” очень сильное окрашивание (Sedlarova, Lebeda, 2001)

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 стрессоустойчивостью второго сорта. Аналогичная закономерность наблюдалась для суберина (рис. 5.4). Несмотря на способность некоторых эндофитных *Bacillus* spp. разлагать лигнин растений (Abd-El salam, 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, табл. 5.1). Наблюдалось повышение лигнификации сосудов ксилемы, метаксилемы и U-образных клеточных стенок эндодермы 6-сут инокулированных проростков пшеницы по сравнению с контролем (рис. 5.2, рис. 5.3), а также ускорение дифференцировки тканей и отложение лигнина в базальной зоне корня (рис. 5.3).

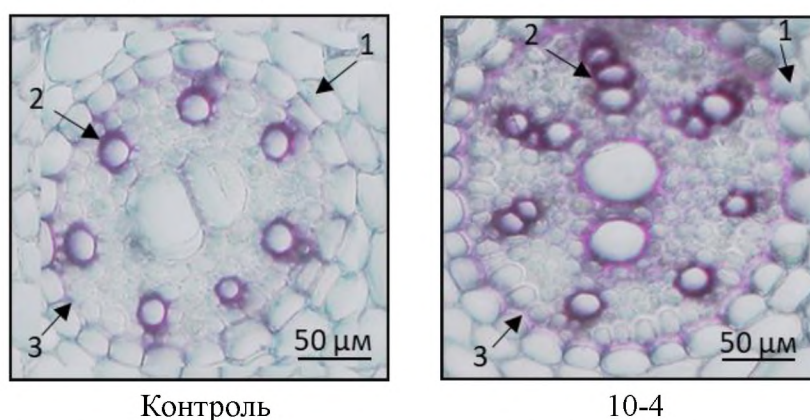


Рис. 5.3. Репрезентативные фотографии локализации лигнина в базальной части корней 6-сут проростков пшеницы сорта Экада70 методом Визнера при предпосевной инокуляции семян пшеницы *B. subtilis* 10-4. 1 – эндодерма; 2 – ксилема; 3 – пояски Каспари

Кроме того, инокуляция *B. subtilis* 10-4 стимулировала отложение суберина в сосудах ксилемы и метаксилемы, паренхимных клетках центрального цилиндра (рис. 5.4). Все это, в свою очередь, указывает на важную роль *B. subtilis* 10-4 в укреплении барьерных свойств клеточных стенок корней, что снизило уровень повреждающего действия засухи на растения. Подтверждением служат данные об ослаблении ПЭГ-индуцированного окислительного стресса и снижение утечки электролитов из тканей инокулированных растений пшеницы (табл. 4.2) с более выраженным защитным эффектом у сорта Экада70.

Поскольку лигнин и суберин обычно ко-локализуются в клеточных стенках, окрашивание суданом III позволило выявить различия в интенсивности отложения этих веществ в корнях тех же проростков. Инокуляция несколько стимулировала отложение суберина в центральном цилиндре корней пшеницы по сравнению с контролем, с выраженным эффектом для растений сорта Экада70 (рис. 5.4).

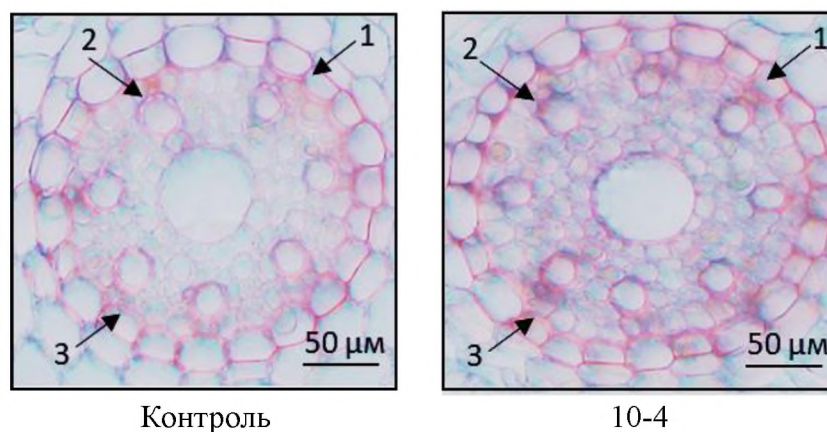


Рис. 5.4. Репрезентативные фотографии локализации суберина в базальной части корней 6-сут проростков пшеницы сорта Экада70 (окрашивание раствором судана III в 70% этаноле (по Фурсту)) при предпосевной инокуляции семян *B. subtilis* 10-4. 1 – эндодерма; 2 – ксилема; 3 – пояски Каспари

Методом конфокальной микроскопии выявлено, что *B. subtilis* 10-4 индуцирует отложение лигнина и суберина не только в метаксилеме, но и паренхимных клетках центрального цилиндра (рис. 5.5). Накопление лигнина в паренхиме, обычно являющееся маркером стрессового воздействия (Boerjan et al., 2003), в данном случае может отражать укрепление клеточных стенок как адаптивный ответ на бактериальную обработку.

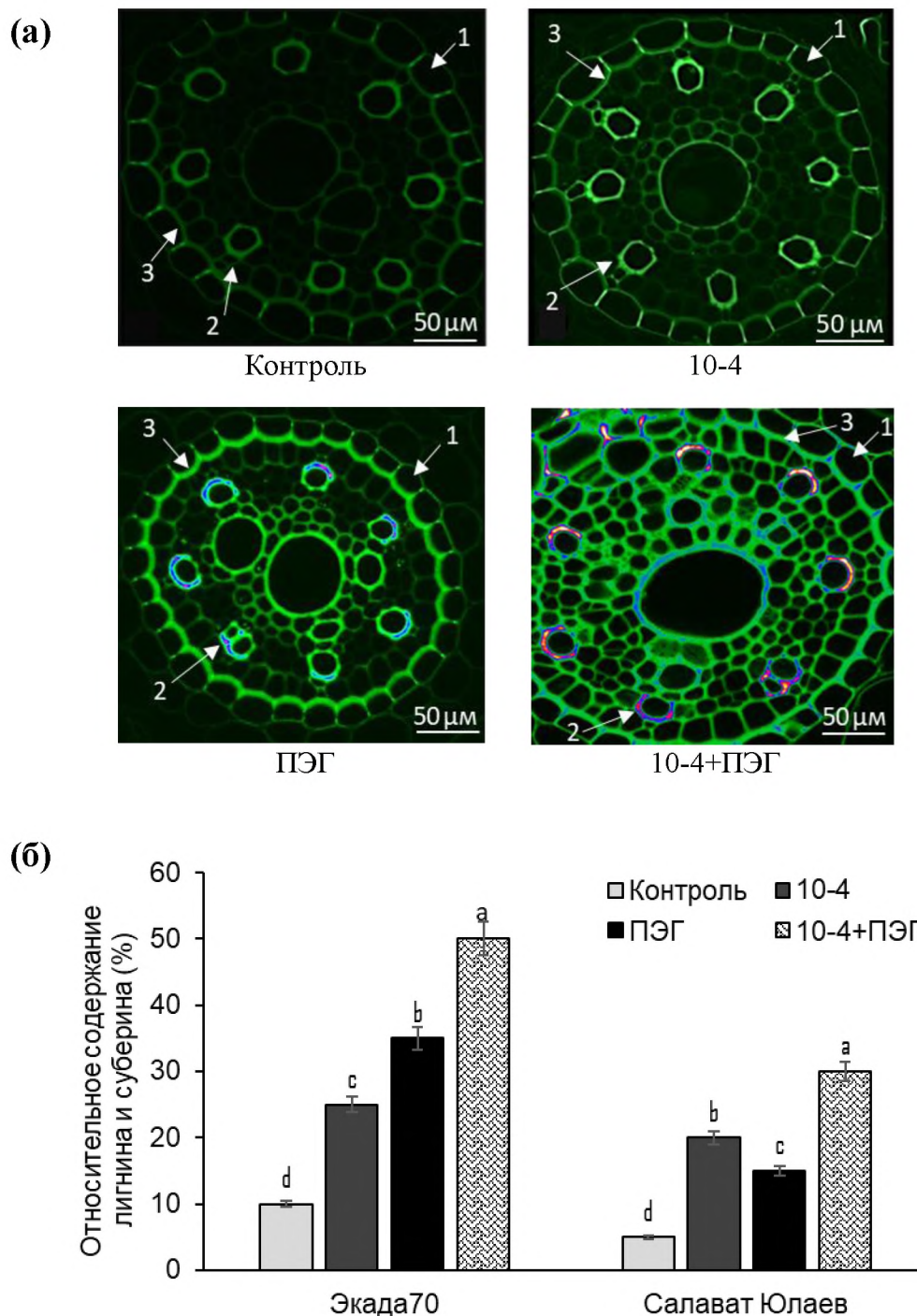


Рис. 5.5. Локализация лигнина и суберина в центральном цилиндре базальной части корней 6-сут проростков пшеницы, окрашенных берберина гемисульфатом/толуидиновым синим при инокуляции семян *B. subtilis* 10-4 в норме и при 24 ч воздействии ПЭГ. (а) – визуализация с использованием конфокального микроскопа Olympus FV 3000 («Olympus», Япония); (б) – количественная оценка визуального эффекта с помощью программы обработки изображений ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). 1 – эндодерма; 2 – ксилема; 3 – пояски Каспари

Полученные результаты подчеркивают значительную роль эндогенной АБК в регуляции *Bacillus*-опосредованного ускорения отложения лигнина и суберина в

клетках корней пшеницы, что способствует укреплению барьерных свойств клеточных стенок и снижает повреждающее действие дефицита влаги, формируя адаптационную устойчивость растений. Это, по всей видимости, служит одним из важных адаптационных механизмов устойчивости инокулированных растений к дефициту влаги. 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 накопление лигнина, индуцированное *B. subtilis* 10-4, не препятствовало стимулирующему рост эффекту бактерий (табл. 4.1, рис. 4.2), вероятно, из-за способности бактерий продуцировать ИУК (Lastochkina et al., 2023b) и модулировать уровни эндогенного его содержания в растениях (рис. 5.1a), а также продуцировать другие метаболиты с рострегулирующими свойствами. Вместе с тем, важную роль в укреплении клеточных стенок может играть индуцируемая салициловой кислотой (СК) лигнификация через путь фенилпропаноидов с ключевым ферментом ФАЛ (Shakirova et al., 2012). На эту мысль наталкивают данные о снижении в инокулированных растениях стресс-индуцированного накопления АБК (рис. 5.1б), что может происходить вследствие повышения в них СК (рис. 5.6, 5.8), часто выступающего в качестве антагониста АБК. Некоторые полезные бактерии, очевидно, могут снижать уровень АБК в растении для снятия стрессового сигнала, тормозящего рост, и перенаправления ресурсов на усиление барьерных функций и системной устойчивости через сигнальные пути СК.

5.2. Ингибиторный анализ роли СК в *B. subtilis*-опосредованных защитных реакциях проростков пшеницы в условиях водного дефицита

В литературе накопился большой объем данных, свидетельствующих об участии СК в активации защитных реакций растений и развитии системной приобретённой устойчивости (SAR, systemic acquired resistance) к биотическим и абиотическим стрессам (Shakirova, 2007; Klessig et al., 2018; Khan et al., 2022; Etesami, Glick, 2024). СК является ключевым сигналом для защиты растений от биотрофных патогенов, однако, многие полезные PGP-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 эндофитными бактериями *B. subtilis* устойчивости пшеницы к засухе и каким путем эндогенная СК вырабатывается в этих условиях.

Нами было установлено накопление эндогенной СК в растениях пшеницы при инокуляции эндофитными бактериями *B. subtilis* (рис. 5.6а), что коррелировало с их влиянием на рост (рис. 4.2) и ВС листьев (рис. 4.3) (Lastochkina et al., 2020а). Так, в нормальных условиях произрастания у проростков сорта Экада70 базовое содержание эндогенной СК было существенно выше (400 нг/г сырой массы), чем у проростков сорта Салават Юлаев (50 нг/г сырой массы) (рис. 5.6а). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 повышала в 1,3–3 раза уровень эндогенной СК во всех вариантах с максимальными значениями для Экада70 (рис. 5.6а). Результаты демонстрируют, что в целом оба сорта в ответ на бактериальную инокуляцию накапливают эндогенную СК, но по-разному: проростки сорта Экада70 имели более быструю реакцию, в отличие от запоздалой у сорта Салават Юлаев. Это сопровождалось усилением транскрипционной активности гена *PR-1* (признанного маркера развития салицилатного сигнального пути защиты) с максимальными значениями для растений сортов Экада70 и с минимальными для Салават Юлаев (рис. 5.6а). Следует отметить, что аналогичные результаты были получены и на сортах-представителях СВ (Саратовская55) и ЛЗС (Омская35) экотипов (рис. S7). В условиях засухи инокуляция *B. subtilis* снижала стресс-индуцированное накопление СК (рис. 5.8), что, в целом было сопоставимо с данными о влиянии на рост растений при стрессе (рис. 4.2).

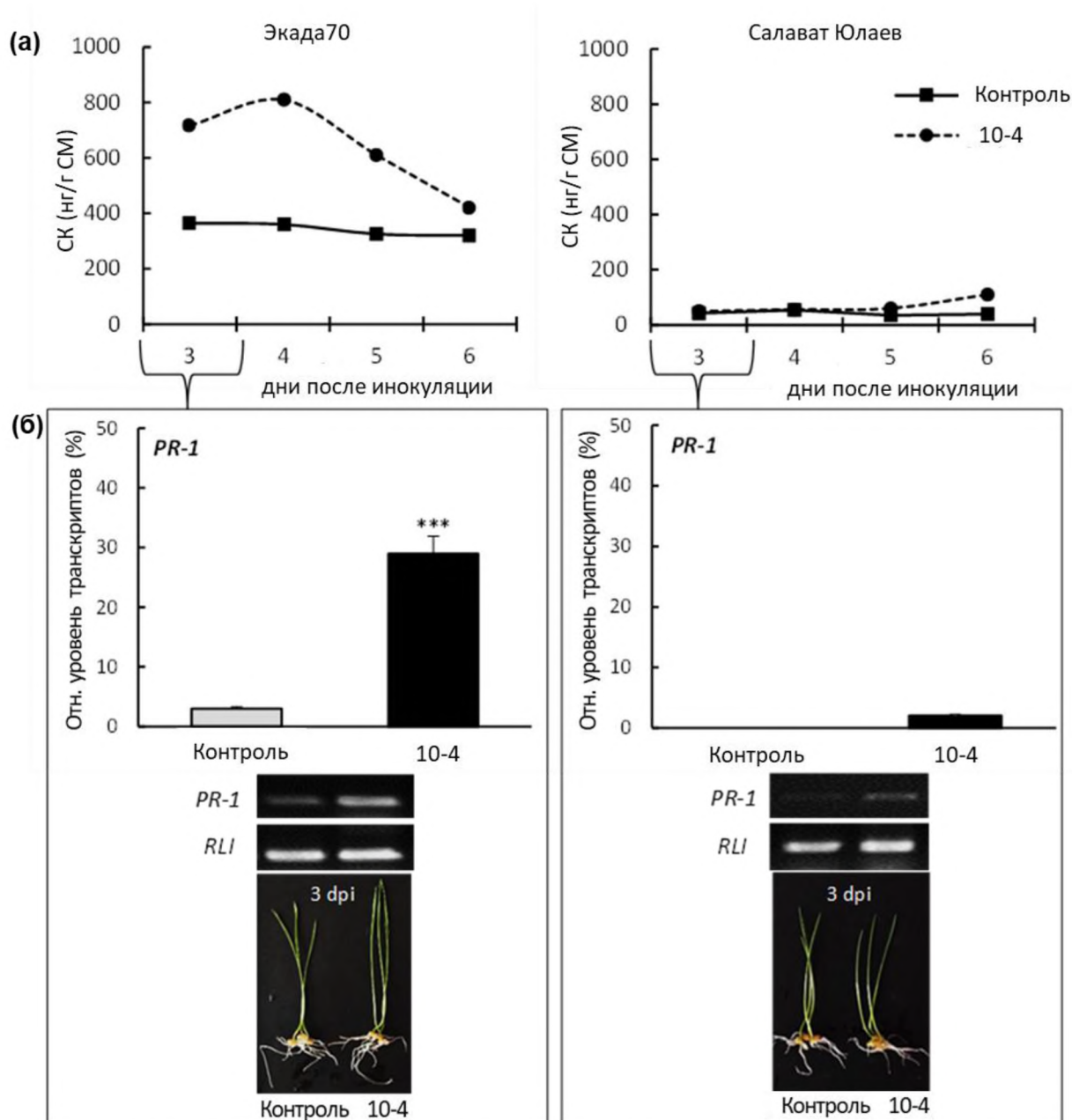


Рис. 5.6. Влияние *B. subtilis* 10-4 на накопление эндогенной салициловой кислоты (СК) (а) и относительный уровень транскриптов гена *PR-1* (б) в проростках (3-сут – 6-сут) пшеницы с различными стратегиями адаптации к засухе (сорт Экада70, устойчивый; сорт Салават Юлаев, чувствительный). СМ – сырая биомасса; dpi – дни после инокуляции. *** указывает на существенную разницу между неинокулированными и инокулированными проростками ($p < 0,05$)

Выявленная связь параметров роста с ВС, накоплением эндогенной СК и транскриптов *PR-1* гена под влиянием *B. subtilis* свидетельствуют в пользу участия этого фитогормона в микроб-индуцированной системной устойчивости (MIST) растений к засухе. Для проверки этого предположения нами был проведен анализ влияния ингибитора биосинтеза СК 1-аминобензотриазола (ABT) (100 мМ) (Sigma-Aldrich, USA)

(Wang et al., 2018) на эндогенный уровень СК в праймированных *B. subtilis* 10-4 и подвергнутых дефициту влаги проростках пшеницы СВ и ЛЗС экотипов (Lastochkina et al., 2022b) в сочетании с параметрами устойчивости на клеточном и организменном уровнях. Согласно современным представлениям в растениях СК синтезируется двумя различными путями: через изохоризматсинтетазу (ИХС) и фенилаланин-аммиак-лиазу (ФАЛ) (Lefevre et al., 2020). ИХС-путь: СК синтезируется из хоризмовой кислоты (ХК) при участии ИХС и изохоризматпируватлиазы (ИПЛ). ИПЛ была первоначально обнаружена у бактерий *Pseudomonas fluorescens* и *P. aeruginosa* (Serino et al., 1995), однако гомологи этого фермента у растений до сих пор не охарактеризованы.

Leal с соавт. (2021) сообщали о детектировании в геноме *B. subtilis* PTA-271 генов, кодирующих метаболические пути СК (от синтеза до гидролиза), включая ген изохоризматсинтазу биосинтеза салицилата (*pchA*), обнаруженный и в геноме *B. subtilis* 10-4 (глава 9). В 2019 г. было показано, что у растений ИХС-путь отличается от бактериального. В растительном специфическом пути изохоризмат конъюгируется с аминокислотой глутаматом с образованием промежуточного соединения (изохоризмат-9-глутамата), которое затем спонтанно распадается или ферментативно превращается в СК (Lefevre et al., 2020). ФАЛ-путь: L-фенилаланин, являющийся субстратом пути ФАЛ, превращается в коричную кислоту, которая затем окисляется до бензойной (БК) или кумаровой кислоты (Yalpani et al., 1993). БК с помощью 2-гидроксилазы бензойной кислоты (BA2H) преобразуется в СК (Vlot et al., 2009). Считается, что в растениях биосинтез СК происходит преимущественно через ФАЛ-путь (Leon et al., 1995; Wang et al., 2018). Показано, что структурный аналог фенилаланина, 2-аминоиндан-2-фосфоновая кислота, является эффективным конкурентным ингибитором ФАЛ как *in vitro*, так и *in vivo* (Solecka, Kasperska, 2003), а АВТ может ингибировать активность BA2H (Leon et al., 1995; Wang et al., 2018).

Первоначально была проведена оценка влияния АВТ в диапазоне концентраций (от 0 до 100 мМ с шагом 10) на рост бактерий *B. subtilis* 10-4 *in vitro* в чашках Петри с питательной средой. Выявлено, что с повышением концентрации АВТ в среде рост бактерий *B. subtilis* 10-4 поступательно снижался (с 100% в контроле (или 0 мМ) до 5–10% (100 мМ) в опыте) (рис. S8). Вместе с тем, как видно из рисунка рис. 5.7а, даже в

самой высокой концентрации АВТ (100 мМ) хоть и незначительно снижал, но не предотвращал рост бактерий *in vitro*. Это может свидетельствовать о том, что на проникновение бактерий в ткани растений и их колонизацию присутствие АВТ существенного и непосредственного влияния не окажет. Действительно, результаты тестов показали рост бактерий *B. subtilis* 10-4 вокруг сегментов проростков пшеницы, как в отсутствие, так и в присутствии АВТ (рис. 5.7б). Эти данные демонстрируют, что применение АВТ (100 мМ) не препятствует проникновению и росту бактерий-эндофитов *B. subtilis* 10-4 в тканях растений пшеницы обоих экотипов.

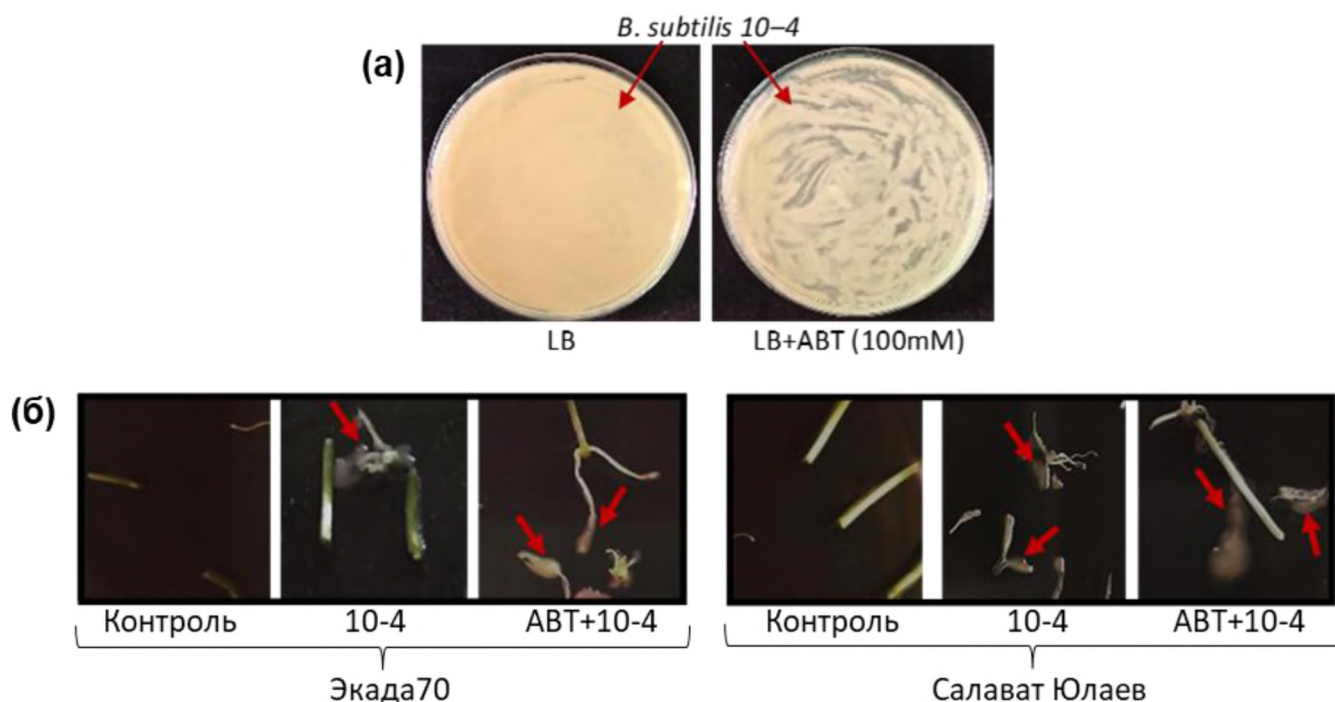


Рис. 5.7. Влияние ингибитора биосинтеза салициловой кислоты 1-аминобензотриазола (АВТ) (100 мМ) на рост клеток *B. subtilis* 10-4 в чашках Петри с средой LB (а) и способность *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани 3-сут проростков пшеницы сортов Экада70 (устойчивый) и Салават Юлаев (чувствительный) (б). Красные стрелки указывают на рост бактерий *B. subtilis* 10-4 вокруг сегментов 3-сут проростков

Далее было протестировано влияние АВТ на биосинтез эндогенной СК в праймированных *B. subtilis* 10-4 проростках пшеницы. Выявлено, что с увеличением концентрации АВТ происходило поступательное снижение уровня *B. subtilis*-индуцированного увеличения эндогенной СК в проростках сорта Экада70 (рис. S10), свидетельствуя об участии клеток изученного штамма в регуляции *de novo* биосинтеза СК у этих проростков. Что касается сорта Салават Юлаев, то на той же стадии онтогенеза (3-

сут проростки) не наблюдалось существенных изменений в эндогенной СК при совместном применении штамма 10-4 и АВТ по сравнению с Экада70. В целом, совокупность полученных данных позволила отобрать в качестве наиболее оптимального варианта применение предпосевного замачивания семян АВТ (100 мМ) (как в отдельности, так и в композиции с *B. subtilis* 10-4). Такой вариант использования АВТ позволяет детектировать снижение (предотвращение) индуцированного *B. subtilis* 10-4 накопления СК в первые 3–4-суток онтогенеза растений (рис. S10), и при этом не оказывать угнетающего действия на рост растений (рис. S9), что позволит оценить вклад СК в эндофит-опосредованный протекторный эффект на растения.

Колонизация внутренних тканей растений эндофитами играет важную роль в формировании эффективных их взаимодействий с растениями и является фактором, влияющим на биологическую активность. Хотя результаты показали, что применение АВТ (100 мМ) не предотвращало способность *B. subtilis* 10-4 колонизировать внутренние ткани проростков обоих сортов (рис. 5.7), однако, было выявлено снижение индуцируемого этими бактериями накопления эндогенной СК до уровня контрольных вариантов (рис. 5.8). АВТ предотвращал эндофит-индуцируемое накопление СК при стрессе (рис. 5.8), что сопровождалось и полным предотвращением защитного эффекта штамма 10-4 (наблюдаемого при его отдельном применении) на эти растения при стрессе (рис. 5.9).

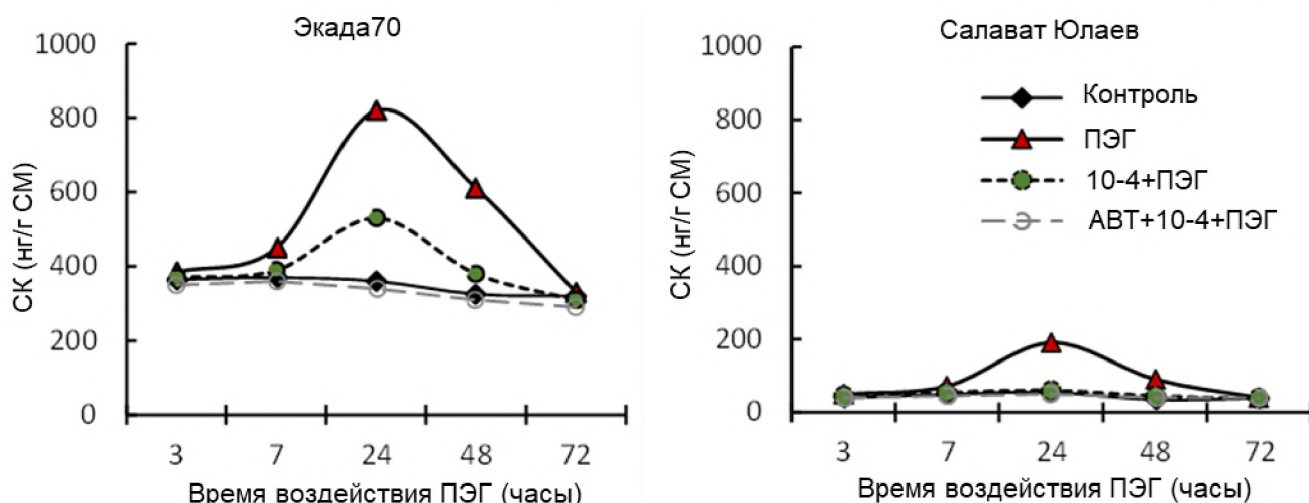


Рис. 5.8. Влияние ингибитора биосинтеза салициловой кислоты (СК) (АВТ, 100 мМ) на накопление эндогенной СК в инокулированных *B. subtilis* 10-4 проростках пшеницы сортов Экада70 (устойчивый) и Салават Юлаев (чувствительный) при дефиците влаги (ПЭГ). 3-сут проростки перемещались в 12%ПЭГ-6000 на 72 ч. СМ – сырая масса

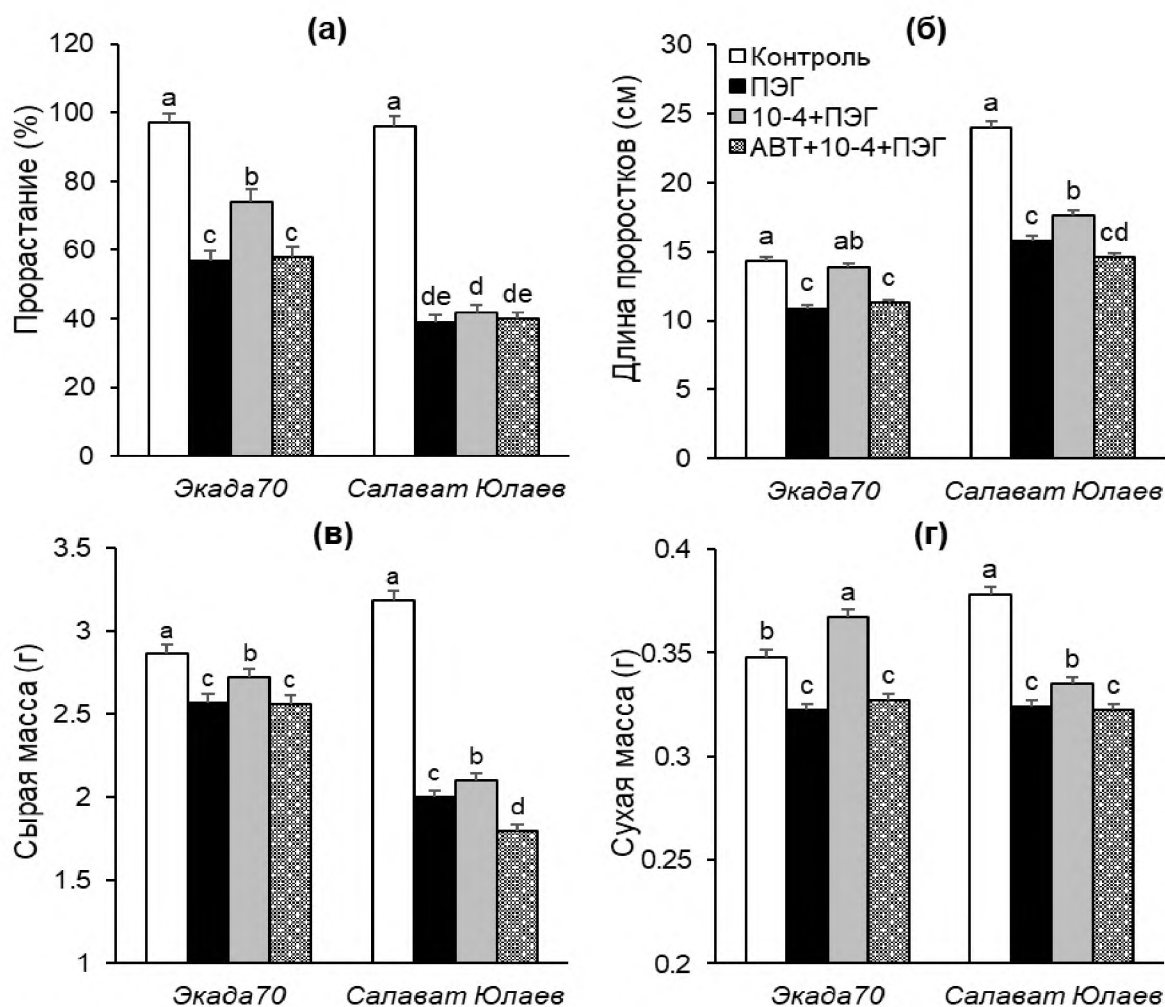


Рис. 5.9. Влияние предпосевной обработки *B. subtilis* 10-4 совместно с ингибитором биосинтеза СК (АВТ, 100 мМ) на прорастание семян (3-сут) (а), длину проростков (4-сут) (б), их сырую (в) и сухую биомассу (г) у сортов пшеницы Экада70 (устойчивый) и Салават Юлаев (чувствительный) при дефиците влаги, моделированном 12%ПЭГ. При оценке прорастания семена проращивались в присутствии 12%ПЭГ; при оценке длины и накопления сырой, сухой биомассы 3-сут проростки, выращенные в нормальных условиях, пересаживались корнями в растворы 12%ПЭГ на 24 ч

При совместном применении *B. subtilis* 10-4 и АВТ такие показатели роста как всхожесть семян (рис. 5.9), длина проростков (рис. 5.9б), их сырая (рис. 5.9в) и сухая биомасса (рис. 5.9г) были сопоставимы с контролем. Кроме того, применение АВТ нейтрализовало способность штамма 10-4 повышать ВС листьев в норме и поддерживать повышенный уровень при стрессе (рис. 5.10), а также регулировать содержание пролина (рис. 5.11в,г) и снижать окислительные повреждения (рис. 5.11а,б).

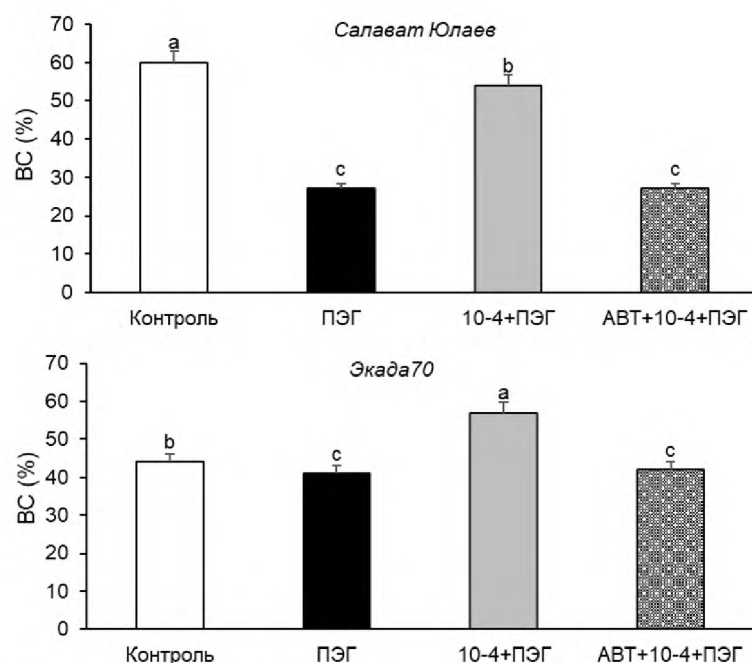


Рис. 5.10. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 совместно с ингибитором биосинтеза СК (ABT, 100 mM) на водоудерживающую способность (BC) листьев 28-сут растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при засухе (сорт Экада70, устойчивый; сорт Салават Юлаев, чувствительный), подвергнутых 21-суточному воздействию 12%ПЭГ-6000 (ПЭГ)

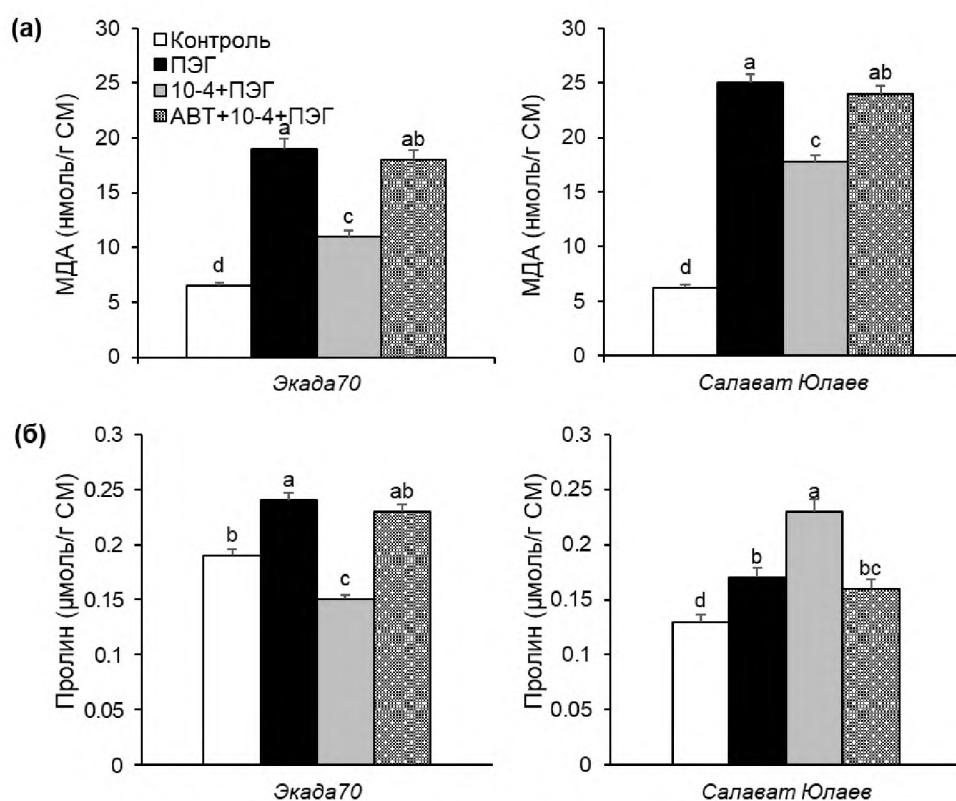


Рис. 5.11. Влияние предобработки *B. subtilis* 10-4 совместно с ингибитором биосинтеза СК (ABT, 100 mM) на уровень МДА (а) и пролина (б) в 4-сут проростках пшеницы сортов Экада70 (устойчивый) и Салават Юлаев (чувствительный), подвергнутых 24-ч воздействию ПЭГ. CM – сырая масса

Полученные данные указывают на то, что эндогенная СК выступает гормональным интермедиатом в реализации антистрессового эффекта *B. subtilis* 10-4 у двух экотипов пшеницы в условиях засухи. Кроме того, результаты указывают на индукцию системной толерантности растений при инокуляции *B. subtilis* 10-4 (или MIST), опосредованную СК-зависимым сигнальным каскадом. Настоящее исследование предоставило экспериментальные доказательства, раскрывающие механизмы положительного влияния эндофитных бактерий *B. subtilis* на рост пшеницы с разными стратегиями адаптации в условиях дефицита влаги.

Итак, суммирование полученных в данной главе 5 данных позволяет заключить, что эндофитный штамм *B. subtilis* 10-4 в оптимальной в стимуляции роста концентрации 10^5 КОЕ/мл оказывает дифференцированный защитный эффект на растения пшеницы устойчивых (Экада70, Саратовская55; СВ экотип) и чувствительных (Салават Юлаев, Омская35; ЛСЗС экотип) сортов, обусловленный модификациями гормонального статуса и структурной адаптацией корневых тканей при предпосевной инокуляции. Ростстимулирующий эффект обусловлен быстрым повышением уровня ИУК в 1,5 (Салават Юлаев) и 2 раза (Экада70) на фоне отсутствия изменений в содержании ЦК и АБК, тогда как антистрессовый – с предотвращением стресс-индуцированного падения ИУК и уменьшением амплитуды сдвигов в уровне АБК и ЦК, а также модуляцией биосинтеза эндогенной СК. Выявлена критическая роль эндогенной АБК в опосредованном бактериями усилении лигнификации и суберинизации клеточных стенок корней, что снижает повреждающее действие водного дефицита и ослабляет ПЭГ-индуцированный окислительный/осмотический стресс. Ингибиторный анализ позволил получить экспериментальные доводы в пользу исполнения эндогенной СК роли гормонального интермедиата в проявлении предадаптирующего и системного защитного действия *B. subtilis* 10-4 на растения с контрастными адаптивными стратегиями в условиях водного дефицита, 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 ауксины опосредуют системные и ростовые реакции. Полученные результаты

углубляют понимание ранних реакций у различающихся (контрастных) по стратегии адаптации к засухе экотипов пшеницы на инокуляцию эндофитными *B. subtilis*. Установленная взаимосвязь между *Bacillus*-опосредованной гормональной сигнализацией (СК, АБК), усилением барьерных функций тканей (лигнин, суберин) и устойчивостью к водному дефициту, открывает перспективы для разработки стратегий повышения стрессоустойчивости злаковых культур.

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

6.1. Изменение содержания фотосинтетических пигментов в листьях инокулированных *B. subtilis* проростков пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями при ПЭГ-индуцированном дефиците воды

Фотосинтез является одним из основных процессов первичного метаболизма растений, непосредственно связанных с их продуктивностью и чувствительностью к обезвоживанию (Yang et al., 2014; Ahmad et al., 2018; Todorova et al., 2022). Воздействие засухи приводит к деградации фотосинтетических пигментов и снижению эффективности фотосинтеза, что выражается в уменьшении площади листьев, высоты, биомассы растений и в потере урожая (Карпец, Веденеева, 2022; Osipova et al., 2023). Содержание основных фотосинтетических пигментов хлорофиллов и каротиноидов (Кар) в листьях выступает надежным маркером фотосинтетической активности растений и их обеспеченности питательными веществами (Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2019). Как видно из рис. 6.1. воздействие ПЭГ-индуцированного дефицита влаги в течение 24 ч снижало содержание хлорофилла (Хл) а, Хл b и Кар в 6-сут проростках пшеницы устойчивого и чувствительного сортов. Это было вполне ожидаемым, поскольку фотосинтетические пигменты, аккумулирующие световую энергию и генерирующие восстановительную силу, высокочувствительны к абиотическим стрессам, особенно к засухе (Головко и др., 2023).

Согласно многочисленным исследованиям, инокуляция PGP-бактериями может способствовать поддержанию повышенного уровня фотосинтетических пигментов в растениях при стрессе и смягчать повреждающее действие засухи (Shukla et al., 2012; Yan et al., 2013; Guler et al., 2016; Zhang et al., 2019). В нашем эксперименте мы установили (рис. 6.1), что инокуляция эндофитом *B. subtilis* 10-4 не только препятствовала деградации пигментов при стрессе, но и способствовала увеличению их содержания у растений сорта Экада70 относительно контрольных

вариантов, не подвергнутых стрессу (рис. 6.1.а). Полученные данные согласуются с результатами Osipova с соавт. (2023), которые наблюдали значительное увеличение концентрации фотосинтетических пигментов в инокулированных PGP-бактериями растениях тритикале в сравнении, что коррелировало с их повышенной устойчивостью к засухе в сравнении с контрольными вариантами. В другом исследовании, обработка растений клетками штамма бактерии *B. pumilus* снижала вызываемые засухой повреждения фотосинтетического аппарата *Glycyrrhiza uralensis* (солодки) (Zhang et al., 2019). Вместе с тем, наши эксперименты демонстрируют генотип-зависимую реакцию растений пшеницы в ответ на инокуляцию эндофитом. Так как установлено, что у инокулированных растений сорта Салават Юлаев хоть и наблюдалось предотвращение стресс-индуцированной деградации исследуемых пигментов практически до уровня контрольных нестрессированных вариантов (рис. 6.1.б), однако, не превышало, как в случае варианта с растениями сорта Экада70 (рис. 6.1а).

Интересно, что в норме содержание пигментов в инокулированных *B. subtilis* 10-4 шестисуточных проростках пшеницы сорта Экада70 увеличивалось в 1,1–1,2 раза (рис. 6.1а), тогда как у проростков сорта Салават Юлаев было ниже в 1,16–1,29 раза (рис. 6.1б) по сравнению с контрольными вариантами без инокуляции. Эти данные могут указывать на временную физиологическую перестройку метаболизма (перераспределение ресурсов) исследуемых растений и являться частью их адаптивных стратегий. В пользу этого свидетельствуют данные о сопоставимом уровне содержания фотосинтетических пигментов (Хл а, Хл b и Кар) в инокулированных растениях в их более поздние стадии развития (16-сут) (рис. 8.3) (глава 8).

Полученные данные демонстрируют, что в ответ на инокуляцию *B. subtilis* 10-4 растения устойчивого генотипа пшеницы, в отличие от чувствительного, проявили большую активность в накоплении пигментов, как в нормальных условиях произрастания, так и при водном дефиците. Кроме того, данные свидетельствуют о более быстрой перестройке (адаптации) праймированных растений сорта Экада70 к стрессу, в сравнении с таковыми сорта Салават Юлаев – демонстрирующему запоздалые и менее выраженные защитные реакции.

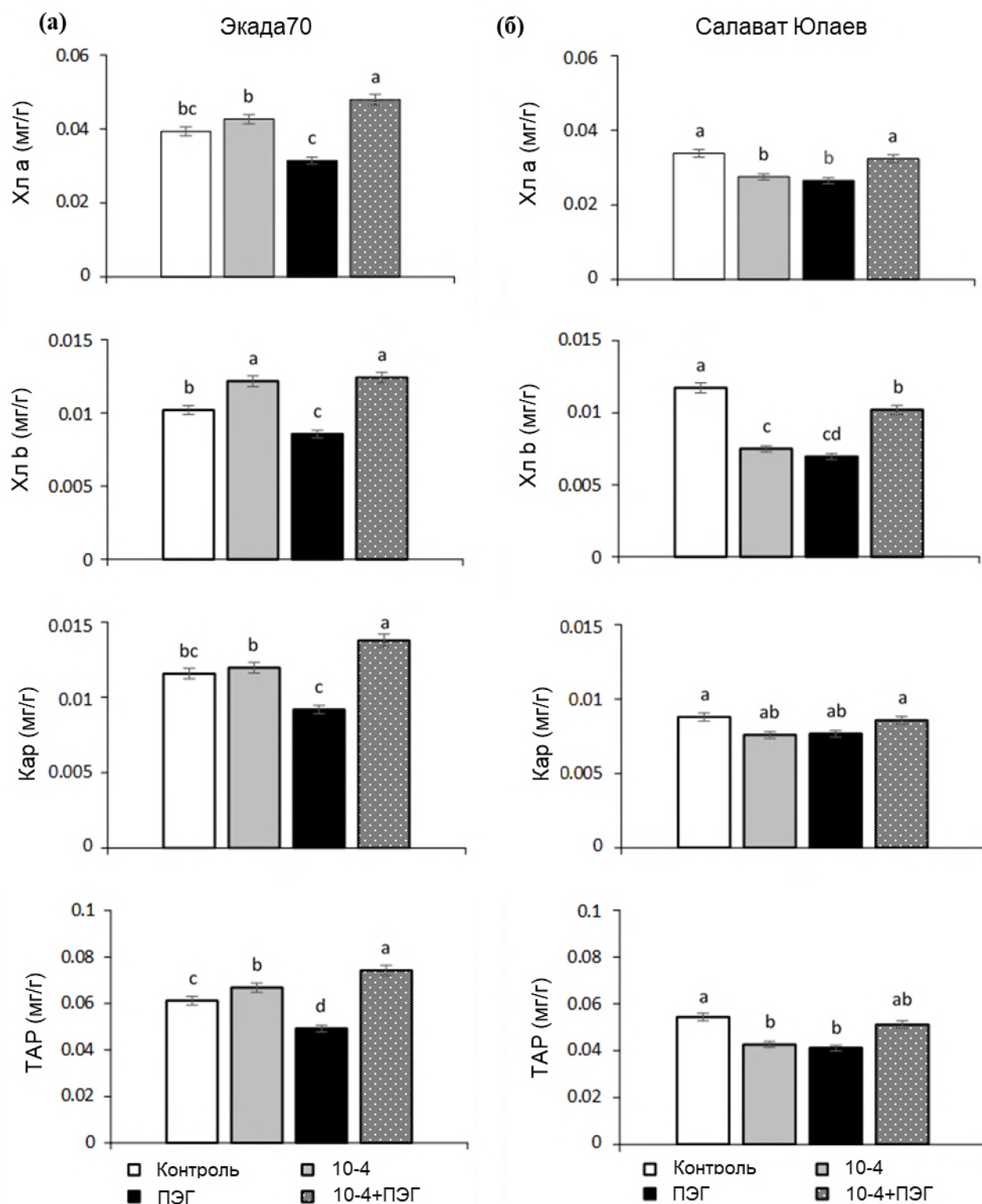


Рис. 6.1. Влияние эндофитных *B. subtilis* (10-4, 26Д) и дефицита влаги (ПЭГ) на содержание фотосинтетических пигментов хлорофилла (Хл) а, Хл b, каротиноидов (Кар) и общее количество пигментов (ТАР) в листьях 6-сут проростков пшеницы. Время воздействия стресса – 24 ч

6.2. Влияние инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) на параметры фотосистемы II растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при дефиците воды

Стресс-индуцированное подавление фотосинтеза приводит к дисбалансу между поглощением световой энергии и ее использованием в процессах фиксации углерода. Возникающий избыток энергии способствует к усиленному образованию АФК, таких как O_2^- и H_2O_2 , которые, как известно, ингибируют *de novo* синтез белков фотосистемы II (ФСII) и вызывают окислительное повреждение клеточных мембран (Huseynova et al., 2007; Khalvandi et al., 2021). Ключевым механизмом защиты фотосинтетического аппарата от подобных повреждений является усиление регулируемой тепловой диссипации световой энергии в виде тепла ($Y(NPQ)$) в составе ФСII (Ruban, 2016), эффективность работы которой служит интегральным показателем фотосинтетической активности и стресс-устойчивости растений. Вместе с тем, комплексная оценка работы ФСII в условиях стресса, требует анализа не только эффективности защиты ($Y(NPQ)$), но и показателей функциональной целостности (максимальной квантовой эффективности (F_v/F_m), фактической фотохимической активности (эффективный квантовый выход) ($Y(II)$) и уровня нерегулируемых потерь энергии, ведущих к фотоокислительному повреждению ($Y(NO)$)). Следует отметить, что к моменту начала настоящего исследования в литературе отсутствовала информация о влиянии эндофитных PGP-бактерий на все вышеперечисленные параметры работы ФСII (F_v/F_m , $Y(II)$, $Y(NPQ)$, $Y(NO)$) в различающихся по адаптивным стратегиям генотипах пшеницы при засухе. Нами было предположено, что один из механизмов протекторного действия эндофитов при водном дефиците может быть связан с комплексным положительным влиянием на функционирование ФСII, оптимизирующим распределение поглощённой энергии между фотохимическими и нефотохимическими процессами. Полученные результаты подтверждают данную гипотезу. Как видно из рис. 6.2, инокуляция эндофитами *B. subtilis* (10-4, 26Д) оказывала стресс-протекторный эффект на фотохимическую активность ФСII обоих исследуемых сортов пшеницы с различными стратегиями адаптации к дефициту влаги в начальные стадии онтогенеза.

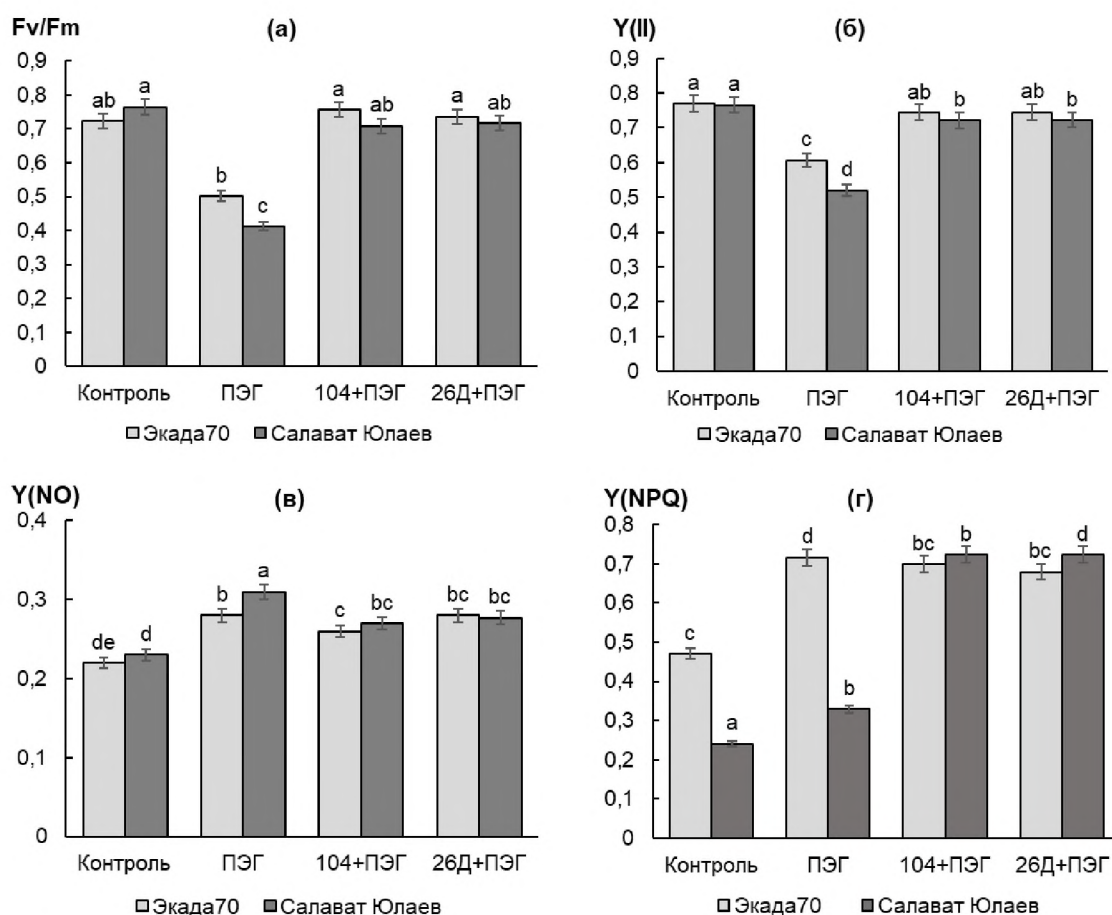


Рис. 6.2. Влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) и дефицита влаги (ПЭГ) на флуоресцентные параметры фотосистемы II: максимальная фотохимическая эффективность Fv/Fm (а), эффективный квантовый выход Y(II) (б), квантовый выход нерегулируемой Y(NO) (в) и регулируемой диссипации световой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

Инокуляция *B. subtilis* (10-4 и 26Д) 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 привело к снижению максимального квантового выхода (Fv/Fm) (рис. 6.2а) и росту нерегулируемых потерь (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 растений сорта Салават Юлаев, очевидно, вследствие генетически обусловленной чувствительности к засухе в начальные стадии онтогенеза

(рис. 4.1). Увеличение регулируемой тепловой диссипации ($Y(NPQ)$) у инокулированных растений (рис. 6.2г) может быть связано с опосредованной ими индукцией экспрессии генов или активацией ферментов, связанных с ксантофилловым циклом (например, виолаксантин-деэпоксидазы) и синтезом специфического белка PsbS, который является ключевым регулятором NPQ (Ruban, 2016), приводящему к более эффективному превращению избыточной световой энергии в тепловую и предотвращению образования АФК. Важный вклад в поддержание функциональной активности ФСII при стрессе, вероятно, вносит выявленная задержка (препятствование) 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 в итоге к снижению уровня ПОЛ в растениях. Таким образом, выявленное снижение окислительного повреждения ($Y(NO)$) (рис. 6.2б) может быть результатом как предотвращения образования АФК за счет высокого NPQ, так и их нейтрализации за счет антиоксидантов, что будет рассмотрено далее в главе 7.

6.3. Влияние инокуляции *B. subtilis* на морфометрические характеристики устьиц проростков пшеницы с разными адаптивными стратегиями при дефиците воды

Ключевым механизмом адаптации растений к абиотическим стрессам является модуляция работы устьичного аппарата. Изменение плотности и размеров устьиц представляет собой стратегию долгосрочной адаптации, направленную на установление баланса между поглощением CO_2 для фотосинтеза и минимизацией потерь воды, напрямую влияющих на продуктивность и выживаемость растений в условиях водного дефицита (Marček et al., 2019; Mickky et al., 2020; Tatar et al., 2023). Мы предположили, что эндофиты могут индуцировать морфологическую перестройку устьичного комплекса как потенциальный механизм повышения устойчивости

растений к водному дефициту. Для проверки этой гипотезы был проведен сравнительный анализ морфометрических параметров устьиц у контрастных по устойчивости генотипов пшеницы в условиях обезвоживания и при инокуляции эндофитом *B. subtilis* 10-4.

Результаты анализа выявили достоверное влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 на морфометрические характеристики устьиц проростков пшеницы обоих генотипов, причем характер изменений определялся исходной адаптивной стратегией сорта. Так, в нормальных условиях произрастания проростки сорта Салават Юлаев отличались более высокой плотностью устьиц (на 26%) по сравнению с проростками сорта Экада70 (рис. 6.3). Микроскопический анализ продемонстрировал (рис. 6.4) выраженные межсортные различия в организации устьичного аппарата: у проростков сорта Экада70 наблюдались более мелкие и компактные устьица, в то время как у проростков сорта Салават Юлаев преобладал удлиненный тип устьиц с более развитыми замыкающими клетками. Эти данные подтверждают большую чувствительность у растений сорта Салават Юлаев к недостатку воды (в сравнении с Экада70), так как чем длиннее устьица, тем больше площадь открытой щели, что ускоряет поглощение CO₂ для фотосинтеза и увеличивает потерю воды через транспирацию. Это обуславливает способность растений с крупными устьицами эффективнее фотосинтезировать в оптимальных условиях произрастания, но быстрее обезвоживаться при стрессе. Напротив, компактные устьица устойчивых сортов позволяют экономнее расходовать воду, ограничивая транспирацию без критического снижения поглощения CO₂, и при возникновении стресса быстрее закрывать устьица для предотвращения потери воды (Marček et al., 2019; Mickky et al., 2020; Tatar et al., 2023).

При инокуляции эндофитом *B. subtilis* 10-4 в нормальных условиях произрастания выявлена тенденция к увеличению (на 10–23%) плотности устьиц у обоих экотипов (рис. 6.3). Эти результаты согласуются с данными Ramandi с соавт. (2024), которые также выявили увеличение плотности устьиц при инокуляции штаммом RGP-бактерии *Cupriavidus metallidurans*, что приводило к повышению устьичной и гидравлической проводимости, усилению фотосинтеза и роста растений кукурузы, томатов и пшеницы.

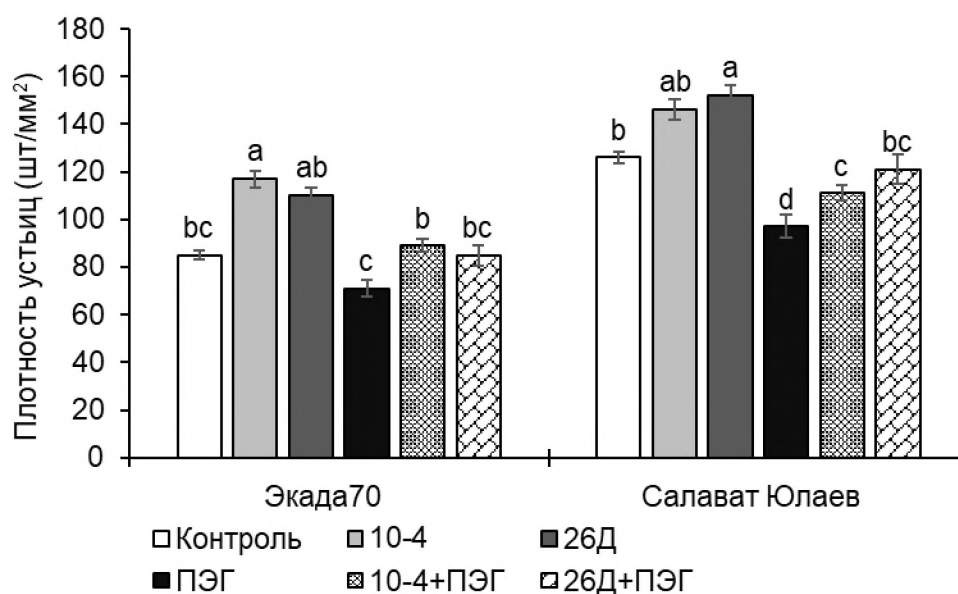


Рис. 6.3. Изменение плотности устьиц у растений пшеницы при инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) и воздействии ПЭГ-индуцированного дефицита воды (10 сут проростки, время воздействия стресса – 6 сут)

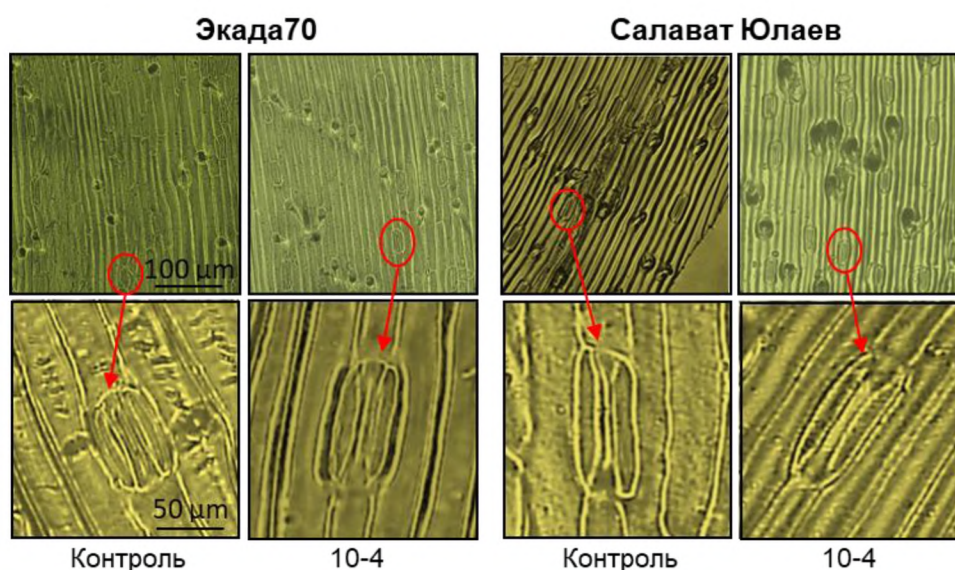


Рис. 6.4. Репрезентативные фотографии эпидермальных отпечатков поверхности листьев 10-сут проростков пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев с использованием бесцветного лака и визуализацией на электронном микроскопе Biozero. Красными стрелками отмечены отдельные устьица

Воздействие ПЭГ-индуцированного дефицита воды привело к снижению плотности устьиц с выраженным эффектом для растений чувствительного сорта (рис. 6.3). Данный фенотипический признак (снижение плотности устьиц при стрессе) коррелирует с адаптацией к дефициту влаги, поскольку уменьшает транспирационные потери и ускоряет регуляцию газообмена за счет закрытия устьиц (Hetherington,

Woodward, 2003). В то же время инокуляция препятствовала стресс-индуцированному снижению плотности устьиц и их закрытию, с выраженным эффектом для проростков сорта Экада70, где картина была сопоставима с контрольными растениями (рис. 6.3). Эти данные согласуются с выявленной в главе 3 способностью контрастных по чувствительности к обезвоживанию инокулированных проростков пшеницы регулировать параметры водного баланса за счет повышенного уровня транспирации (ТИ) (рис. 3.22а,б), относительного содержания воды (ОСВ) (рис. 3.22в,г), осмотического потенциала клеточного сока (рис. 3.22д,ж) в сравнении с контрольными растениями, подвергнутыми стрессу.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что предпосевная инокуляция семян исследуемыми штаммами эндофитных бактерий *B. subtilis* оказывает стресс-протекторный эффект на параметры фотосинтеза (включая предотвращение деградации хлорофиллов, регуляцию фотохимической активности ФСII) растений пшеницы с разными 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 основные фотосинтетические пигменты при дефиците влаги, а также оптимизировать работу устьиц и эффективность водопользования при стрессе.

Обобщая результаты, полученные в данной главе, можно констатировать, что защитный эффект эндофита *B. subtilis* 10-4 реализуется через комплексное воздействие на фотосинтетическую функцию растения-хозяина (пшеницы) в условиях водного дефицита. Установленные эффекты носят многоуровневый характер. Во-первых, сохранение содержания фотосинтетических пигментов в инокулированных растениях свидетельствует о предотвращении стресс-индуцированной деградации светособирающих комплексов. Во-вторых, данные хлорофильной флуоресценции демонстрируют, что инокулированные растения эффективнее распределяют поглощенную световую энергию, направляя ее на фотохимические реакции и активируя механизмы нефотохимического тушения (NPQ), что минимизирует повреждение реакционных центров ФСII. Наконец, выявленные морфометрические изменения

устычного аппарата под влиянием эндофитов указывают не только на смягчение последствий стресса, но и на индукцию долгосрочных адаптивных перестроек, направленных на оптимизацию соотношения между поглощением CO_2 и потерей воды.

В целом, результаты свидетельствуют в пользу того, что инокуляция исследуемыми эндофитными бактериями *B. subtilis* опосредованно через регуляцию гормонального статуса (глава 5) способствует оптимизации функционирования устьчного аппарата и более рациональному закрытию устьиц и формированию морфологии, обеспечивающей поддержание повышенной внутренней концентрации CO_2 , тем самым снижая субстратное ограничение реакций в цикле Кальвина, что, по-видимому, позволяет растениям эффективнее использовать поглощенную световую энергию, о чем свидетельствует высокий показатель квантового выхода ФСII $\Phi_{\text{PSII}} \text{Y(II)}$. В свою очередь, это способствует снижению образования активных форм кислорода (АФК) и потребности в их нейтрализации, что, в конечном итоге, предотвращает деградацию фотосинтетических пигментов и способствует сохранению структурной целостности фотосинтетического аппарата при стрессе.

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, происходящими в клетке (редокс-статус), имеет важное значение для нормального функционирования и выживаемости растений при стрессе (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020). Засуха, как и любое другое стрессовое воздействие, вызывает избыточную выработку АФК, что приводит к изменению клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, инактивации мембраносвязанных белков, снижению текучести мембран, повреждению ДНК и ингибированию синтеза белка и ферментативной активности (Farooq et al., 2009; Hasanuzzaman et al., 2014; 2020; Asseng et al., 2019). Поддержание редокс-статуса в оптимальном состоянии необходимо для защиты клеток от окислительного стресса, регуляции активности ферментов и других белков, поддержания энергетического гомеостаза и обеспечения нормального роста и развития растений. Решающим этапом в преодолении стресса и формирования устойчивости растений является детоксикация АФК, вызванных стрессом, путем использования механизма антиоксидантной защиты, который включает ряд антиоксидантов, как ферментативных (СОД, ПО, КАТ, АРХ и глутатионредуктаза (GR)), так и неферментативных (аскорбат (AsA), глутатион (GSH), цистеин, пролин, флавоноиды, каротиноиды и токоферол) (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020; Масленникова и др., 2019).

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 RGP-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 контрастными стратегиями адаптации к водному дефициту.

Об интенсивности окислительных процессов в клетке можно судить по содержанию конечного продукта перекисного окисления липидов – МДА, а также перекиси водорода (H_2O_2) и супероксида ($O_2^{\cdot-}$), которые в норме присутствуют в тканях в довольно низких концентрациях. В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что различные злаки, инокулированные PGP-бактериями, могут выживать в условиях абиотического стресса за счет снижения вызванных стрессом окислительных повреждений, о чем судят по уровню ПОЛ и утечке электролитов (Shukla et al., 2012; Rashid et al., 2021). Во многих исследованиях на растениях, подвергшихся стрессу, содержание МДА и H_2O_2 заметно снижалось благодаря обработке PGP-бактериями. К примеру, PGP-бактерии могут изменять скорость метаболизма, активируя мощную систему удаления АФК у растений, находящихся в стрессовом состоянии, а также ускорять восстановление стабильности мембран и защищать от фотоповреждений при повторном поливе растений, обработанных бактериями (Puthiyottil et al., 2021). Сообщалось, что штаммы *Bacillus* spp. приводят к изменению баланса АФК и активности антиоксидантных ферментов в пшенице в условиях засухи, играющей важную роль в предадаптирующем и антистрессовом действии на растения (Sood et al., 2020; Rashid et al., 2021).

Среди антиоксидантов AsA и GSH являются наиболее важными в растениях. Обе молекулы поглощают АФК и являются компонентами ключевого антиоксидантного пути Фойера-Холливелла-Асада или AsA-GSH цикла (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020). Исследования показывают, что реакция растений пшеницы на окислительный стресс, вызванный засухой, включает метаболизм AsA-GSH цикла (Hasanuzzaman et al., 2020). Несмотря на накопленные данные о способности PGP-бактерий *B. subtilis* уменьшать вызванные засухой окислительные повреждения растений, до сих пор неясно, как именно они могут влиять на метаболизм AsA-GSH и каков их вклад в эндофит-опосредованную устойчивость к засухе у различных экотипов пшеницы.

В связи с этим нами была проведена оценка влияния *B. subtilis* 10-4 на окислительный статус (МДА, H_2O_2) и компоненты AsA-GSH комплекса (AsA, GSH, GSSG, APX, GR) у подвергнутых обезвоживанию (12%ПЭГ) растений пшеницы с разными стратегиями адаптации к засухе на ранних стадиях онтогенеза.

7.1. Оценка уровня генерации H_2O_2 и перекисного окисления липидов у различающихся по стратегии адаптации растений экотипов пшеницы в условиях водного дефицита при инокуляции *B. subtilis*

Как видно из рис. 7.1, в условиях водного дефицита инокуляция *B. subtilis* 10-4 снижает содержание конечного продукта перекисного окисления липидов МДА и уровень H_2O_2 в проростках пшеницы обоих экотипов (рис. 7.1), свидетельствуя о защитном эффекте от окислительных повреждений. В частности, воздействие стресса приводило к значительному образованию H_2O_2 в корнях неинокулированных растений обоих экотипов пшеницы (рис. 7.1). В корнях растений сорта Экада70 уровни H_2O_2 увеличились примерно на 130% с максимумом через 1 ч воздействия засухи (рис. 7.1а). В корнях растений сорта Салават Юлаев было зафиксировано транзитное (почти на 300%) увеличение содержания H_2O_2 через 0,5 ч стресса (рис. 7.1в). Предобработка *B. subtilis* 10-4 поддерживала H_2O_2 в растениях обоих экотипов на уровнях, сопоставимых с контрольными растениями (рис. 6.1а,б). Примечательно, что у растений, не подвергшихся стрессу, начальная концентрация H_2O_2 была выше у сорта Экада70 по сравнению с сортом Салават Юлаев (рис. 6.1а,б).

Значительное увеличение (на 260%) уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), о чем судили по концентрации МДА, наблюдалось у проростков сорта Салават Юлаев после 7 ч воздействия дефицита воды (рис. 7.1в), тогда как у проростков сорта Экада70 максимальное увеличение составило всего 130%. И наоборот, уровень МДА был значительно снижен у проростков пшеницы, подвергнутых стрессу, предварительно обработанных штаммом 10-4. Этот эффект был более выраженным (почти достигая контрольных уровней) у проростков сорта Экада70 (рис. 7.1в), но у проростков чувствительного к стрессовому фактору сорта

Салават Юлаев – снижался на 62%. Кроме того, при нормальных условиях концентрация МДА не изменялась у растений сорта Экада70, инокулированных 10-4, но в условиях стресса наблюдалось небольшое увеличение (на 115%) у растений сорта Салават Юлаев по сравнению с контрольными неинокулированными проростками (рис. 7.1).

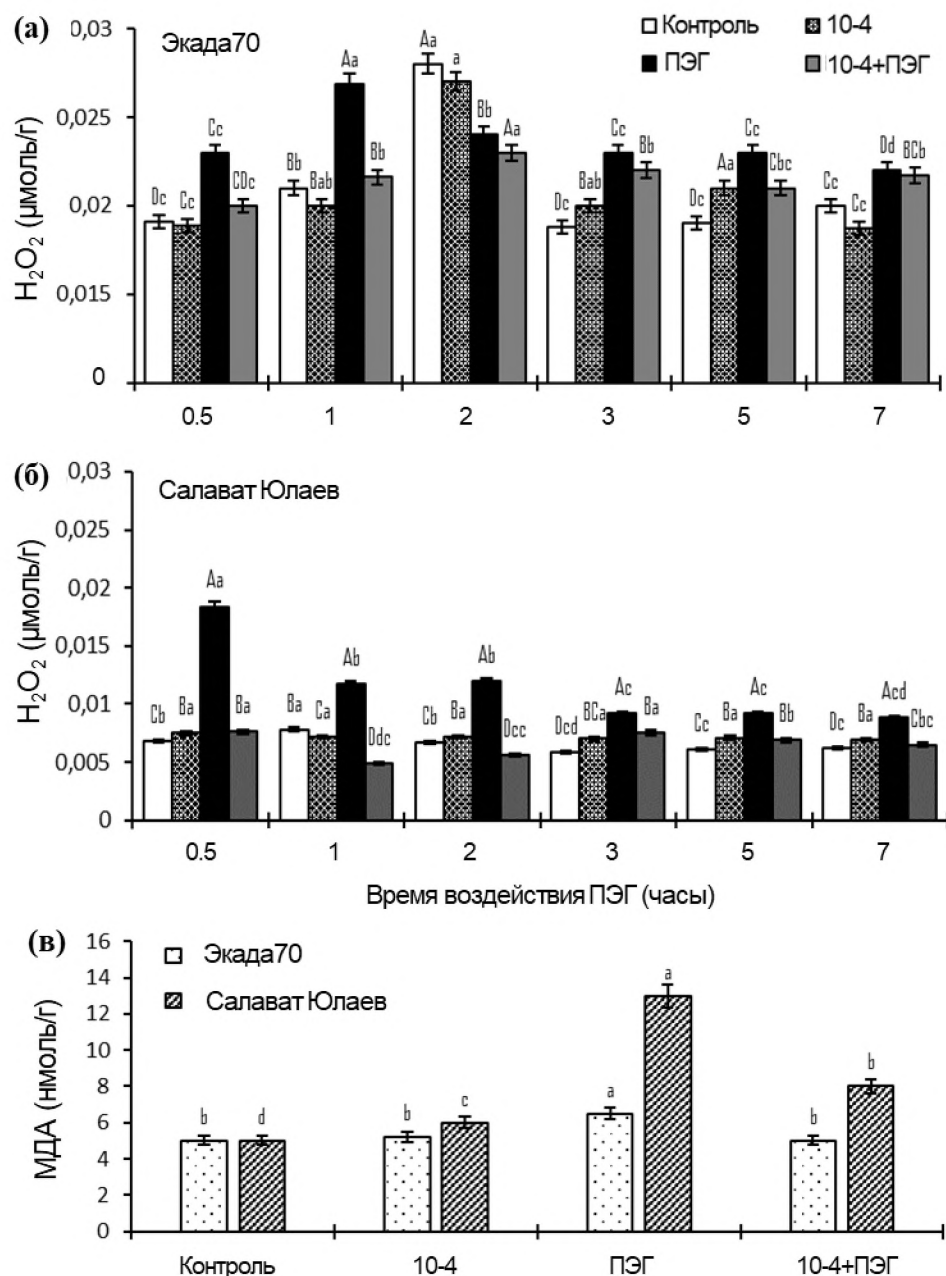


Рис. 7.1. Влияние инокуляции семян эндофитными *B. subtilis* 10-4 на генерацию пероксида водорода (H_2O_2) (а,б) в корнях и перекисное окисление липидов (МДА) (в) у 4-сут проростков пшеницы степного Волжского (Экада70) и лесостепного западносибирского (Салават Юлаев) экотипов в норме и при дефиците воды, моделированной 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ). МДА оценивали в проростках пшеницы, подвергнутых засухе в течение 7 ч (в). 0.5–7 – время воздействия 12% ПЭГ (ч)

Интересно, что в нормальных условиях произрастания (до стресса) сама инокуляция эндофитом активировала некоторые антиоксидантные ферменты. В частности, способность *B. subtilis* 10-4 в нормальных условиях незначительно увеличивать содержание H_2O_2 в корнях проростков (рис. 7.1) может играть важную роль в биохимических процессах, связанных с биосинтезом суберина и лигнина (Cabane et al., 2012). Это может помочь укреплять клеточные стенки и впоследствии обеспечивать эффективную нейтрализацию избыточного (повреждающего) стресс-индуцированного увеличения АФК, а также предотвратить нарушение целостности мембранных структур клеток и изменения их проницаемости в условиях стресса. В пользу этого в нашем предыдущем исследовании мы продемонстрировали, что инокуляция *B. subtilis* 10-4 усиливала отложение лигнина в корнях бобовых растений (рис.3.10a) (Lastochkina et al., 2021; Ласточкина и др., 2023) и пшеницы (рис.3.10б) (Lastochkina et al., 2023b; Maslennikova et al., 2023) в нормальных условиях и оказывала защитное действие при стрессе, уменьшая окислительные повреждения. Очевидно, бактерии-эндофиты *B. subtilis* воспринимаются растениями как агенты, вызывающие начальные внутриклеточные изменения в антиоксидантной системе, которые, однако, не приводят к повреждению проростков (рис. 7.1). Такая низкая продукция АФК может быть важна для предадаптирующего действия 10-4 на растения к последующим стрессовым ситуациям, поскольку известно, что АФК действуют как сигнальные молекулы при иницировании каскада защитных реакций у растений (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020). Однако резкое повышение АФК, вызванное стрессом, может привести к серьезным разрушительным последствиям (Farooq et al., 2009; Hasanuzzaman et al., 2014; 2020). В настоящее время имеются существенные доказательства того, что различные растения, инокулированные различными RGP-бактериями, могут выживать в условиях окислительных повреждений, вызванных абиотическими стрессами, воздействуя на антиоксидантные ферменты (Kim et al., 2014; Kaushal, 2019; Rashid et al., 2021; Puthiyottil et al., 2021). Сообщалось, что повышенная активность СОД, ПО, КАТ, АРХ и GR в растениях, инокулированных RGP-

бактериями, является одним из основных механизмов защиты растений от засухи, вызванной микробами (Kaushal, 2019; Rashid et al., 2021).

7.2. Влияние инокуляции семян *B. subtilis* 10-4 на содержание аскорбата (AsA) и глутатиона (GSH) у контрастных по стратегии адаптации к обезвоживанию экотипов пшеницы в условиях дефицита влаги

Ключевая роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза отводится неферментативным антиоксидантам AsA и GSH, которые участвуют в прямой нейтрализации избытка АФК и выступают основными компонентами AsA-GSH цикла (Hasanuzzaman et al., 2014; 2020). В данном цикле APX катализирует восстановление H_2O_2 до воды, используя восстановленную форму AsA в качестве донора электронов. Далее дегидроаскорбатредуктаза (DHAR) восстанавливает дегидроаскорбиновую кислоту (DHA), образовавшуюся из монодегидроаскорбата (MDHA), используя для этого GSH. В результате GSH окисляется до окисленной формы (GSSG), которая, в свою очередь, восстанавливается до GSH ферментом GR. Таким образом, AsA-GSH цикл поддерживает клеточный редокс-гомеостаз за счет регуляции трех взаимозависимых пар: AsA/DHA, GSH/GSSG и NADPH/NADP⁺ (Hasanuzzaman et al., 2020).

Впервые выявлено различие в содержании AsA и GSH в исследуемых проростках на начальных стадиях онтогенеза (рис. 7.2). В нормальных условиях проростки сорта Экада70 характеризовались незначительным, но достоверно более высоким (на 124%) содержанием GSH (рис. 7.2Аа) по сравнению с проростками сорта Салават Юлаев (рис. 7.2б), которые в то же время содержали значительно больше AsA (160%) (рис. 7.2б). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 приводила к дополнительному накоплению AsA в проростках обоих сортов в норме (рис. 7.2а,б), причем наибольшее накопление на протяжении всего эксперимента наблюдалось у устойчивого экотипа (приблизительно 150% относительно контроля) (рис. 7.2а), тогда как у чувствительного варьировало в пределах 123–125% относительно контроля (рис. 7.2б). Уровень GSH в инокулированных растениях существенно не изменялся, хоть и наблюдалось небольшое накопление. Уровень окисленного GSH

(GSSG) в инокулированных растениях обоих сортов оставался неизменным (рис. 7.2г,д), свидетельствуя об отсутствии негативного действия бактерий на их физиологическое состояние.

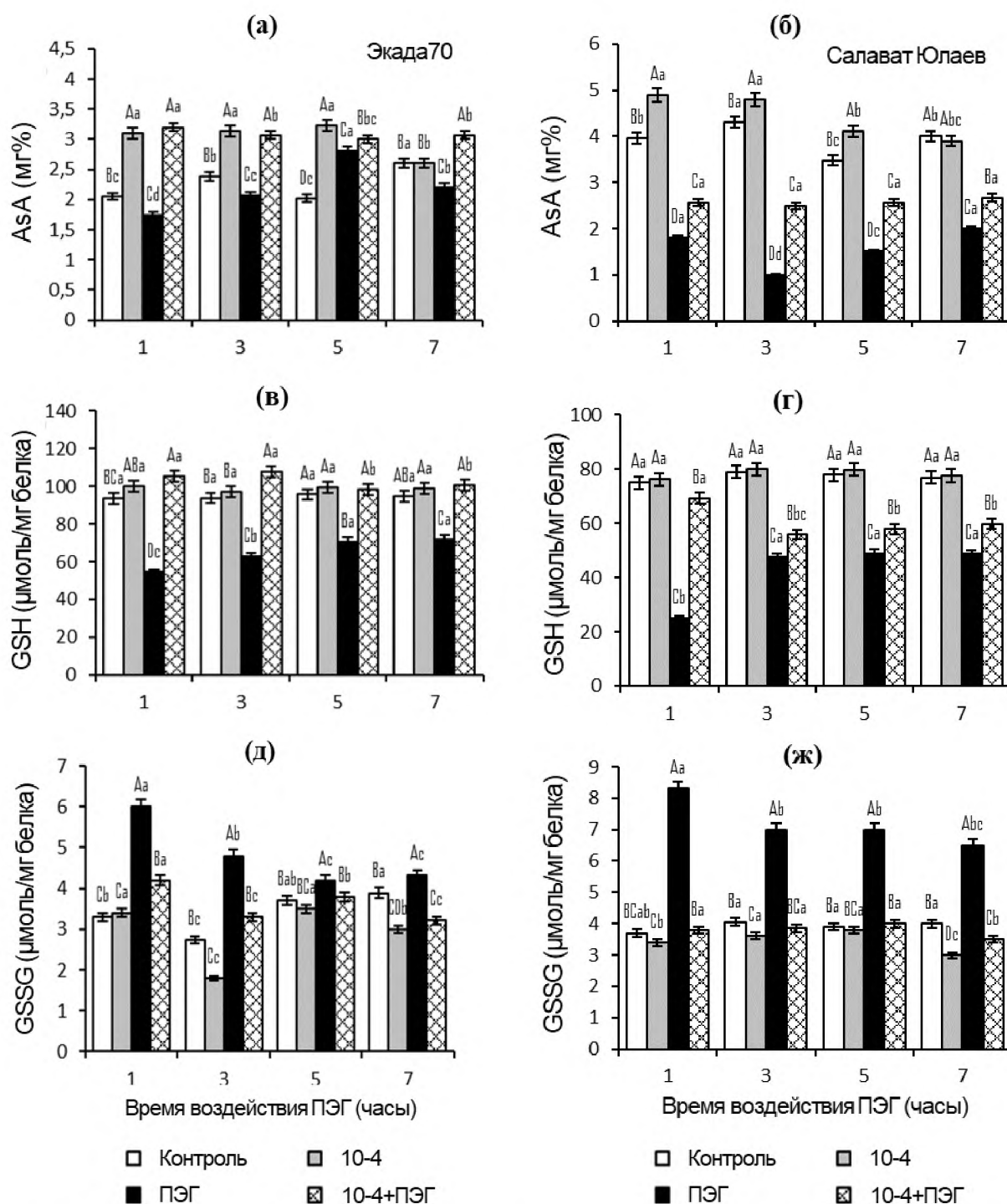


Рис. 7.2. Влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* 10-4 на содержание неферментативных антиоксидантов аскорбата (AsA) (а,б), восстановленного глутатиона (GSH) (в,г) и окисленного глутатиона (GSSG) (д,ж) в 4-сут проростках пшеницы степного Волжского (сорт Экада70) и лесостепного западносибирского (сорт Салават Юлаев) экотипов в норме и при ПЭГ-индуцированной засухе

Результаты исследования демонстрируют различную реакцию на водный дефицит у двух изучаемых сортов пшеницы. Обнаружено, что растения сорта Салават Юлаев более чувствительны к дефициту воды в сравнении с сортом Экада70, о чем свидетельствует резкое 2-кратное снижение AsA и 3-кратное снижение GSH на протяжении всего эксперимента (рис. 7.2д), что коррелировало с повышением уровня окисленного GSH (GSSG) (рис. 7.2в). Напротив, растения сорта Экада70 продемонстрировали высокую устойчивость к водному дефициту: в условиях стресса содержание AsA снизилось лишь на 20% относительно контроля (рис. 7.2а). Тогда как глутатионовая система отреагировала активнее: уровень GSH снизился в 1.5 раза (рис. 7.2в), а содержание GSSG уже к 1 ч возросло вдвое, с последующим заметным снижением к 5 ч воздействия стресса (рис. 7.2д). Влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 также оказалось сортоспецифичным. Так, у проростков чувствительного сорта Салават Юлаев инокуляция не предотвращала стресс-индуцированное снижение AsA (рис. 7.2б), но способствовала поддержанию его уровня на 130-250% выше контрольных значений. Параллельно отмечалось повышение содержания GSH (рис. 7.2г) и восстановление пула GSSG до уровня контроля (рис. 7.2ж). У проростков устойчивого сорта Экада70 инокуляция в условиях дефицита воды полностью стабилизировала содержание как GSH, так и AsA до уровня контрольных (нестрессированных) растений (рис. 7.2а,в,д).

7.3. Влияние инокуляции *B. subtilis* 10-4 на активность аскорбат пероксидазы (APX) и глутатион редуктазы (GR) у различающихся по стратегии адаптации к обезвоживанию экотипов пшеницы в условиях дефицита влаги

Результаты, представленные на рисунке 7.3 демонстрируют выраженную активацию APX и GR под воздействием водного дефицита у обоих экотипов пшеницы (рис. 7.3). Однако амплитуда ответной реакции у проростков сорта Салават Юлаев была существенно выше (рис. 7.3б,г), где стресс вызвал увеличение активности APX и GR более чем на 300% и 200%, соответственно. В то же время у проростков сорта Экада70 активность APX и GR увеличилась примерно на 150% и

120–170%, соответственно (рис. 7.3а,в). Кроме того, у обоих экотипов после 3 ч воздействия стресса наблюдалось снижение активности GR (рис. 7.3в,г). Предобработка *B. subtilis* 10-4 в условиях дефицита воды приводила к снижению активности APX (на 142–173%) и GR (на 120–192%) у растений сорта Салават Юлаев (рис. 7.3б,г). Тогда как у растений сорта Экада70 наблюдалось меньшее снижение активности APX (на 115–120% от контроля) и, напротив, дополнительная активация GR (на 125–130%) (рис. 7.3а,в). Примечательно, что инокуляция в нормальных условиях также приводила к различной (сортоспецифичной) активации этих антиоксидантных ферментов: у растений сорта Салават Юлаев активность APX и GR увеличилась на 260% и 140%, соответственно (рис. 7.3б,г), тогда как у растений сорта Экада70 – на 115% и 150% (рис. 7.3а,в).

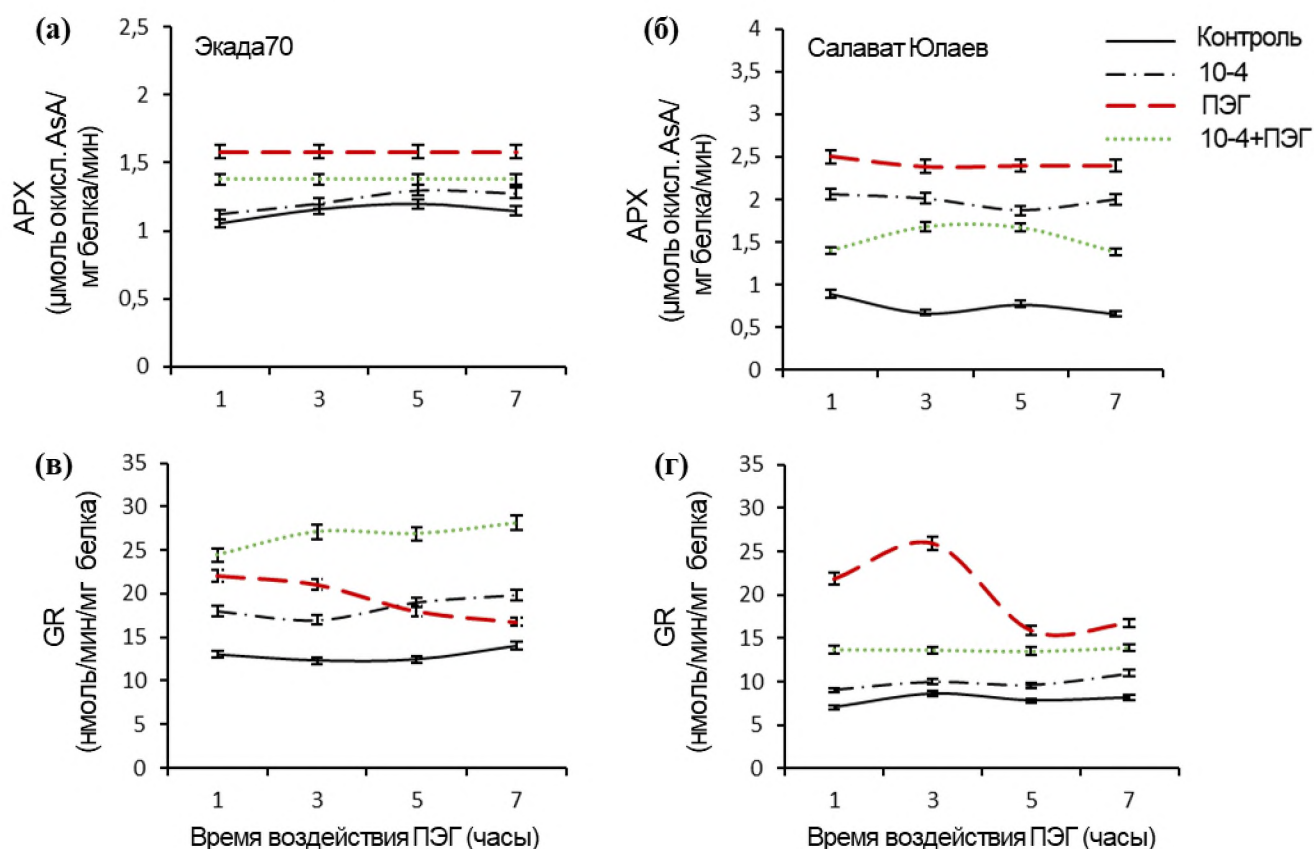


Рис. 7.3. Влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* 10-4 (Bs) на активность аскорбатпероксидазы (APX) (а,б) и глутатионредуктазы (GR) (в,г) в проростках пшеницы (4-сут) степного Волжского (Экада70) и лесостепного западносибирского (Салават Юлаев) экотипов в норме и при водном дефиците, моделированном 12% ПЭГ-6000 (ПЭГ)

Полученные данные демонстрируют, что эндофитный штамм *B. subtilis* 10-4 модулирует активность ключевых ферментов AsA-GSH цикла (APX и GR) двух различных экотипов пшеницы, что согласуется с известной способностью PGP-бактерий нивелировать окислительный стресс у растений. Однако наблюдаемые эффекты оказались специфичными и зависели от генотипа растения. Обнаруженная двойственная стратегия бактерий находит свое отражение в литературе. Так, в работе Zhang et al. (2020) сообщается о подавлении активности антиоксидантных ферментов (APX, KAT) PGP-бактериями *B. amyloliquefaciens* SB-9, что коррелирует со снижением уровня H₂O₂ и, как следствие, уменьшением потребности растений пшеницы в гиперактивации антиоксидантной системы при солевом стрессе. В других исследованиях (Srivastava et al., 2016; Puthiyottil et al., 2021) наблюдается, напротив, индукция PGP-бактериями активности GR и APX и усиление всего AsA-GSH цикла для активной нейтрализации АФК. Как показали Zhou с соавт. (2016), штамм *B. amyloliquefaciens* 5113 оказывал защитное действие на растения пшеницы во время засухи через регуляцию экспрессии гена APX1 и активности ферментов AsA-GSH цикла. Высокое внутриклеточное содержание AsA и GSH обеспечивало повышенную антиоксидантную способность клеток, что являлось ключевым механизмом защиты (Zhou et al., 2016). Это указывает на то, что стратегия бактерий может варьироваться в зависимости от вида растения и типа стресса. Интересно, что в нормальных условиях инокуляция *B. velezensis* 5113 практически не оказывала влияния на цикл AsA-GSH у пшеницы, но значительно снижала активность APX при тепловом стрессе. Однако в условиях засухи и холодового стресса существенного снижения обнаружено не было (Kasim et al., 2013). Кроме того, сообщалось, что засуха увеличивает активность генов, связанных со стрессом, включая *APX1*, *SAMS1* и *HSP17.8* в листьях пшеницы, и повышает активность ферментов цикла AsA-GSH. В то время как у тех же растений, обработанных бактериями, количество транскриптов этих генов уменьшилось, свидетельствуя об улучшении состояния гомеостатических механизмов за счет бактериальной инокуляции (Kasim et al., 2013). Очевидно, что штаммы *Bacillus* spp. могут снижать степень окислительного повреждения различными способами с вовлечением

различных биохимических путей, которые могут зависеть от многих факторов, включая свойства самого штамма, вид растения, природы стресса и интенсивность. Наши результаты показали, что растения засухоустойчивого сорта Экада70 характеризуются более высоким природным содержанием GSH и повышенной активностью GR, что, вероятно, обуславливает их способность минимизировать стресс-индуцированное снижение уровней AsA и GSH (рис. 7.2). Напротив, у чувствительного сорта Салават Юлаев наблюдалось выраженное уменьшение содержания этих антиоксидантов при водном дефиците. Хотя дефицит воды вызывал существенную активацию ферментов APX и GR у растений обоих сортов, но амплитуда ответа была значительно выше у растений сорта Салават Юлаев. Эффективность работы антиоксидантной системы подтверждается корреляцией с динамикой накопления H_2O_2 , МДА (рис. 7.1), а также с ростовыми показателями этих растений (рис. 4.2). Инокуляция *B. subtilis* 10-4 оказала выраженное положительное влияние на оба сорта, хотя механизмы этого воздействия различались. У растений сорта Салават Юлаева инокуляция эндофитом способствовала повышению уровня антиоксидантов и практически полному восстановлению соотношения GSH/GSSG, что, очевидно, связано с снижением гиперактивации APX и GR при стрессе. У проростков сорта Экада70 инокуляция эндофитом обеспечила практически полное восстановление содержания AsA и GSH, вероятно, благодаря способности бактерий индуцировать преадаптационное накопление AsA и активацию GR в нормальных условиях. Эти результаты указывают на ключевую роль AsA и GSH в формировании индуцированной *B. subtilis* 10-4 засухоустойчивости исследуемых экотипов пшеницы. Интересно отметить, что важный вклад в способность эндофита *B. subtilis* 10-4 вовлекаться в работу AsA-GSH цикла и в поддержание редокс гомеостаза может вносить наличие в геноме этой бактерии генов, ассоциированных с устойчивостью растений к оксидативному стрессу (*GPX*, *GloA*, *PerR*, *SODB*, *SODC*, *SODMn*, *OsmcI*, *OsmcIR*, *AhpC*, *NsrR*, *FUR*), что выявлено в результате биоинформатического анализа генома штамма 10-4 (глава 9.2.2).

В целом, совокупность полученных в этой главе данных свидетельствуют в пользу того, что выявленная специфичность реакций, различающихся по стратегии адаптации к засухе экотипов пшеницы в ответ на инокуляцию эндофитом *B. subtilis* 10-4 обусловлена их способностью регулировать компоненты AsA-GSH комплекса в качестве эффективной антиоксидантной системы. Результаты демонстрируют, что ключевую роль в реализацию протекторного действия *B. subtilis* 10-4 на контрастные по стратегии адаптации к засухе растения пшеницы степного Волжского (Экада70, устойчивый) и лесостепного западносибирского (Салават Юлаев, чувствительный) играют AsA и GSH соответственно; что в обоих случаях приводит к уменьшению окислительных повреждений мембран и улучшению роста растений в условиях водного дефицита (с максимальным положительный эффектом на растениях сорта Экада70).

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

Формирование устойчивости растений к комплексным стрессовым воздействиям, таким как сочетание гербицидов (Гб) и засухи, представляет важную задачу современного сельскохозяйственного производства. В этом контексте особый интерес вызывают микробные биоинокулянты, способные оказывать пролонгированный протекторный эффект на растения-хозяева, повышая их адаптивный потенциал. Полученные нами данные в лабораторных условиях на ранних стадиях развития растений продемонстрировали эффективность предпосевной инокуляции семян эндофитными бактериями *B. subtilis* в стимуляции роста и стресс-устойчивости растений, включая различающихся по стратегии адаптации к обезвоживанию экотипы пшеницы. Однако остаётся неясным способны ли эндофиты при предпосевной инокуляции семян сохранять способность регулировать метаболизм растений и их устойчивость к комбинированному воздействию гербицидного прессинга и засухи в поздние стадии онтогенеза, и если да, то какие механизмы лежат в основе их долговременной защитной активности и как это отражается на урожайности и качестве продукции. В связи с этим данная глава посвящена изучению роли эндофитных *B. subtilis* в пролонгированных адаптивных реакциях растений пшеницы, контрастных по устойчивости и стратегиям адаптации к обезвоживанию, в условиях комбинированного воздействия Гб и засухи (ГбЗ). Проведено комплексное изучение влияния предпосевной инокуляции *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на морфофизиологические, биохимические показатели роста, устойчивости, урожайности и качества зерна в вегетационных экспериментах в контролируемых и полевых условиях.

В современных технологиях возделывания пшеницы использование Гб для борьбы с сорной растительностью играет важную роль, но создает дополнительную нагрузку на растения и, в сочетании с засухой, оказывает пагубное влияние на урожайность культуры, что становится все более ощутимым в условиях меняющегося климата (Verma, 2021; Todorova et al., 2021; 2022). Гб являются серьезной экологической

проблемой, главным образом из-за способности проникать в метаболические пути растений и микроорганизмов (Łozowicka et al., 2021), быстро всасываясь листовой поверхностью и корневой системой растений, и свободно перемещаться вместе с питательными веществами, накапливаясь в точках роста. Под действием Гб отмечается снижение интенсивности фотосинтеза и активности ферментов, ингибирование синтеза хлорофилла и белка в растениях (Varshney et al., 2012). На полях с посевами пшеницы часто используют высокоселективные Гб против однолетних и некоторых многолетних двудольных сорняков. К примеру, состав Гб Secator® Turbo (активные ингредиенты: йодосульфурон метилнатрий, амидосульфурон и мефенпирдиэтил (антидот)) (Байер, Германия) обеспечивает надежность в борьбе с трудноудаляемыми сорняками, разросшимися и обработанными в сложных погодных условиях. Применение Гб, как правило, не рекомендуется для сельскохозяйственных культур, подверженных абиотическим стрессам, таким как засуха, что часто указано в инструкциях производителя. Однако засуха является непредсказуемым, часто повторяющимся явлением почти во всех регионах выращивания пшеницы, где применение Гб является обычной практикой (Benevenuto et al., 2021). При увеличении числа факторов, одновременно воздействующих на растения, их выживаемость и рост снижаются, даже если уровни каждого из этих отдельных стрессоров низкие (Todorova et al., 2021). Совместное воздействие ГбЗ приводит к значительным морфофизиологическим и биохимическим изменениям в растениях, включая подавление роста, снижение фотосинтетической активности, изменение окислительного метаболизма, нестабильность мембран, проводимости устьиц, увеличение окислительного стресса, угнетение роста корней, уменьшение площади листьев и нарушение водного баланса, что отражается в сниженной урожайности (Benevenuto et al., 2021; Vikrant et al., 2021; Radchenko et al., 2021; Todorova et al., 2022). Таким образом, засуха в сочетании с применением Гб оказывает синергетическое негативное влияние на рост растений и урожайность (Pascual et al., 2022), и, становится все более усугубляемой в связи с текущим изменением климата. Растения и бактерии установили синергетические взаимодействия для смягчения вредных стрессов (Cherif et al., 2015; Lastochkina, 2019). Положительное влияние PGP-бактерий в борьбе

растений пшеницы с засухой хорошо задокументировано и подробно рассмотрено в наших обзорных работах (Lastochkina et al., 2019a; Ласточкина, 2021; Ласточкина, Аллагулова, 2023; Lastochkina, Bosacchi, 2023). Например, обработка *B. safensis* W10 и *Ochrobactrum pseudogregnonense* IP8 оказала стимулирующее рост и защитное действие на шесть различных сортов пшеницы, пострадавших от засухи, что выразилось в увеличении массы корней, всходов и урожайности зерна (Chakraborty et al., 2013). Аналогичные данные были получены от других штаммов бактерий (*Pantoea alhagi*, *Risobium leguminosarum*, *R. phaseoli*, *Mesorhizobium ciceri*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*) на пшенице, пораженной засухой на разных стадиях развития, включая период цветения (Arzanesh et al., 2011; Hussain et al., 2014; Çakmakçı et al., 2017; Chen et al., 2017). Однако, с момента открытия и установления роли PGP-бактерий в регуляции антистрессовых физиологических программ у растений особое внимание уделялось реакции растений на обработку PGP-бактериями при влиянии индивидуальных стрессов и мало внимания уделялось вопросу комбинированного воздействия различных стрессов. Только недавно использование штаммов PGP-бактерий для защиты растений от токсичности Гб (Bourahla et al., 2018; Shahid et al., 2018; Bernat et al., 2018; Korobov et al., 2021; Mironenka et al., 2021) отдельно и в сочетании с другими стрессами было рассмотрено в нескольких публикациях (Chennappa et al., 2018; Timergalin et al., 2020; Chetverikov et al., 2021; Feoktistova et al., 2021; Chetverikov et al., 2022). Исследования, посвященные воздействию PGP-бактерий на пшеницу при комбинированном воздействии ГбЗ находятся на начальной стадии (Bourahla et al., 2018; Timergalin et al., 2020). Например, в работе Четверикова С. (2019) сообщалось, что среди 11 бактериальных изолятов с антистрессовыми свойствами в условиях засухи, наиболее активные из них также были устойчивы к действию ряда Гб на основе 2,4-D и сульфонилмочевины, синтезировали фитогормоны, мобилизовали соединения Р, обладали потенциалом к фиксации N₂, а также значительной противогрибковой активностью. В частности, было продемонстрировано, что штамм *Pseudomonas avellanae* 6CH2 стабилен и может расти с высокой скоростью в среде, содержащей синтетические Гб на основе ауксина (Октапон, 10 мл/л; Чисталан, 5 мл/л) и производные сульфонилмочевины (Наномет, 0,05 г/л) (Chetverikov, 2019). Более того,

инокуляция *P. avellanae* 6 CH2 оказывала антистрессовое действие на растения пшеницы, опрыскиваемые Гб на основе этих синтетических ауксинов 2,4-D, дикамба (Октапон, Чисталан) и метсульфурон-метил (Наномет) (Chetverikov et al., 2021).

Следует отметить, что к моменту начала нашей работы в литературе отсутствовала информация о влиянии эндофитных PGP-бактерий *B. subtilis* на растения пшеницы с различающимися адаптивными стратегиями при комбинированном воздействии ГбЗ, что определяло высокую степень актуальности проведения исследований в этом направлении. Кроме того, оставалось неясным на каком этапе стрессорного ответа проявляется протекторное действие эндофитов – до начала засухи (этап предадаптации) или во время воздействия стресса и какова специфика защитного ответа опрысканных Гб растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями на недостаток влаги. Ранее мы установили, что клетки обоих штаммов, протестированных в нашем исследовании, устойчивы к Гб и ПЭГ (рис. 3.9), а также способны улучшать прорастание, всхожесть семян и ранний рост гидропонных проростков в присутствии разных концентраций Гб и ПЭГ (рис. 3.10, табл. 3.4) (глава 3.6). Далее было исследовано влияние инокуляции семян эндофитными *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на физиолого-биохимические параметры роста и устойчивости у различающихся по стратегии адаптации пшеницы в условиях комбинированного воздействия гербицида и почвенной засухи (ГбЗ) и в пост-стрессовый период (восстановление) в вегетационных экспериментах в контролируемых условиях.

8.1. Фенотипическая и ростовая реакция инокулированных эндофитными *B. subtilis* растений пшеницы с контрастными адаптивными стратегиями в условиях комбинированного воздействия гербицида и почвенной засухи (ГбЗ) в вегетационных экспериментах

Как видно из рисунков 8.2 и 8.2, в нормальных условиях произрастания эндофиты в разной степени увеличивали (на 10–50%) интенсивность ростовых процессов (длину наземной части и корней, их сырую и сухую биомассу) растений пшеницы на протяжении всего периода вегетации, что свидетельствует о пролонгированном ростстимулирующем влиянии эндофитов.

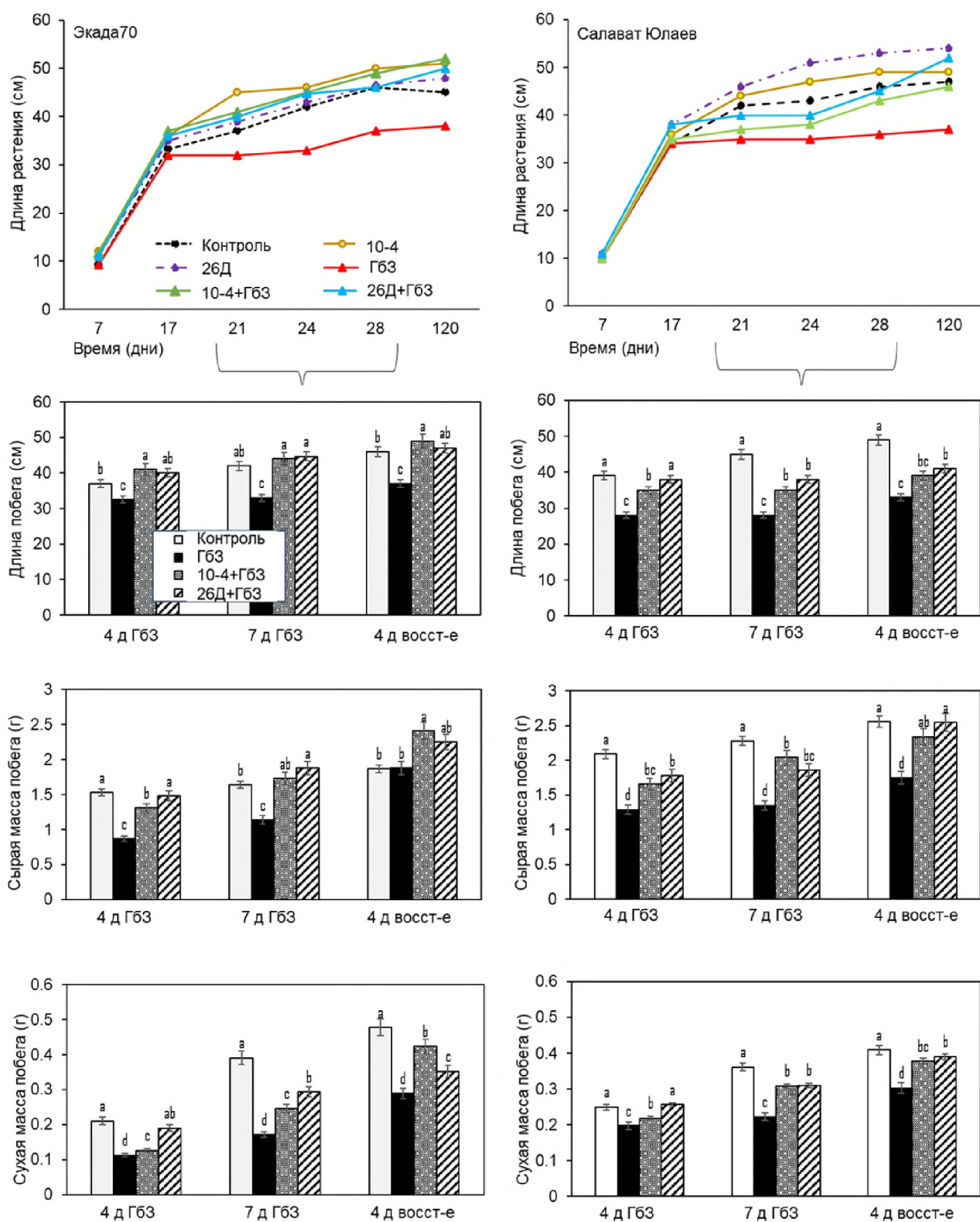


Рис. 8.1. Влияние *B. subtilis* 10-4 и 26Д на рост (длину, свежую и сухую массу) надземной части (побегов) пшеницы сортов Экада70 (а) и Салават Юлаев (б) при комбинированном воздействии гербицида Sekator Turbo® и засухи (Г63), а также в пост-стрессовый период (4 дня восстановления) после возобновления полива

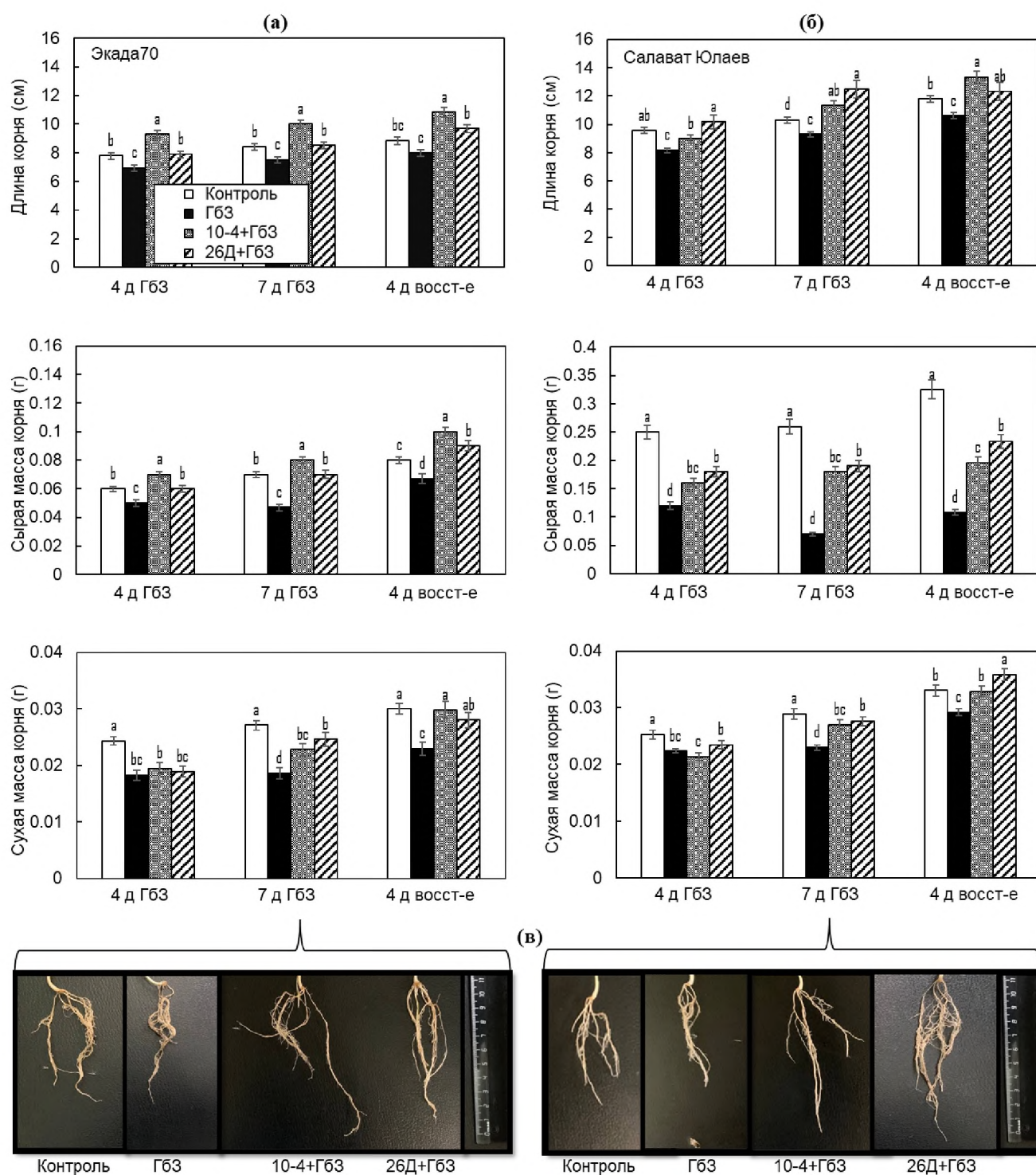


Рис. 8.2. Влияние *B. subtilis* 10-4 и 26Д на рост корней (длину, сырую и сухую массу) растений пшеницы сортов Экада70 (а) и Салават Юлаев (б) при воздействии гербицидного стресса и засухи (Г63) и в пост-стрессовый период (через 4 дня восстановления) после возобновления полива; (в) внешний вид корней пшеницы, инокулированных эндофитными бактериями (10-4, 26Д) и после опрыскивания гербицидом, подвергнутых почвенной засухе в течение 7 дней

Репрезентативные фотографии внешнего вида инокулированных и неинокулированных (контрольных) растений пшеницы обоих сортов, опрысканных Гб

и подвергнутых почвенной засухе (ГбЗ) в течение 4 и 7 дней с последующим восстановлением нормального полива (после 4 и 12 дней), представлены на рисунке 8.3.

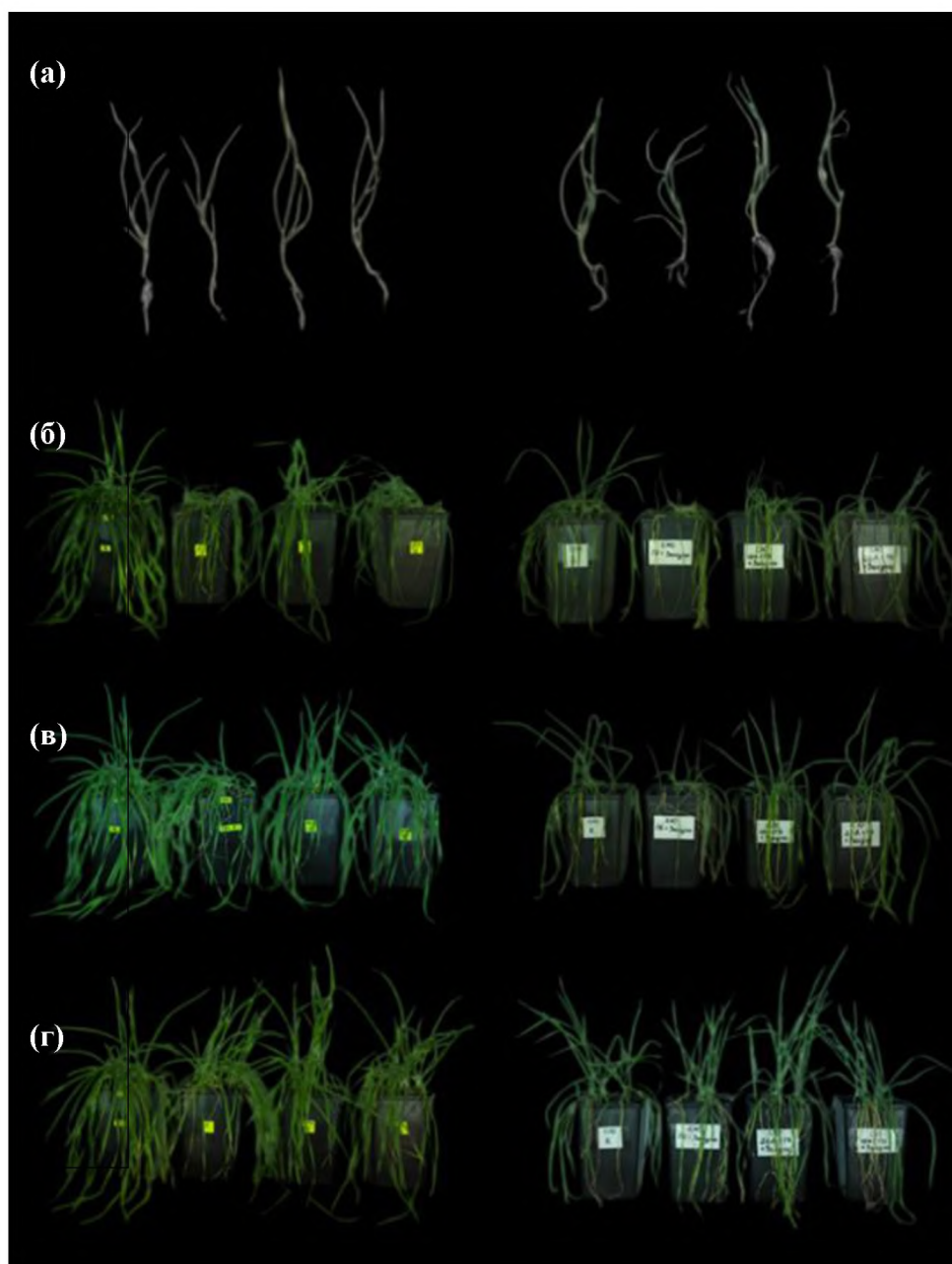


Рис. 8.3. Влияние *B. subtilis* 10-4 и 26Д на фенотипические характеристики растений пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев, опрысканных гербицидом Sekator Turbo® и подвергнутых почвенной засухе в течение 4-х и 7-ми дней с последующим возобновлением полива. (а) 4-дневное воздействие засухи; (б) 7-дневное воздействие засухи; (в) 4-дневное восстановление после возобновления нормального полива, (г) 12-дневное восстановление

Видно, что засуха вызывала типичные фенотипические изменения у растений, которые не были обработаны бактериями и не были опрысканы Гб, и зависела от продолжительности стрессового воздействия (рис. 8.3). Очевидное увядание растений

и задержка роста наблюдались после 7 дней воздействия засухи для обоих сортов пшеницы. Количество и степень увядания и пожелтения листьев были больше выражены в условиях ГбЗ, чем при отдельных последствиях засухи. Воздействие ГбЗ замедляло рост побегов и корней обоих сортов (на 25–40%), снижало их сырую (на 30–60%) и сухую биомассу (на 30–50%) (рис. 8.1, рис. 8.2) с максимальной амплитудой стресс-индуцированных колебаний у растений сорта Салават Юлаев. Кроме того, после 7-ми дневного воздействия ГбЗ с последующим возобновлением полива растения обоих сортов характеризовались снижением на 16% (Экада70) и на 20% (Салават Юлаев) высоты наземной части по сравнению с контролем (рис. 8.1). Через 4 дня после возобновления обычного полива растения во всех группах (с и без применения гербицида), которые подверглись почвенной засухе, начинали восстанавливать тургор и возобновлять рост (рис. 8.3).

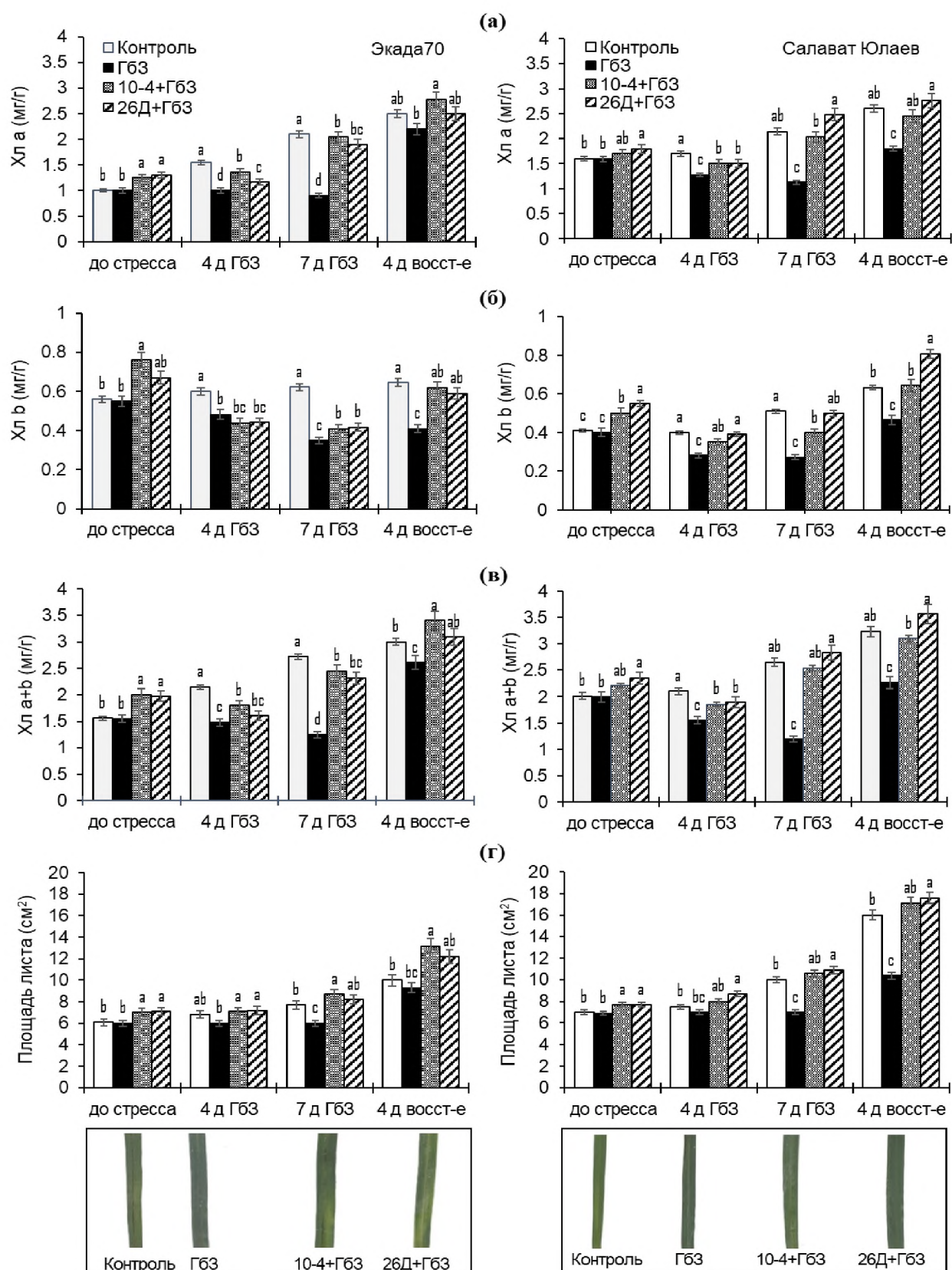
Установлено, что инокуляция семян пшеницы клетками штаммов *B. subtilis* 10-4 и 26Д, для которых продемонстрирована толерантность при культивировании на средах в присутствии гербицида Sekator Turbo® и ПЭГ (дефицит влаги) (рис. 3.9, табл. 3.4) способствовала улучшению всхожести семян и роста проростков пшеницы при выращивании на чашках Петри с разными концентрациями гербицида и ПЭГ на ранних стадиях (рис. 3.10, табл. 3.4) (глава 3.6) и оказывала пролонгированный защитный эффект на вегетирующие растения в поздние стадии развития при предпосевной обработке (рис. 8.1–8.3). Так, инокуляция уменьшала (на 40–50%) негативное воздействие ГбЗ на рост растений обоих сортов и приводила к ускоренному восстановлению после возобновления полива (рис. 8.1–8.3). В частности, в условиях воздействия комбинированного стресса у инокулированных растений длина корней и побегов была увеличена по сравнению с контролем, соответственно, на 128% и 135% (Экада70), 130% и 137% (Салават Юлаев), а также их сырой и сухой биомассы на 130–150% (рис. 8.1, рис. 8.2). Все инокулированные и подвергшиеся 7-ми дневному воздействию ГбЗ растения к концу вегетации имели более высокую длину надземной части, которая даже превышала длину контрольных растений. Бактериальная обработка ускорила восстановление растений обоих сортов. Также было отмечено, что 10-4 наиболее выраженно ускорил восстановление Экада70, в то время как 26Д – Салават

Юлаев. Полученные результаты указывают на способность эндофитов модифицировать архитектуру корневой системы растений, в частности, увеличивать длину корней (рис. 8.1), а также регулировать процессы формирования более тесного их взаимодействия с почвой, вероятно, за счет продукции ЭПС (см. главу 9). Данные изменения играют важную роль в обеспечении растений водой и элементами минерального питания.

Следует отметить, что обработка только гербицидом в нормальных условиях не оказывала ингибирующего действия на рост растений и не вызывала явных изменений в их фенотипе растений, за исключением незначительного пожелтения старых листьев. Очевидно, это связано с тем, что гербицид Sekator Turbo® содержит антидот мефенпирдиэтил, предназначенный для смягчения фитотоксического действия йодомульфуронметил натрия и амидромилфулона на растения. Сообщалось, что мефенпирдиэтил усиливает активность ферментов, способствующих разложению, и ускоряет распад активных веществ гербицида в тканях растений. О способности пшеницы переносить воздействие некоторых селективных гербицидов также сообщалось ранее (Todorova et al., 2021), что нашло отражение в отсутствии их ингибирующего действия на рост растений, что согласуется с нашими выводами. В то же время рост (надземная часть) растений, обработанных бактериями (10-4, 26Д) и опрысканных гербицидом в нормальных условиях, превысил показатели роста растений, обработанных только гербицидом.

8.2. Влияние инокуляции *B. subtilis* на содержание фотосинтетических пигментов хлорофиллов и площадь листьев растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при комбинированном стрессе и в пост-стрессовый период

Как уже упоминалось ранее, одним из основных процессов первичного метаболизма растений, непосредственно связанных с их продуктивностью, является фотосинтез (Ahmad et al., 2018; Todorova et al., 2022). Аналогично данным, полученным на проростках в ранние стадии развития (прорастание–всходы) в условиях ПЭГ-индуцированного водного дефицита (глава 4.1), воздействие комбинированного стресса (ГбЗ) в период кущения значительно снижало содержание хлорофиллов (рис. 8.4).



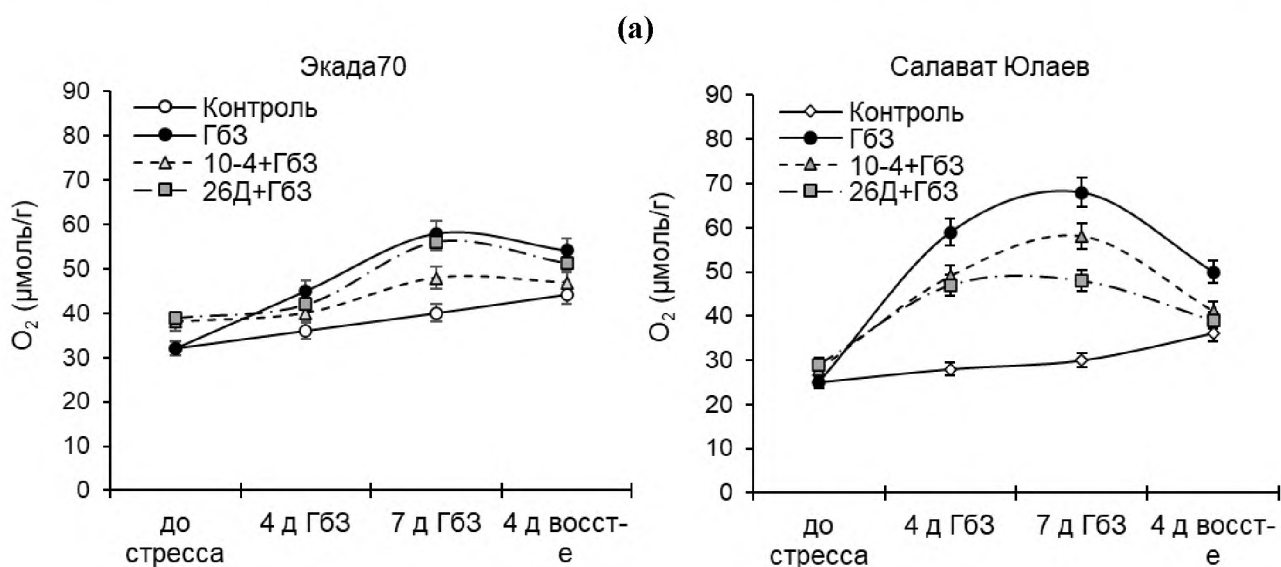
Как видно из рисунка 8.4, инокуляция препятствовала стресс-индуцированной деградации хлорофиллов и приводила к более быстрому восстановлению их содержания до уровня контрольных нестрессированных растений после возобновлении полива (репарация). Площадь листьев изменялась сходным образом. Результаты свидетельствуют о долговременной эффективности инокуляции *B. subtilis* (10-4, 26Д) в защите фотосинтетического аппарата пшеницы обоих сортов от повреждающего воздействия ГБЗ. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей (Bourahla et al., 2018; Chetverikov et al., 2021). К примеру, Chetverikov et al. (2021) показали, что *P. vellanae* 6CH2 увеличивал общее количество хлорофилла (Хл) (в 1,19–1,26 раза) в растениях пшеницы на фоне гербицидного стресса. Такой эффект может быть связан с более высокой доступностью и усвоением питательных веществ из ризосферы, модуляцией фитогормонов и поддержанием роста растений в стрессовых условиях (Benedetto et al., 2017; Shahid et al., 2018). Bourahla et al. (2018) установили способность штамма *P. putida* улучшать некоторые физико-биохимические параметры (Хл, Кар, МДА, ферментативную активность) и снижать вызванный гербицидом окислительный стресс у пшеницы. В других исследованиях устойчивый к гербициду и Р-солюбилизирующий штамм *Burkholderia cepacia* PSBB1 снижал токсичность глифосата, увеличивал размер, сухое вещество, способность к образованию клубеньков, содержание питательных веществ в семенах нута, а также снижал уровни пролина и МДА (Shahid et al., 2018).

8.3. Анализ окислительного и осмотического статуса инокулированных эндофитными *B. subtilis* растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями при комбинированном стрессе и в пост-стрессовый период

Стрессы окружающей среды приводят к перепроизводству АФК, которые в высоких концентрациях могут вызывать окислительные повреждения, нарушать липидные функции мембран, инактивировать ферменты и препятствовать метаболической активности (Hasanuzzaman et al., 2020). В результате окислительного стресса в клетках накапливается большое количество денатурированных белков, продуктов ПОЛ, которые могут быть не только

первичными медиаторами стрессового воздействия, но и индукторами соответствующих защитных механизмов в клетках растений. Таким образом, о развитии защитных реакций растений можно судить по степени накопления конечного продукта ПОЛ – МДА (Hasanuzzaman et al., 2020). Во многих исследованиях на растениях, испытывающих стресс, содержание МДА заметно снижалось благодаря обработке PGP-бактериями (Puthiyottil et al., 2021; Rashid et al., 2021), в том числе и в наших исследованиях (Lastochkina et al., 2017; 2020). Полученные данные указывают на то, что PGP-бактерии изменяют скорость метаболизма, активируя мощную систему поглощения АФК у растений, находящихся в стрессовом состоянии. Они могут ускорить восстановление стабильности мембран и защитить от фотоповреждений при повторном поливе растений, обработанных бактериями (Puthiyottil et al., 2021).

Влияние эндофитов и ГбЗ на уровень окислительного стресса растений пшеницы. Результаты показали, что воздействие ГбЗ приводило к существенной (в разной степени) генерации АФК (O_2^- , H_2O_2) (рис. 8.5а,б) и накоплению МДА в растениях обоих сортов (рис. 8.5в), свидетельствуя об интенсивном развитии в них окислительных повреждений и уменьшении их сопротивляемости к действию стрессоров с большей амплитудой колебаний у сорта Салават Юлаев, что согласуется с предыдущими данными (Batoool et al., 2020), и, очевидно, связано с их более высокой чувствительностью к обезвоживанию (по сравнению с Экада70).



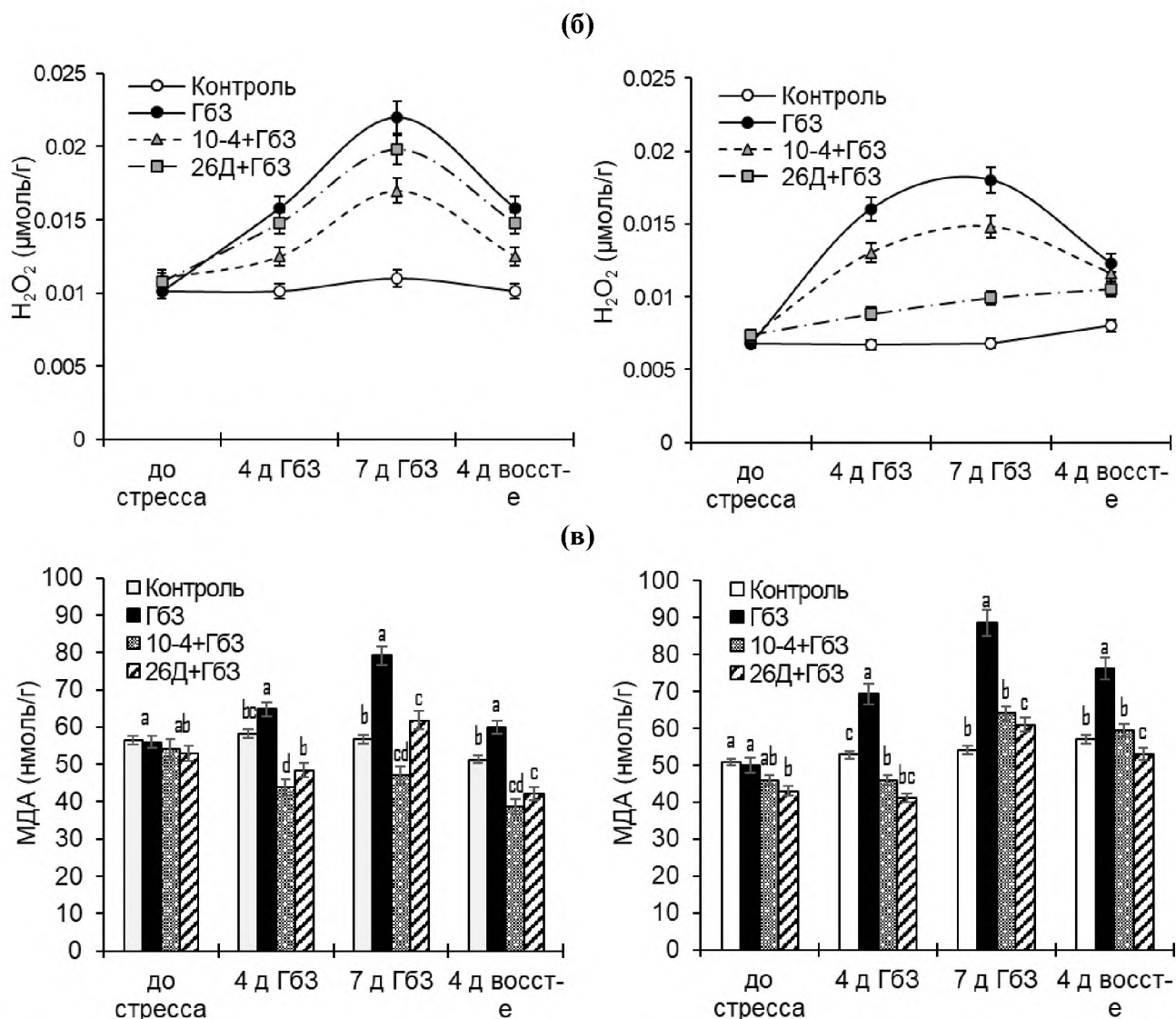


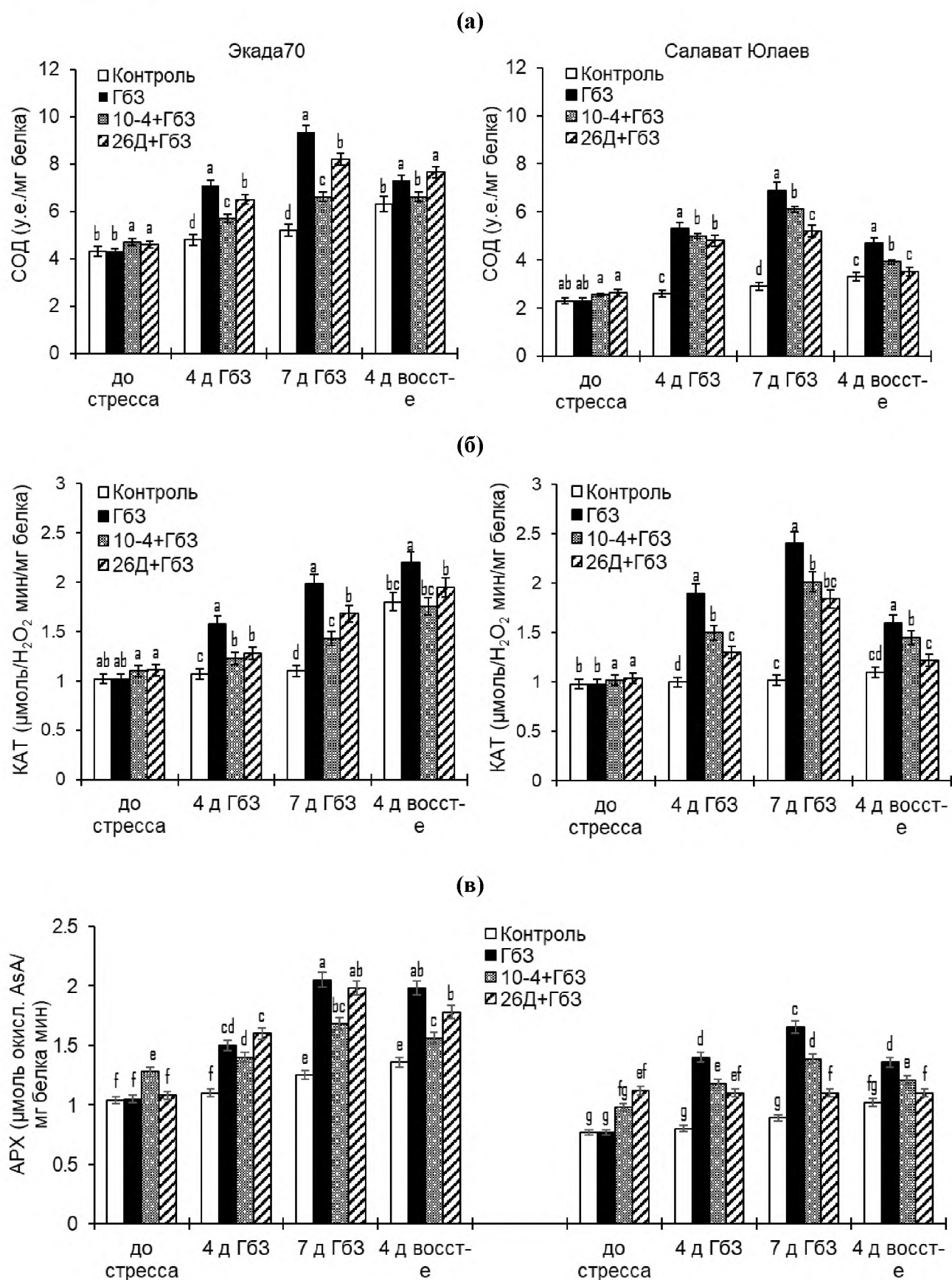
Рис. 8.5. Влияние инокуляции семян *B. subtilis* 10-4 и 26Д на содержание биомаркеров стресса супероксид анион радикала (O_2^-), пероксида водорода (H_2O_2) и уровень перекисного окисления липидов (МДА) у растений пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев при комбинированном воздействии гербицида и засухи (Г63), а также в пост-стрессовый период (4-дневное восстановление)

Воздействие засухи в течение 7 дней на опрысканные Гб растения увеличивало содержание в них МДА в 1,5 (Экада70) и 2 раза (Салават Юлаев) (рис. 8.5в). Выявлено, что после возобновления полива содержание МДА в растениях сорта Экада70 снижалось быстрее, чем в растениях сорта Салават Юлаев, демонстрируя их лучшую способность к восстановлению в пост-стрессовый период. Инокуляция эндофитами заметно снижала индуцированную Гб3 генерацию O_2^- (рис. 8.5а), H_2O_2 (рис. 8.5б) и МДА (рис. 8.5в) во время 4- и 7-дневного воздействия комбинированного стресса в растениях обоих сортов (с наиболее выраженным эффектом для Экада70), что свидетельствует о защищенности

инокулированных растений от окислительных повреждений. Через 4 дня после возобновления полива уровень МДА снижался до контрольных значений быстрее в инокулированных растениях, особенно у сорта Экада70 (рис. 8.5в), свидетельствуя об усилении их адаптационного потенциала и ускоренной стабилизации редокс-статуса под влиянием эндофитов. Это согласуется с данными литературы о подавлении PGP-бактериями выработки АФК и предотвращении повреждения клеточных мембран при стрессе (Batool et al., 2020). Следует заметить, что сама инокуляция эндофитами не оказала отрицательного влияния на состояние клеточных мембран растений. В нормальных условиях (до воздействия стрессов) инокулированные растения обоих сортов пшеницы характеризовались хоть и несущественным, но сниженным (по сравнению с контролем) уровнем концентрации ТБК-реагирующих продуктов (МДА) (рис. 8.5в). Эти результаты согласуются с данными Garipova et al. (2022) и подтверждают роль МДА как маркера эффективности симбиоза эндофитов с растением-хозяином, что положительно сказывается на продуктивности.

Влияние эндофитов на активность антиоксидантных ферментов в растениях пшеницы при ГБЗ. Важный вклад в адаптацию растений к стрессовым факторам различной природы вносят антиоксидантные ферменты, препятствующие развитию окислительного стресса. Из рисунка 8.6 (а,б), видно, что инокуляция эндофитами снижала уровень индуцированной ГБЗ активности СОД и КАТ у растений обоих сортов. В до стрессовый период наблюдалось небольшое повышение активности этих ферментов. Обнаружено, что штамм 10-4 значительно увеличивал активность APX и GR в растениях сорта Экада70 (рис. 8.6в,г); такая же тенденция наблюдалась для растений сорта Салават Юлаев под действием штамма 26Д. Интересно, что предпосевная обработка штаммами 26Д и 10-4 по-разному влияла на активность ферментов при ГБЗ. Так, инокуляция 10-4 значительно снижала стресс-индуцированную активацию APX (рис. 8.6в) и дополнительно активировала GR на 7-е сутки воздействия ГБЗ у растений сорта Экада70 (рис. 8.6в). После 4-дневной репарации активность APX была ниже варианта эксперимента 26Д, а GR была на уровне контроля (рис. 8.6в,г). Аналогичная картина наблюдалась у инокулированных 26Д растений сорта Салават Юлаев в условиях ГБЗ, свидетельствуя о реализации протекторного эффекта через оптимизацию АОС

ответа: предотвращение гиперактивации АРХ при поддержании восстановительного потенциала GR.



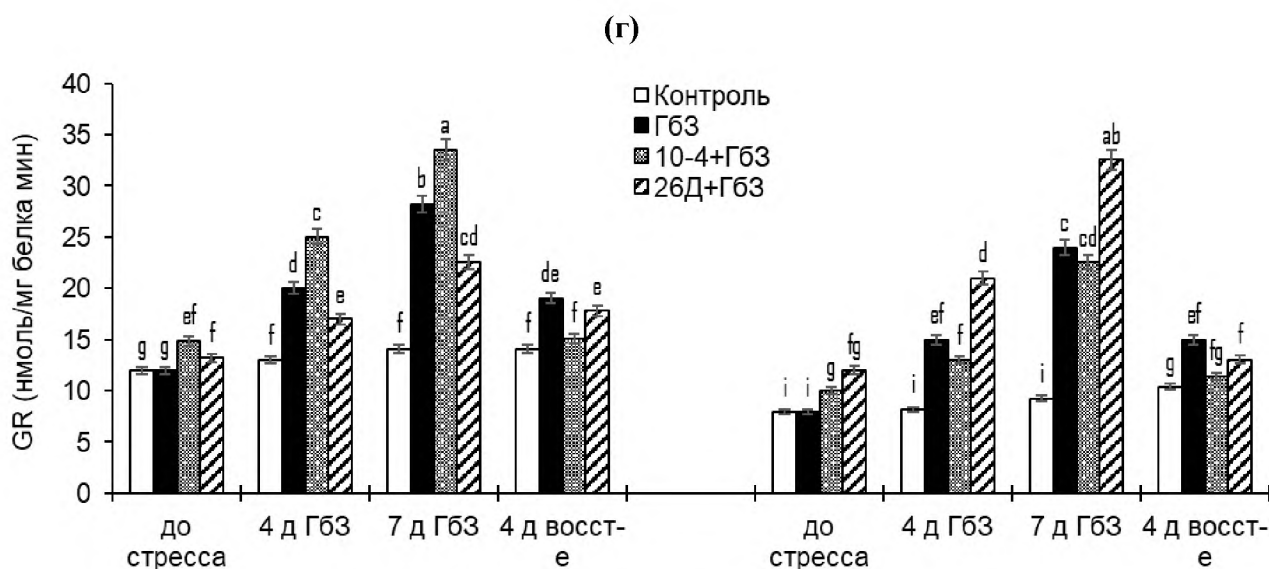
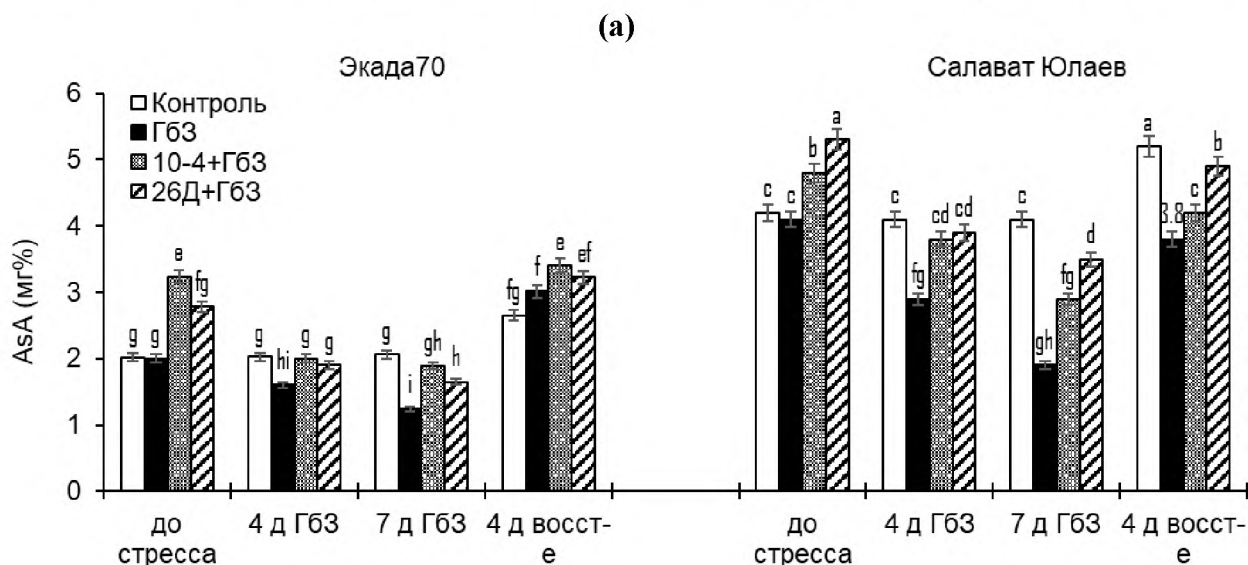


Рис. 8.6. Влияние инокуляции семян *B. subtilis* (штаммы 10-4 и 26Д) на активность супероксиддисмутазы (СОД) (а), каталазы (КАТ) (б), аскорбатпероксидазы (АРХ) (в) и глутатион редуктазы (GR) (г) у растений пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев в условиях комбинированного воздействия гербицида и почвенной засухи (ГбЗ) и в пост-стрессовый период (репарация)

Влияние эндофитов и ГбЗ на неферментативные антиоксиданты растений пшеницы. Оценка ключевых антиоксидантов AsA-GSH комплекса выявила, что инокуляция *B. subtilis* 10-4 и 26Д значительно увеличивала накопление AsA и GSH в растениях пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев, соответственно (рис. 8.7а,б). Последующее воздействие ГбЗ значительно истощало пул антиоксидантов, что было особенно выражено у растений сорта Салават Юлаев. Для растений сорта Салават Юлаев инокуляция 26Д приводила к их значительно меньшему истощению при стрессе, а в период восстановления содержание GSH достигало контрольного уровня (рис. 8.7б).



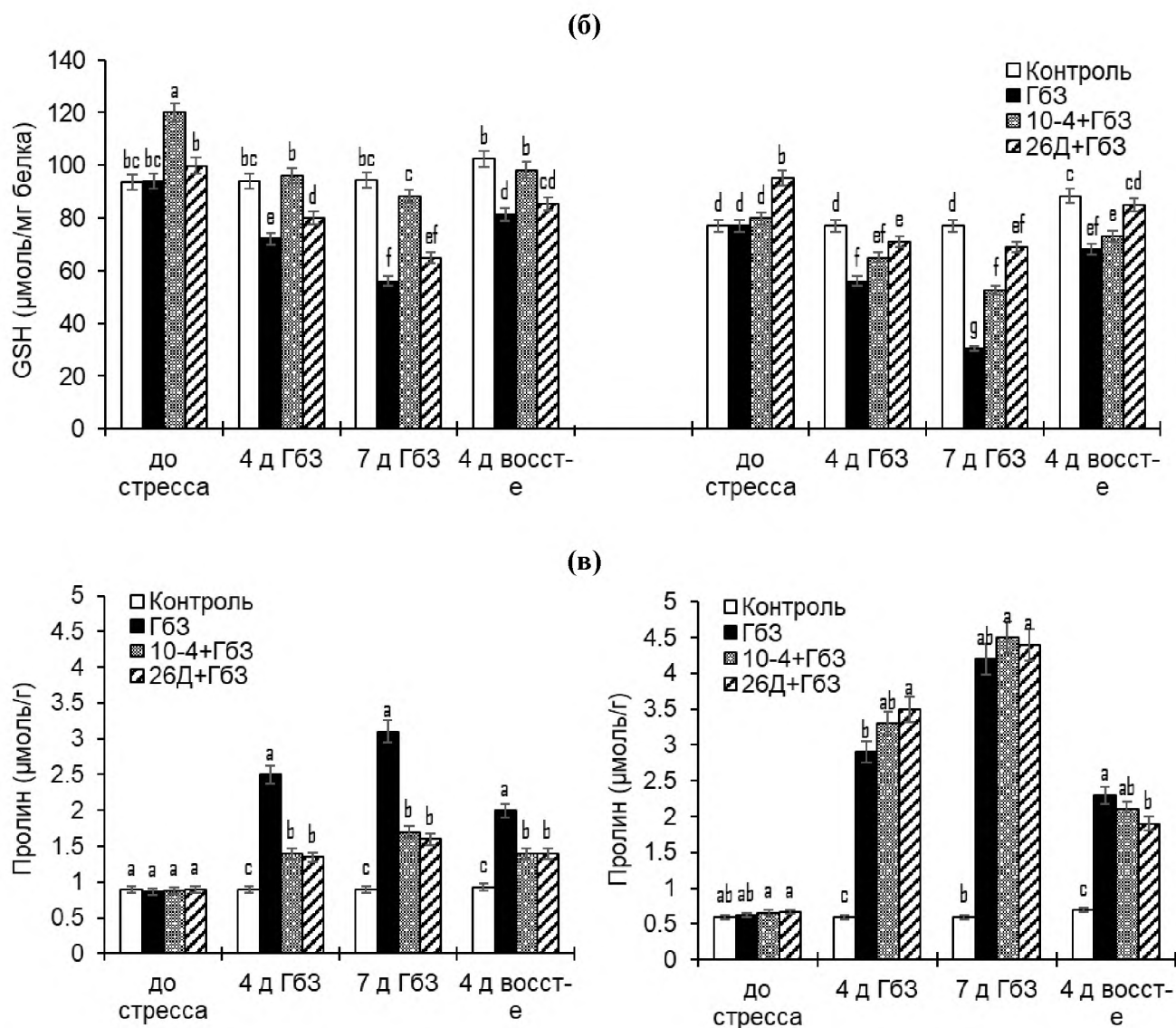


Рис. 8.7. Влияние предпосевной инокуляции семян *B. subtilis* 10-4 и 26Д на содержание аскорбата (AsA) (а), глутатиона (GSH) (б) и концентрацию пролина (в) в растениях пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев в условиях совместного воздействия гербицида и засухи (Гб3), а также в пост-стрессовый период (репарация)

Для растений сорта Экада70 инокуляция штаммом 10-4 более эффективно регулировала содержание AsA и GSH в стрессовый и пост-стрессовый периоды, при этом содержание GSH было выше на 130%, а содержание AsA практически достигало значений контроля (рис. 8.7а). Следовательно, оба штамма *B. subtilis* обеспечивали повышение устойчивости растений к комбинированному стрессу (Гб3) по-разному модулируя антиоксидантные компоненты AsA-GSH системы защиты.

Важным биохимическим маркером формирования устойчивости растений может быть накопление аминокислоты пролина – многофункционального стрессового

метаболита растений, действующего как антиоксидант, осмолит и низкомолекулярный шаперон, участвующий в поддержании нативной структуры ферментов (Hasanuzzaman et al., 2020). Содержание пролина увеличивается в растениях при стрессе (Rare, 1990; Mansour, 2000) и играет важную роль в их росте и жизненном цикле, регулируя гены циклина, общий синтез белка (Kavi et al., 2015), а также координируя биосинтез лигнина (Guan et al., 2019). Проллин может играть роль резервуара органического азота, который может потребляться в период восстановления, чтобы помочь растениям противостоять неблагоприятным факторам среды (Rare, 1990; Mansour, 2000). В литературе имеются противоречивые данные о влиянии PGP-бактерий на осмолиты разных растений и при различных стрессах. Например, инокуляция штаммом *B. cereus* В STYS 1_42 увеличивала содержание пролина в растениях в нормальных условиях, снижала при стрессе и оказывала защитное действие на рост (Rashid et al., 2021). Сообщалось, что инокуляция растений PGP-бактериями может повышать содержание пролина в растениях в условиях засухи, тем самым увеличивая рост, накопление биомассы и водный потенциал листьев во время стресса (Vardharajula et al., 2011). Неоднозначный характер взаимосвязи между содержанием пролина и стрессоустойчивостью растений может быть обусловлен различной силой стрессовых воздействий в разных экспериментах и сложным взаимодействием пролина с другими стресс-протекторными системами, в частности, с ферментативной антиоксидантной.

В наших экспериментах различалась степень участия пролина в формировании устойчивости изучаемых сортов пшеницы под влиянием комбинации ГбЗ и бактериальной инокуляции (рис. 8.7в). Воздействие ГбЗ в течение 4 и 7 дней приводило к постепенному увеличению (до 2–4 раз) концентрации пролина в растениях пшеницы обоих сортов с наиболее выраженным эффектом для сорта Салават Юлаев после 7 дней стресса (рис. 8.7в).

Выявлено, что эндофиты также снижали (в 1,5–1,7 раза) стресс-индуцированное накопление осмопротектора и неферментативного антиоксиданта пролина в растениях сорта Экада70; в то время как для растений сорта Салават Юлаев приводили к дополнительному его увеличению (примерно в 1,1 раза) в течение 7 дней воздействия стресса (рис. 8.7в). По всей видимости, дополнительное накопление пролина в

инокулированных растениях сорта Салават Юлаев может способствовать стабилизации антиоксидантной системы и нейтрализации АФК при комбинированном стрессе. Выявленные различные реакции двух изученных сортов пшеницы на инокуляцию штаммами 10-4 и 26Д показали, что пролин, скорее всего, участвует в реализации генетически запрограммированной устойчивости растений сорта Салават Юлаев к возможному нарушению водного режима, и, в меньшей степени способствует стратегии развития растений сорта Экада70. После возобновлении полива (4 дня репарации) у инокулированных растений обоих сортов наблюдалось значительное снижение уровня пролина, вызванного стрессом, но наиболее выраженный эффект наблюдался у сорта Экада70 (рис. 8.7в). Эти данные свидетельствуют об усилении адаптационной способности растений и более быстрой их репарации в пост-стрессовый период при инокуляции семян эндофитными бактериями *B. subtilis* (10-4 и 26Д). Результаты исследования демонстрируют, что осмотическая регуляция, индуцируемая эндофитами, представляет собой важный клеточный механизм, способствующий повышению устойчивости растений к повреждающему воздействию почвенной засухи и гербицидного прессинга.

8.4. Вовлечение эндогенной ГАМК в процессы *B. subtilis*-опосредованной адаптации пшеницы с разными адаптивными стратегиями в условиях ГБЗ

Адаптация растений к нестабильной среде обитания зависит от их способности «ощущать» окружающую среду, а также генерировать и передавать соответствующие сигналы в различные части растения, чтобы вызвать изменения, необходимые для оптимизации роста и обороны. Растения, как и животные, содержат огромный набор внутриклеточных и межклеточных сигналов, включая органические и неорганические молекулы (Fromm, 2020). Появление сигнальных молекул, подобных нейротрансмиттерам, у растений было интригующей областью исследований. Среди них ГАМК была обнаружена в растениях более полувека назад, и исследования ее роли в качестве основного метаболита были хорошо задокументированы, особенно в контексте стрессовых реакций. Напротив, доказательства потенциального механизма, с помощью которого ГАМК действует как сигнальная молекула у растений, появились только недавно (Ramesh et al., 2016; Seifikalhor et al., 2019; Fromm, 2020). Несколько лет назад

был выявлен механизм, с помощью которого это может происходить – растительный «рецептор ГАМК», который ингибирует прохождение аниона через семейство белков, активируемых алюминием малатных транспортеров (ALMTs) (Ramesh et al., 2016). Показано, что ГАМК накапливается в растениях при различных биотических и абиотических стрессах, что сопровождается повышением устойчивости растений (Seifikalhor et al., 2019). Быстрое накопление ГАМК в тканях растений, подверженных стрессам, способствует повышению их устойчивости, обеспечивая критическую связь в цепи событий, ведущих от восприятия стрессов окружающей среды к своевременным физиологическим реакциям (Kinnersle, Turano, 2000). Недавно Razic с соавторами (2020) показали, что экзогенное применение ГАМК заметно уменьшало стресс, вызванный засухой и жарой, о чем свидетельствовали значительно более высокие уровни пролина, растворимых сахаров и общего содержания белка. Кроме того, была выявлена прямая взаимосвязь между активностью антиоксидантных ферментов (СОД, GR, монодегидроаскорбатпероксидазой, APX) и экспрессией генов (белков теплового шока, дегидринов, осмотинов, аквапоринов, протеинов эмбриогенеза листьев) при засухе и тепловом стрессе. Предположено, что вызванная ГАМК засухо- и жароустойчивость растений подсолнечника может включать улучшение метаболизма осмолитов, экспрессии генов и активности антиоксидантных ферментов, а также повышение уровня эндогенной ГАМК, которая, в свою очередь, обеспечивает поддержание гомеостаза время длительной засухи и теплового стресса (Razic et al., 2020). Имеются лишь единичные сведения об участии ГАМК в становлении микробно-растительных взаимодействий. К примеру, было обнаружено, что ГАМК синтезируется внутри клубеньков бобовых (Vance, Heichel 1991; Sulieman, Schulze 2010a,b) и участвует в становлении симбиоза между бактериями и растением. В условиях дефицита влаги под влиянием обработки эндофитной бактерией *B. subtilis* B26 в побегах и корнях тимофеевки увеличивалось накопление ГАМК и повышалась засухоустойчивость растений (Gagné-Bourque et al., 2016). В другом исследовании, выявленная способность *B. velezensis* 5113 модулировать уровни ГАМК в нестрессированных листьях пшеницы позволила предположить, что применение *B. velezensis* 5113 способно опосредовать устойчивость к засухе посредством инокуляции аналогично тому, как это достигается

путем экзогенного применения ГАМК (Abd El-Daim et al., 2019). Несмотря на этот прорыв, роль ГАМК как сигнальной молекулы у растений еще предстоит установить, и некоторые аспекты сложной сигнальной системы ГАМК остаются неясными. Вероятно, *Bacillus*-индуцированное накопление ГАМК в тканях растений, подверженных стрессам, способствует повышению их устойчивости, обеспечивая критическую связь в цепи событий, ведущих от восприятия стрессов к своевременным физиологическим реакциям, что свидетельствует в пользу важной роли этого метаболита в MIST пшеницы к засухе, что безусловно заслуживает пристального внимания и детальных исследований. В частности, вызывает интерес изучение влияния бактерий-эндофитов *B. subtilis* на накопление эндогенной ГАМК в различающихся по стратегиям адаптации и контрастных по засухоустойчивости растениях пшеницы, произрастающих как в норме, так и в условиях воздействия стрессов и их комбинаций (включая засуху и гербициды).

В связи с этим далее нами впервые в мире с помощью метода ВЭЖХ было исследовано влияние *B. subtilis* (10-4, 26Д) на содержание эндогенной ГАМК в растениях пшеницы с разными адаптивными стратегиями, произрастающих в нормальных условиях, при ГбЗ и в пост-стрессовый период. Обнаружено, что в нормальных условиях произрастания природное содержание эндогенной ГАМК хоть и незначительно, но различалось в зависимости от генотипа пшеницы (с большими значениями для сорта Экада70) и с течением времени наблюдалась тенденция к постепенному накоплению ГАМК (хоть и незначительному) для обоих сортов (рис.8.8а,б). Так, содержание ГАМК в листьях 16 сут и 31 сут растений сорта Салават Юлаев составляло 3,7 мг/г и 4,7 мг/г сырой массы, соответственно (рис.8.8б); тогда как для сорта Экада70 – 4,2 мг/г и 5,2 мг/г, соответственно (рис. 8.8а). Это согласуется с имеющимися в настоящее время в литературе единичными сообщениями о том, что устойчивые к стрессам сорта растений могут характеризоваться более высоким содержанием ГАМК, в сравнении с неустойчивыми (Hasan et al., 2021).

В нормальных условиях произрастания инокулированные *B. subtilis* (10-4, 26Д) растения обоих генотипов пшеницы характеризовались незначительным, но повышенным (относительно контрольных вариантов) содержанием ГАМК (рис. 8.8).

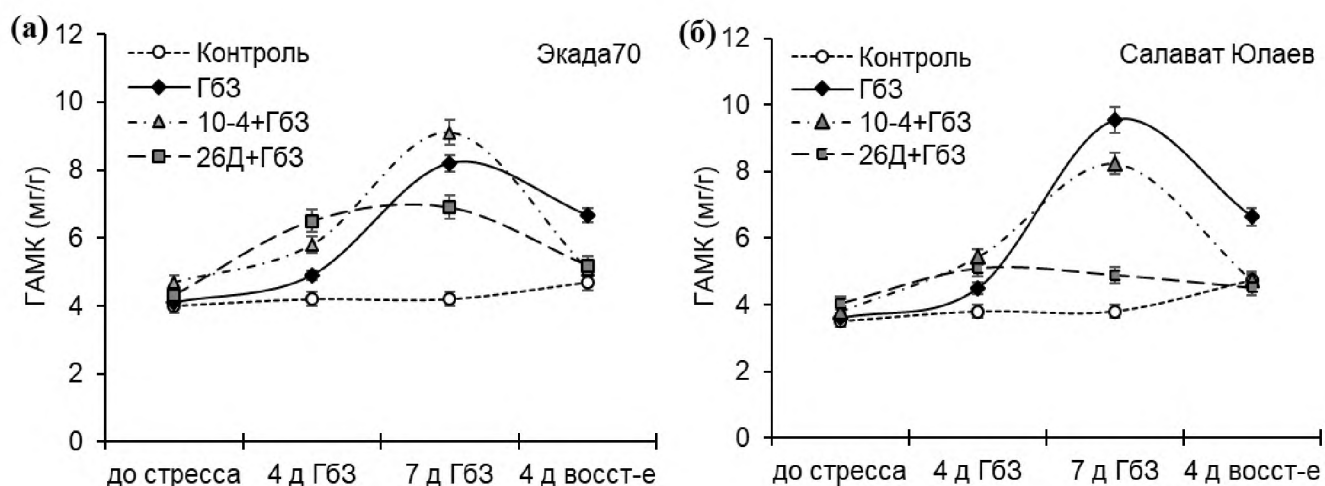


Рис. 8.8. Влияние инокуляции эндофитными *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на содержание эндогенной ГАМК в растениях пшеницы сорта Экада70 (а) и Салават Юлаев (б) в норме (16-сут растения, до стресса) в условиях комбинированного воздействия Гб3 в течение 4-х и 7-ми дней (21-сут и 24-сут растения)) и после 4 суток репарации (32-сут растения)

Воздействие Гб3 увеличивало содержание ГАМК на 4 и 7 сутки стресса на 114–182% у растений сорта Экада70 (рис. 8.8а) и 105–158% у растений сорта Салават Юлаев (рис. 8.8б) с последующим снижением в период восстановления (репарации) до уровня 120–136% (относительно контроля). Выявленное раннее накопление ГАМК при Гб3 у растений сорта Экада70 (чем у растений сорта Салават Юлаев) может свидетельствовать, как о большей устойчивости этого генотипа, так и в пользу роли ГАМК как сигнальной молекулы, позволяющей этим растениям быстро переключаться с нормы на стресс и запускать цепь реакций, ведущих к формированию их системной устойчивости; то есть быстрее адаптироваться к возникшим стрессовым ситуациям по сравнению с чувствительным к обезвоживанию сортом Салават Юлаев, где накопление ГАМК происходило медленнее и ее уровень был ниже в сравнении с растениями сорта Экада70.

Обнаружено, что инокуляция эндофитами 10-4 и 26Д на обоих генотипах пшеницы на 4 день воздействия стресса способствовала более раннему (в сравнении с неинокулированными вариантами) накоплению ГАМК (с более высокими значениями для сорта Экада70) (рис. 8.8), и очевидно, тем самым способствуя более быстрой стресс-адаптации этих растений и формированию их устойчивости на уровне клеток и целого организма. Об этом также свидетельствуют данные о том, что в пост-стрессовый период

(через 4 дня после возобновления полива) содержание ГАМК в бактеризованных и подвергнутых стрессу растениях обоих генотипов снижалось практически до уровня контрольных вариантов, тогда как у небактеризованных растений хоть и наблюдалось снижение, но уровень все еще был повышенным относительно контроля (на 120–136%). Вместе с тем, примечательно что на 7-е сутки воздействия Гб3 штамм 10-4 приводил к дополнительному накоплению ГАМК в растениях сорта Экада70 (рис. 8.8а), тогда как растений у сорта Салават Юлаев обработка обоими штаммами снижала стресс-индуцированное накопления ГАМК (рис. 8.8б). Вероятно, это может быть связано с вовлечением ГАМК, помимо сигнальной функции, в поддержание осмотического и окислительного статуса растений, в частности, через координацию накопления осмолитов (пролин) (рис. 8.7в) (Kolupaev et al., 2023) и регуляцию работы устьиц (рис. 6.4) (Mekonnen et al., 2016; Hasan et al., 2021). Результаты свидетельствуют о том, что выявленное *B. subtilis*-индуцированное накопление ГАМК является важным адаптивным механизмом повышения устойчивости растений пшеницы с разными стратегиями адаптации к абиотическим стрессам. Различия в реакции сортов указывают на участие ГАМК в реализации генетически-детерминированной стресс-устойчивости.

8.5. Анализ влияния предпосевной инокуляции эндофитными *B. subtilis* на формирование элементов структуры урожая, биохимический состав и качество зерна пшеницы с контрастными стратегиями адаптации к обезвоживанию

Совокупным показателем физико-биохимических процессов за весь период вегетации растений является урожайность и качественные характеристики растительной продукции. Ранее сообщалось о влиянии биопрепаратов на основе PGP-бактерий на урожайность и качество зерна пшеницы при различных условиях минерального питания (Alferov et al., 2017; Chandra et al., 2019; Boleta et al., 2020) и в условиях умеренной засухи на фоне действия Гб различного химического состава (Chetverikov et al., 2022). Применение биопрепарата на основе *Pseudomonas protegens* DA1.2 увеличивало урожайность зерна пшеницы (на 17–36%) и содержание в них белка и клейковины (Chetverikov et al., 2022). Однако роль эндофитных *B. subtilis* в регуляции формирования урожая и биохимических показателей зерна пшеницы с разными адаптивными

стратегиями при засухе, включая аминокислотный состав, ранее не изучалась. В связи с далее было проведено комплексное исследование влияния эндофитов *B. subtilis* на урожайность и качество зерна у контрастных по засухоустойчивости растений пшеницы.

Результаты вегетационных экспериментов в контролируемых условиях, представленные в таблице 8.1, демонстрируют уменьшение под влиянием почвенной засухи и гербицидной обработки (ГБЗ) длины колосьев и массы 1000 зерен по сравнению с контрольными вариантами. В то же время инокуляция *B. subtilis* (10-4, 26Д) снижала (в разной степени) (от 20 до 50%) уровень негативного воздействия ГБЗ на длину колоса и массу зерен, а также увеличивала количество зерен в колосе.

Таблица 8.1 – Влияние инокуляции семян эндофитными *B. subtilis* 10-4 и 26Д на формирование элементов урожайности пшеницы в нормальных условиях произрастания и при комбинированном действии гербицида и засухи (ГБЗ) 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 ^e
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
ГБЗ	38 ± 0,9 ^e	4,1* ± 0,4 ^d	6,3 ± 0,3 ^e	15,1 ± 2,6 ^e	0,11 ± 0,06 ^f
10-4+ ГБЗ	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+ ГБЗ	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
ГБЗ	37 ± 0,7 ^e	3,4* ± 1,3 ^f	3,5 ± 0,7 ^f	14,2 ± 1,5 ^f	0,05 ± 0,03 ^e
10-4+ ГБЗ	46 ± 0,6 ^d	4,5 ± 0,9 ^e	5,6 ± 1,0 ^e	17,2 ± 0,7 ^{de}	0,10 ± 0,01 ^d
26Д+ ГБЗ	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

У растений сорта Салават Юлаев при инокуляции штаммом 26Д наблюдалось более заметное увеличение длины колоса, массы зерен в колосьях по сравнению с применением штамма 10-4, как в норме, так и при ГБЗ; в то время как у растений сорта Экада70 наилучшие показатели были отмечены при инокуляции штаммом 10-4. В вариантах, где растения подвергались комбинированному стрессу (ГБЗ) было отмечено наличие деформированных/укороченных колосьев и невыполненных

зерен при отсутствии таковых в инокулированных вариантах. Кроме того, формирование колосьев и наступление физиологической спелости зерен происходило в среднем на 4–5 дней раньше у инокулированных эндофитами растений обоих генотипов.

В полевых исследованиях выявлена аналогичная тенденция с максимальной прибавкой продуктивности для растений сорта Экада70. Предпосевная инокуляция приводила к существенному увеличению количества семян с колоса и массы 1000 семян. Оба эти параметра структуры урожая неизбежно привели к увеличению продуктивности пшеницы (рис. 8.9).

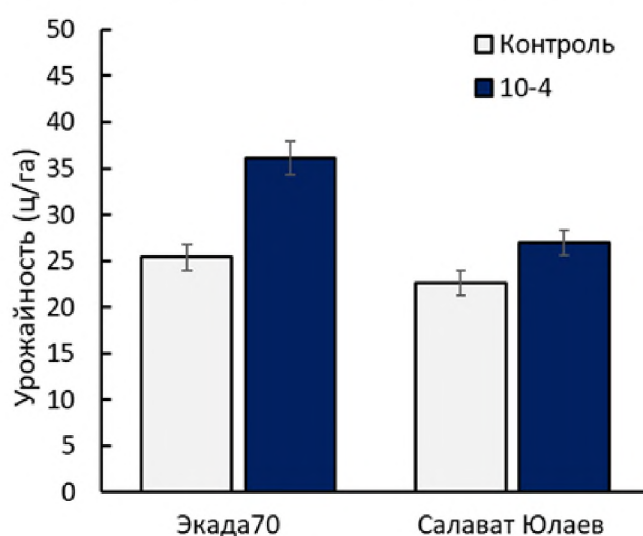


Рис. 8.9. Влияние предпосевной инокуляции эндофитом *B. subtilis* 10-4 на урожайность зерна яровой мягкой пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев (2022 г., полевые опыты)

Вероятно, немалый вклад в такое повышение урожайности зерна внесло повышение устойчивости растений к неблагоприятным климатическим факторам среды и различным возбудителям болезней в период вегетации. С другой стороны, полученные нами данные о предотвращении эндофитом резких изменений при стрессе баланса фитогормонов (накопление АБК, снижение уровня ИУК и ЦК) (глава 5), поддержание фотосинтетической активности (глава 6) и редокс-статуса (глава 7), дают основание к заключению, что исследуемые эндофитные бактерии *B. subtilis* способствуют стабилизации метаболических процессов в клетках, защищая их от флуктуаций природных явлений, неизбежно влияющих на жизнь растений в естественных (полевых) условиях произрастания.

Далее нами была проведена оценка влияния предпосевной инокуляции *B. subtilis* 10-4 на показатели качества зерна пшеницы (содержание клейковины,

качество клейковины (ИДК, индекс деформации клейковины), стекловидность, число падения, содержание белка, влажность, аминокислотный состав). Как видно из таблицы 8.3 инокуляция эндофитами не оказала существенного влияния на влажность и стекловидность, тогда как снижала показатели ИДК и числа падения, что свидетельствует об улучшении качества зерна. Известно, что чем ниже показатель ИДК, тем лучше свойства клейковины (она прочнее и лучше тянется). При этом, принадлежность зерна пшеницы сорта Салават Юлаев по этому показателю (ИДК) повысилась с 3 группы до 2 группы. Вместе с тем, обращает на себя внимание повышение содержания клейковины в урожае зерна, полученного из инокулированных растений сорта Салават Юлаев, при отсутствии значимых изменений в варианте с растениями сорта Экада70 (табл. 8.3). Выявленное снижение числа падения (без изменения классности), отображающего активность фермента альфа-амилазы, может служить свидетельством улучшения хлебопекарных качеств зерна; т.к. слишком высокие значения числа падения (более 400 с) могут негативно влиять на качество хлеба (тесто поднимается с трудом, снижается объемный выход хлебобулочных изделий, поверхность хлеба бледная). Для хлебопечения оптимальным считается число падения 250–350 с (Соколова, Карташов, 2012).

Таблица 8.3 - Влияние предпосевной инокуляции клетками *B. subtilis* 10-4 на параметры качества зерна у контрастных по стратегии адаптации к засухе растений пшеницы (сорт Экада70 – устойчивый, сорт Салават Юлаев – чувствительный) (полевые опыты, 2022 г.)

Вариант	Белок (%)	Влажность (%)	Клейковина (%)	ИДК (ед.)	Стекловидность (%)	Число падения (с)
Экада70						
Контроль	15,1 ^a	9,0 ^a	29,7 ^a (2 класс)	101,8 ^a (2 группа)	55,3 ^a (3 класс)	448,7 ^a (1 класс)
10-4	15,7 ^a	9,1 ^a	29,5 ^a (2 класс)	92,3^b (2 группа)	54,9 ^{ab} (3 класс)	429,5^b (1 класс)
Салават Юлаев						
Контроль	15,2 ^a	8,7 ^a	31,7 ^a (2 класс)	113,1 ^a (3 группа)	49,5 ^a	480,3 ^a (1 класс)
10-4	15,5 ^a	8,6 ^a	35,7^b (1 класс)	98,6^b (2 группа)	49,2 ^a	406,9^b (1 класс)

Следует отметить, что к моменту начала наших исследований в литературе имелась весьма ограниченная фрагментарная и противоречивая информация о влиянии RGP-бактерий на показатели качества продукции. К примеру, в

исследованиях на пшенице сорта Краснодарская99 при обработке *B. subtilis* QST713 было отмечено увеличение содержания крахмала на 18% и снижение липидов на 12% (Timmusk et al., 2017). В другом эксперименте с использованием штамма *B. subtilis* GB03 содержание углеводов возрастало на 22%, жиры уменьшались на 9% (Zhang et al., 2020). По результатам наших исследований инокуляция *B. subtilis* 10-4 приводила к двукратному увеличению содержания углеводов в зерне обоих сортов пшеницы, на фоне снижения содержания сырого жира в 1,7–2,1 раза. Такое перераспределение метаболитов, по-видимому, связано с индукцией защитных программ растения бактерией, поскольку для их реализации требуется мобилизация углеводных ресурсов. Кроме того, получены приоритетные данные о качественном преобразовании аминокислотного профиля зерна обоих изученных сортов пшеницы при предпосевной инокуляции *B. subtilis* 10-4 за счет увеличения содержания ключевых аминокислот, включая лимитирующие (рис. 8.10) без изменения общего содержания белка (табл. 8.3).

Физиологическое состояние растений пшеницы в период вегетации является определяющим фактором для формирования аминокислотного состава семян. Следует отметить, что лизин, метионин и треонин относятся к числу основных лимитирующих аминокислот в зерне пшеницы, при этом в литературе имеются указания на их крайне низкое содержание или практическое отсутствие (Siddiqi et al., 2020). Полученные нами результаты (рис. 8.10) демонстрируют, что инокуляция *B. subtilis* 10-4 способствовала статистически значимому увеличению содержания незаменимых аминокислот, включая лизин, треонин, валин, лейцин, изолейцин, триптофан, фенилаланин, гистидин, а также ряд заменимых аминокислот (аргинин, тирозин, пролин, серин, аланин, глицин) в зерне обоих изученных сортов пшеницы (рис. 8.10). Данное наблюдение свидетельствует о способности эндофитных бактерий *B. subtilis* модулировать физиологический статус растений в период вегетации, что, в конечном итоге, приводит к улучшению качественного состава аминокислот в зерне. Выявленное повышение накопления аминокислот в вариантах с предпосевной инокуляцией семян может быть объяснено комплексом факторов, включая способность бактерий к азотфиксации (табл. 3.2), повышению

доступности и усвояемости макро- и микроэлементов из почвенной ризосферы, а также прямое или опосредованное вовлечение бактерий в метаболизм аминокислот в растении-хозяине. Ключевым фактором, вероятно, является потенциальная способность штамма *B. subtilis* 10-4 к синтезу аминокислот, что, как будет показано в следующей главе, подтверждается наличием в его геноме множества генов, ассоциированных с биосинтетическими путями метаболизма аминокислот (см. главу 9, раздел 9.2).

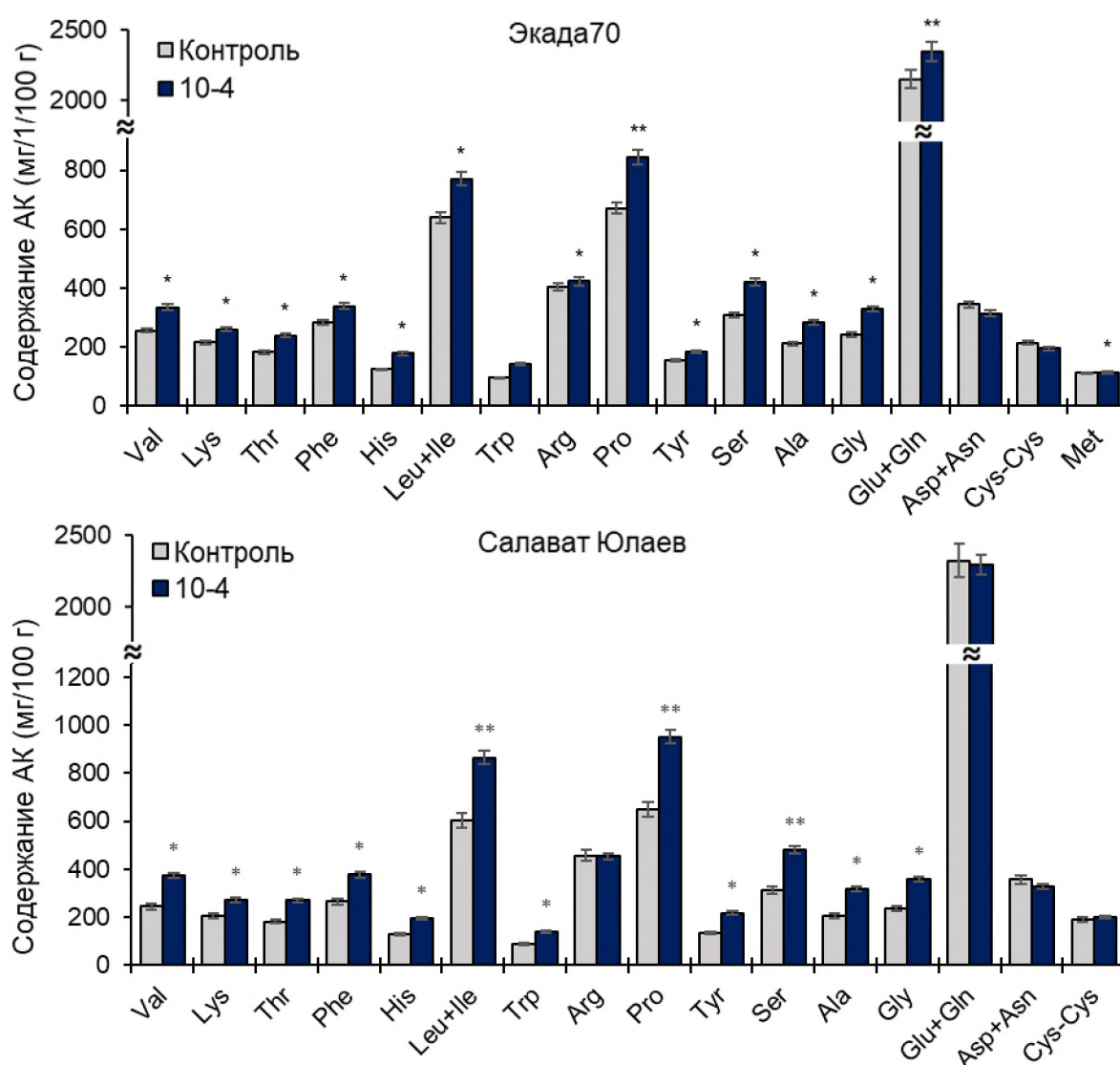


Рис. 8.10. Влияние предпосевной инокуляции клетками *B. subtilis* 10-4 на аминокислотный профиль урожая зерна яровой мягкой пшеницы сортов Экада70 и Салават Юлаев (полевые опыты, 2022 г.). АК – аминокислоты, Arg – аргинин, Lys – лизин, Tyr – тирозин, Phe – фенилаланин, His – гистидин, Leu+Ile – лейцин+изолейцин, Met – метионин, Val – валин, Pro – пролин, Thr – треонин, Ser – серин, Ala – аланин, Gly – глицин, Glu+Gln - глутаминовая кислота+глутамин, Asp+Asn – аспарагиновая кислота+аспарагин, Cys-Cys – цистин, Trp – триптофан.

Параллельно с изменением аминокислотного профиля, нами было зафиксировано достоверное увеличение содержания некоторых ключевых макро- и микроэлементов в зерне инокулированных растений. В частности, в зерне инокулированных вариантов обоих сортов отмечено повышенное накопление азота (N) (на 20–30%), фосфора (P) (на 33–46%), калия (K) (на 47–60%), а также кальция (Ca) (31–40%) и железа (Fe) (на 8–10%) по сравнению с контрольными вариантами без инокуляции. Данное улучшение минерального состава зерна согласуется с известной способностью PGP-бактерий, в том числе представителей рода *Bacillus*, солюбилизовать фосфаты, продуцировать сидерофоры и повышать биодоступность элементов питания в ризосфере растения-хозяина. Молекулярно-генетической основой для реализации механизма увеличения макро- и микроэлементов в зерне, как будет подробно показано в следующей главе, очевидно, служит наличие в геноме штамма 10-4 консервативных генов, ассоциированных с солюбилизацией фосфатов, биосинтезом сидерофоров, азотфиксацией и др. (см. главу 9, раздел 9.2.2).

Совокупность полученных в данной главе данных демонстрирует (Рис. 8.10), что эндофитные бактерии *B. subtilis* (10-4, 26Д) после предпосевной инокуляции оказывают длительное стимулирующее рост и защитное действие на растения обоих исследуемых сортов (экотипов) (степного волжского и лесостепного западносибирского), улучшают общее физиологическое состояние растений и повышают их устойчивость к абиотическим стрессорам с ускоренным восстановлением в пост-стрессовый период. Эти изменения находят свое отражение в увеличении урожайности и перестройке биохимических показателей качества зерна, включая обогащение аминокислотного профиля (в т.ч. незаменимыми аминокислотами), минерального комплекса и улучшение ключевых характеристик (ИДК, число падения), определяющих хлебопекарный потенциал. Кроме того, полученные данные указывают на синергическое взаимодействие эндофитных PGP-бактерий *B. subtilis* с генетикой растений, усиливая врожденную адаптацию устойчивого (Экада70, СВ экотип) и компенсаторные реакции чувствительного (Салават Юлаев, ЛЗС экотип) сортов, обеспечивая основу для

оптимизации их применения для повышения урожайности и качества продукции в экологически-ориентированных технологиях возделывания пшеницы.

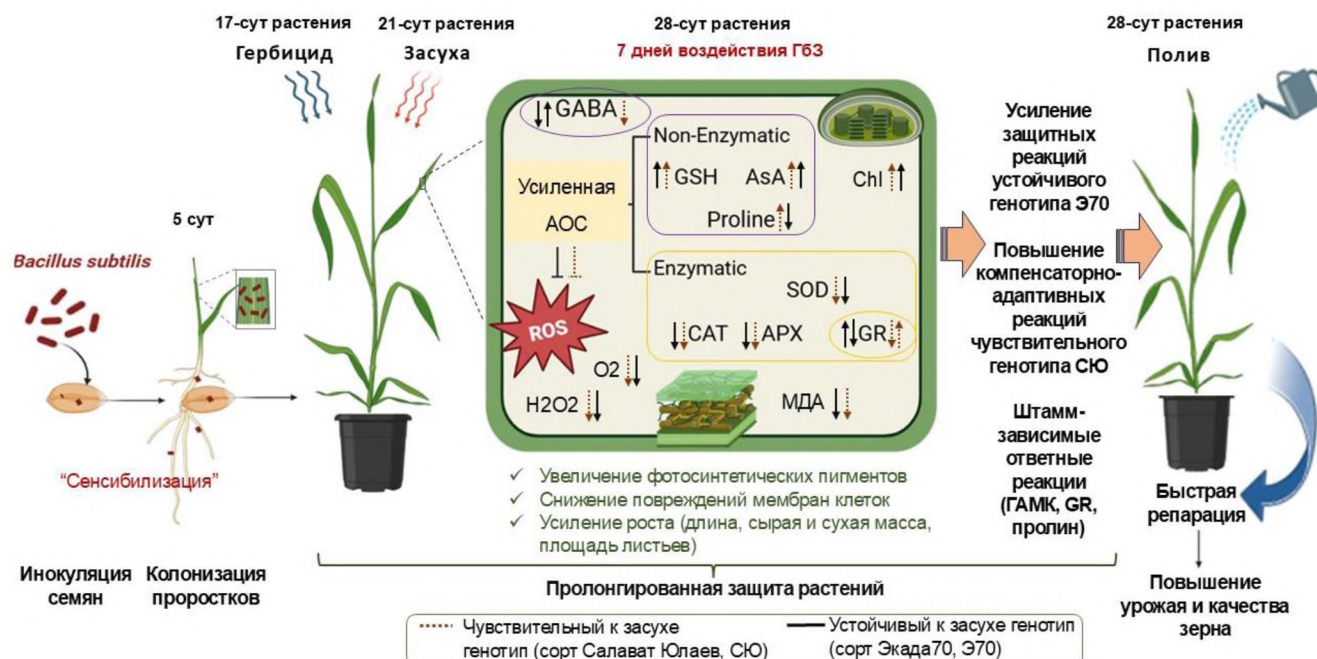


Рис. 8.10. Схематическое представление опосредованной эндофитными бактериями *B. subtilis* 10-4 и 26Д пролонгированной устойчивости растений пшеницы с разными адаптивными стратегиями в условиях комбинированного воздействия гербицидного стресса и почвенной засухи (ГбЗ) с вовлечением ГАМК и антиоксидантов в реализацию этого эффекта. AOC – антиоксидантная система, AsA – аскорбат, APX – аскорбатпероксидаза, GSH – глутатион, Non-Enzymatic – неферментативные антиоксиданты, Enzymatic – ферментативные антиоксиданты, CAT – каталаза, Chl – хлорофилл, SOD – супероксиддисмутаза, GR – глутатион редуктаза, GABA – гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), Proline – пролин, СЮ – Салават Юлаев, Э70 – Экада70

Молекулярно-генетической основой выявленных физиологических эффектов, по-видимому, является наличие в геноме бактерий комплекса генов, ответственных за синтез фитогормонов, сидерофоров, антимикробных соединений и осмопротекторов, а также генов устойчивости к стрессам. Детальный анализ генома штамма *B. subtilis* 10-4, представленный в следующей главе, подтверждает это предположение и позволяет установить конкретные генетические детерминанты его эффективности.

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

Для раскрытия молекулярных основ и генетических детерминант *B. subtilis* 10-4, лежащих в основе выявленных ключевых эффектов инокуляции (главы 3–8) было проведено полногеномное секвенирование штамма *B. subtilis* 10-4 с использованием платформы Illumina в сочетании с биоинформационным анализом генов, ответственных за взаимодействие с растениями, включая рост и стресс-устойчивость.

9.1. Полногеномное секвенирование *B. subtilis* 10-4

По итогам секвенирования было получено 1 032 849 пар ридов длиной 300 (прямые) и 115 (обратные) bp. После фильтрации число пар ридов составило 1 019 535. Собрано 105 контигов, из них 19 длиннее 500 bp. Общая длина сборки 4 278 582 п.н.. Значение N50: 496887, L50: 3, GC-состав: 43,5%, среднее покрытие=99,0х. По результатам аннотации в геноме обнаружено: рРНК: 6 (1, 3, 2 (5S, 16S, 23S)), тРНК: 42, количество генов РНК: 53, общее количество генов составляет 4476, из них 4 314 являются белок-кодирующими, псевдогенов: 109. Анализ последовательности гена 16S рРНК выявил его 100% совпадение с эталонными последовательностями *B. subtilis*. Полногеномная последовательность депонирована в NCBI DDBJ/ENA/GenBank (номер доступа: JAVNHX0000000000, геномный проект ID: PRJNA1008864). Наивысшая степень гомологии по значению средней идентичности нуклеотидов (ANI, average nucleotide identity) со штаммом *B. subtilis* 168 (референсный геном, лабораторная модель для генетических/физиологических исследований) составила 98,5%.

Из результатов, представленных в таблице 9.1, видно, что размер генома *B. subtilis* 10-4 соответствует типичным размерам геномов других штаммов с биоконтрольной и ростстимулирующей активностью. При этом наблюдаются различия (до двух раз) по общему числу генов, количеству кодирующих последовательностей, рРНК, тРНК и псевдогенов. Количество белок-кодирующих генов у штамма 10-4 сравнимо с таковым у штамма Bbv57 и выше, чем у других PGP штаммов и лабораторного штамма 168, что может указывать на наличие у него широкого арсенала функциональных генов.

Таблица 9.1 – Сравнительный анализ геномов различных штаммов *Bacillus subtilis*

Свойства генома	Штаммы <i>B. subtilis</i>					
	10-4	26D	BSn5	Bbv57	MBB3B9_DB T-NECAB	168
Номер NCBI	PRJNA1008864 (Lastochkina et al., 2023c)	PRJNA1182114 (Burkhanova et al., 2024)	PRJNA846324 (Deng et al., 2025)	PRJNA794929 (Sankarasubramanian et al., 2022)	PRJNA786394 (Naorem et al., 2021)	SAME A3138 188
Размер генома (п.н.)	4 278 582	4 160 174	4 215 619	4 302 465	4 149 783	4 215 606
Количество генов (общее)	4 476	4 342	4 436	4 363	4 354	4 135
Белок-кодирующие гены	4 314	4 133	4 250	4 281	4 163	4 120
рРНК	1, 3, 2 (5S, 16S, 23S)	9, 7, 4 (5S, 16S, 23S)	30 (5S, 16S, 23S)	5	5, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	30 (5S, 16S, 23S)
тРНК	42	82	86	76	85	86
нкРНК	5	5	1	-	5	1
Псевдогены	109	102	13	27	94	13
Источник выделения	Почва	Хлопчатник	Аморфофаллус коньяк	Почва	Почва	Почва
Свойства	Биоконтроль, стимуляция роста	Биоконтроль, стимуляция роста	Биоконтроль, стимуляция роста	Биоконтроль	Биоконтроль, стимуляция роста	Лабораторный штамм

Детальный филогеномный анализ, выполненный при помощи веб-сервера TYGS с использованием алгоритма GBDP, позволил автоматически подобрать референсные геномы, наиболее соответствующие целостности геномного открытия. Полученное дерево (рис. 3.3, глава 3) показало, что штамм 10-4 достоверно относится к виду *B. subtilis* и занимает стабильное положение.

Кольцевая карта полного генома *B. subtilis* 10-4, созданная с помощью Proksee (<https://proksee.ca>) представлена на рисунке 9.1. На внешнем кольце карты отчётливо видны плотные кластеры генов, отвечающие за нерибосомальный синтез антимикробных соединений: пилипастанин (гены *ppsA-D*, ~0–0,5 Mbp), сурфактин (*srfaA-AC*, 1,5–2 Mbp) и бациллен (*pksJ*, *pksL*, *pksM*, *pksN*, *pksR*, 2,5–3 Mbp). В отличие от них, гены, ассоциированные с колонизацией (подвижность, образование биопленки) и прямой стимуляции роста растений (синтез фитогормонов, сидерофоров, метаболизм азота), распределены по всему геному и на карте не образуют отдельных кластеров. Их

детальная аннотация и функциональная оценка представлены в разделе 9.2 на основе анализа с использованием веб-сервисов RAST и antiSMASH.

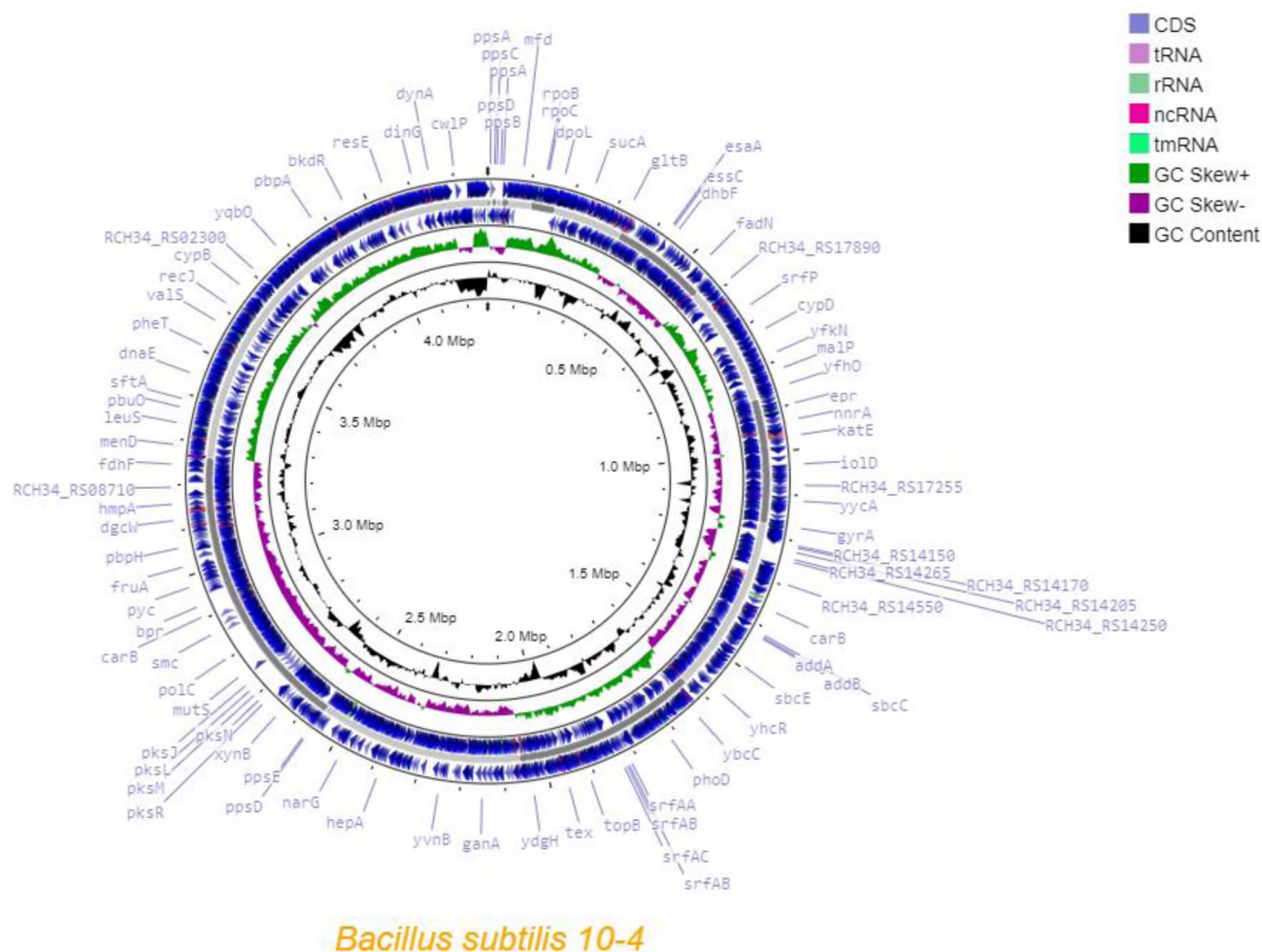


Рис. 9.1 Кольцевая карта полного генома *B. subtilis* 10-4

9.2. Функциональная аннотация и биоинформатический анализ генома *B. subtilis* 10-4

С использованием веб-сервиса RAST в геноме *B. subtilis* 10-4 детектировано 331 категория подсистем – группы белков, обеспечивающих реализацию определенных биологических процессов (рис. 9.1). Как видно из табл. 9.2, общее количество функций подсистем – 1668. Среди них наиболее представленными были подсистемы с функциями метаболизма аминокислот и их производных (281) (16,9%), метаболизма углеводов (247) (14,9%), белков (165) (9,9%), что свидетельствуют о широком метаболическом потенциале *B. subtilis* 10-4 и способности его эффективного взаимодействия с растениями в норме и при стрессе.

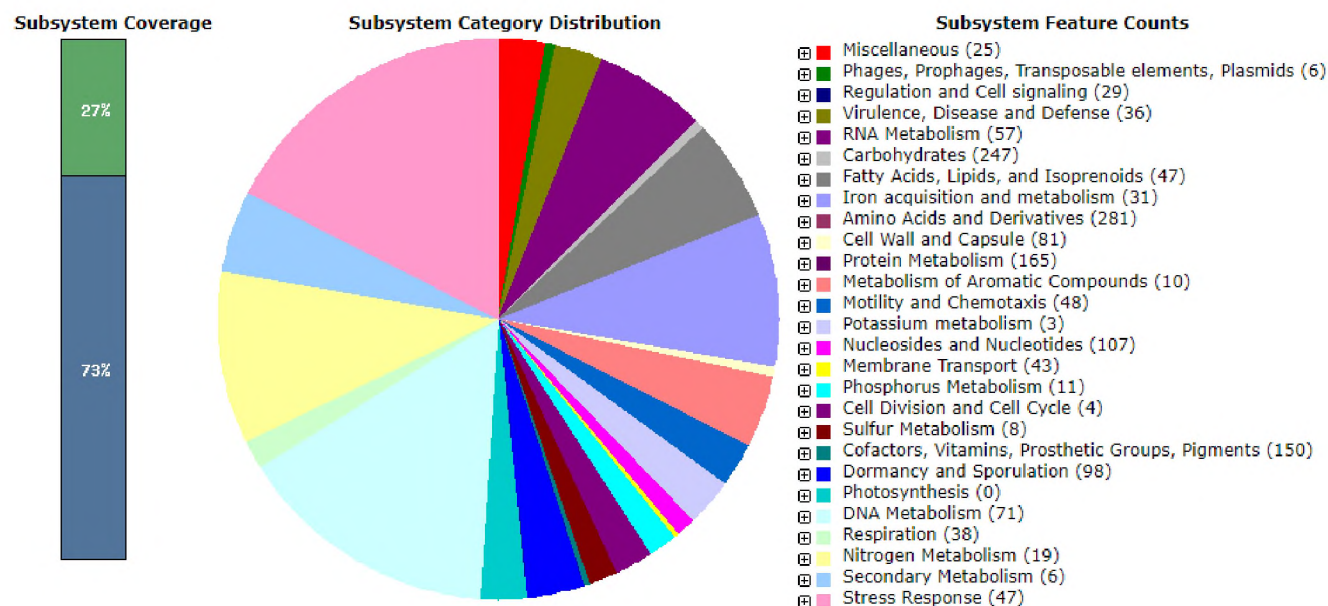


Рис. 9.2. Распределение категорий подсистем клеточного метаболизма у штамма *Bacillus subtilis* 10-4 на основе результатов функциональной аннотации генома с помощью веб-сервиса RAST (<https://rast.nmpdr.org>). Круговая диаграмма представляет процентное содержание белков для каждой категории подсистем. 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. Покрывтие подсистем (Subsystem Coverage) – соотношение известных белков, которые могут быть помещены в существующие подсистемы (зеленый цвет) (27%) (всего 1 196 генов), и неизвестных белков, которые не могут быть помещены ни в одну существующую подсистему (синий цвет) (73%) (всего 3 345 генов)

Таблица 9.2 – Распределение выявленных категорий подсистем *B. subtilis* 10-4 по функциям

Категории подсистем	Количество функций подсистем (ед)	Доля от общего количества (%)
Аминокислоты и производные	281	16,85
Углеводы	247	14,87
Метаболизм белков	165	9,89
Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты	150	8,99
Нуклеозиды и нуклеотиды	107	6,41
Покой и споруляция	98	5,88
Клеточная стенка и капсула	81	4,86
Метаболизм ДНК	71	4,26
Метаболизм РНК	57	3,42
Подвижность и хемотаксис	48	2,88
Реакция на стресс	47	2,82
Жирные кислоты, липиды и изопреноиды	47	2,82

Мембранный транспорт	43	2,58
Дыхание	38	2,28
Вирулентность, болезнь и защита	36	2,16
Усвоение и метаболизм железа	31	1,86
Регуляция и клеточная сигнализация	29	1,74
Разное	25	1,5
Метаболизм азота	19	1,14
Метаболизм фосфора	11	0,66
Метаболизм ароматических соединений	10	0,6
Метаболизм серы	8	0,48
Вторичный метаболизм	6	0,36
Фаги, профаги, транспонируемые элементы, плазмиды	6	0,4
Деление клеток и клеточный цикл	4	0,24
Метаболизм калия	3	0,18
Фотосинтез	0	0
Всего	1668	100

Аминокислоты и их производные. Всего в геноме *B. subtilis* 10-4 выявлено 281 наиболее представленных категорий подсистем, отвечающих за аминокислоты и их производные (рис. 9.2), из которых: 36 – ассимиляция глутамина, глутамата, аспартата, аспарагина и аммиака (*PgsC, PgsB, AbrB, PgsS, PgsE, PgsA, GR, gGT, GltD, YisO, AspC, AsnB, GDH-NAD, AnsB, GlcA, Murl, GSI, AnsA, GltB2, AspA, GltB*); 13 – метаболизм гистидина (*HutG, HutH, HutR2, HutI, HutU, HisG, HisB, HisI, HisC, HisD, HisH, HisF, HisAb*); 38 – ароматические аминокислоты и их производные (*TyrAp, AroHI, PheAlp, AroIIa, AroIIb, AroHII, trpB, trpAa, trpC, trpAb, trpEa, pabAc, trpD, pabAb, trpEb, pabAa, AroEI, AroG, AroAIb, AroB, AroCI, AroDIIa, AroCII, PabAb, priA, PabAc, TrpAa, PabAa, TrpEb, ICS, ICSsp, TrpB, TrpD, TrpAb, TrpEa, ICTsp, TrpC*); 11 – пролин и 4-гидроксипролин (*proA, proC, PUA_dom, proB, proG*); 32 – аланин, серин, глицин (*IscR, IlvE, AlaR, CDS, GcvP1, GcvP2, GcvT, GcvH, erA, SerC, GlyA, Kbl, GlyA, Tdh, SerA, SerC, GlyA, CysB, GcvT, SerC, SerS, GcvH, CysA, SdhA, GlyA, GcvP1, SerA, SerA, SdhB, Kbl*); 30 – аргинин, цикл мочевины, полиамины (*UreC, UreA, UreB, MTAN, AOAp, SPDS, ArgDC, SAMDCb, AUH, ArgF, RocB, ArgR, RocE, SpeB, ArcD, RocR, RocD, RocF, RocA, SpeA, gabaT, ArgR, ArcD, ArcB, UrtE, UreA, UreC, UreB*); 40 – аминокислоты с разветвленной цепью (*BkdR, BCDH_E3, EH, BCDH_E1b, BCAT, BCDH_E1a, KACT1, BCDH_E2b, IMPDH, BCAT, IPMDS, IPMSY, IPMDL, IlvA-A, LeuA, IlvE, IlvD, LeuD, IlvG, LeuC, IlvM, LeuB, BCDH_E2b, BCAT, BCDH_E1a, EH,*

BCDH_E1b, BkdR, BCDH_E3, MGCH, BC, AACS, BCCP, MCCC2, IVD, HMGCL); 81 – лизин, треонин, метионин и цистеин (*MetN, CysE, MetQ, HSST, RHMC, SAMS, AHSB, CTGL, CTGS, SAHCN, HSDH, CTBS, HSM, MTHFR, MetE, CTBL, SAMMI, MetP, HK, ASD, ADAPAT DHPS, DapH, DAPDC, DAPE, AK, DHPR, DAPDA, ThrB, Asd, ThrC, AspC, Hom, ThrA, DAPDC, THPAT, DAPE, DHPR, DAPDA, ASD, ADAPAT, DHPS, GabR, TDG_9, RHMC, SAMS, MetN, MetQ, CTS, SAHN, MetP, CGL, ETPb, bK-AcT, LAM, ETPa, ECoAH, 3HBCDH, AACoAT, MmuM, MmuP*). Очевидно, что наличием такого большого числа генов, ответственных за синтез аминокислот в геноме *B. subtilis* 10-4, обуславливает изменение под его влиянием аминокислотного профиля в зерне пшеницы в сторону повышения ряда аминокислот, включая незаменимые (рис. 8.9).

Углеводы. Всего обнаружено 247 подсистем в геноме штамма 10-4, отвечающих за углеводы (рис. 9.2), из них: 17 – органических кислот (*GK-I, Pyk, HOPR, HPR, alsD, alsR, alsS, MICDH, PrpC, PrpB, PrpD, MICDH, MCS, CAN, MICLY, MCDH*), 10 – ди- и олигосахаридов (*crB, FruK, SucP, ScrR_3, GalM, GalT, GalK, GalE*), 79 – центральный углеводный обмен (*DSTO, PDHB, LeuAP, DATP, PDHA, DBTO, DDHB, ODHAB, BCKDHB, BCKDHA, DDHA*), 9 – аминсахара (*NtdA, NtdR, NtdB, NtdC, NagBI, NagQ, NagA*), 74 – моносахариды (*FruR2, PtsH, FruK, Tal, PtsI, FK, GarR, YcbG, GudD, KdgD, GK1, GarD, XylA, XylB, XylR_BS, Xyn, AbnA, AraE, AraD, AraA, AraB, DeoB, DeoK, Pdp, DeoD, DeoR1, DeoC, NupC, GR, PglDH, GP_BS, GlnK, GDH, RbsK, RbsR, RpiB, PelA, ExuT, UxuB, UidB, KduD1, PelB1, KdgA, UxaC1, KduD, KdgD, UxaB, Kdgr1, KdgT, KduI, UxuA, ExuR, GarD, Agu*), 26 – ферментация (*PTA, LDH_L, ACK, R1, R2, AD_9, ACA, 3HCD, ECH, ALDC, R-BDH, ALS_g, alsR, ADH-E3, ALS_s, AcoR, ALS_c, FixA, EH, BdhA, FixB, AtoB, HbdA*), 5 – полисахариды (*GAT_C, GAT_D, GBr, GS, GP*), 5 – одноуглеродный метаболизм (*FTCL, fold2, fold, FTFD, MTFR*), 20 – сахарные спирты (*GlpF, GlpK, GlpD, GlpT, GpsA, UdpQ, GlpP, GPKI, IolF, Tri, IolG1, IolT, IolE, IolC, IolR, IolJ*).

Белковый обмен. 165 категорий подсистем, отвечающих за метаболизм белков (рис. 9.2), из которых: 10 – процессинг и модификация белков (*PglF, PglC, PglE, GalE, LspA, LepB*), 24 – деградация белков (*BS-ClpY, RadA, LonI, ClpC, ClpX, CtsR, PilT, GluXxx2, DbAMP, YpdF, BacLys, AmpS, PepA, AcXxx, gamma-Glu, DacA*), 123 – биосинтез

белков (*SmpB*, *Pth*, *Rrf*, *Map*, *RF-2*, *RF-1*, *Def*, *LepA*, *EF-Tu*, *EF-G*, *EF-Ts*, *EF-P*, *Ile*, *IF-3*, *IF-1*, *RbfA*, *IF-2*, *fnt*, *Met*, *LysII*, *Thr*, *Leu*, *Arg*, *L20p*, *L14p*, *L27p*, *L2p*, *L5p*, *L24p*, *L33p*, *L31p*, *L1p*, *L16p*, *L35p*, *L7Ae*, *L3p*, *L31-Zn*, *L29p*, *L28p*, *L32p*, *L25p*, *L9p*, *L6p*, *L11p*, *L31+Zn*, *L22p*, *L4p*, *L33-Zn*, *L23p*, *L30p*, *L19p*, *L33+Zn*, *L21p*, *L36p*, *L17p*, *L13p*, *L18p*, *L15p*, *L10p*, *Gly*, *G-beta*, *Glu*, *Gln*, *GatC*, *GatA*, *GatB*, *Val*, *His*, *Trp*, *Ala*, *Cys*, *glyS*, *glyQ*, *5S*, *LSU*, *SSU*, *Tyr*, *Phe-b*, *YtpR*, *S18p*, *S7p*, *S2p*, *S11p*, *S1p*, *S19p*, *S12p*, *S4p*, *S21p*, *S13p*, *S8p*, *S16p*, *S14p-Zn*, *S17p*, *S10p*, *S20p*, *S6p*, *S18p-Zn*, *S5p*, *S3p*, *S9p*, *S15p*, *S14p*, *Asp*, *Asn*, *Asp*, *Asn*, *AatB*, *AatC*, *ProB*, *STM4549*, *YbaK*, *Ser*, *RF-2*, *Pfs*), 8 – сворачивание белков (*DsbA*, *CcdA*, *PrsA*, *HtpG*, *GrpE*, *DnaJ*, *DnaK*).

Мембранный транспорт. 43 подсистемы, отвечающие за мембранный транспорт (рис. 9.2): 11 – без подкатегории (транспортёры класса ECF (*ECFa*, *ThiT*, *ECFp*, *YkoE*, *YkoC*, *BioY*, *TrpP*, *RibU*)); 1 – транспортёры ABC (транспортёр ABC олигопептида (*oppA*)); 13 – транспортёры катионов (система транспорта меди (*YcnK*, *CopD*, *YcnI*, *CopC*, *YcnL*, *CopA*, *CsoR*, *CopZ*), транспорт магния (*corA*), система поглощения меди CopCD (*CopC*, *CopD*)); 1 – транспортёры TRAP (*DctP*); 8 – уни-сим- и антипортёры (*NhaA*, *NhaD* и натрий-зависимые транспортёры фосфата (*nptA*); мультисубъединичный катионный антипортёр (*B*, *D*, *C*, *G*, *E*, *F*, *A*); 9 – транслокация белков через цитоплазматическую мембрану (система двойной аргининовой транслокации (*TatAd*, *TatCd*), транспортёр EcsAB, влияющий на экспрессию и секрецию секреторных препротейнов (*EcsA*, *EscB*, *Hpr*, *EcsC*, *Fold*)).

Нуклеозиды и нуклеотиды. Также было выявлено 107 подсистем, ответственных за нуклеозиды и нуклеотиды (рис. 9.2): 54 – пурины (ГМФ-синтаза (*GuaA*, *GuaB*), утилизация пуринов (*XdhC*, *XDIS*, *XP*, *XDFAD*, *XDMB*), субъединицы ксантиндегидрогеназы (*XDHFeS*, *XdhC*, *XDHMo*, *XDHFAD*), биосинтез пуринов de novo (*PurF*, *PurD*, *PurQ*, *PurM*, *PurH1*, *PurS*, *PurL*, *PrsA*, *PurB*, *PurH2*, *PurC*, *PurN*), превращения пуринов (*GMPR*, *ASS*, *adphtr*, *punph*, *gudeam*, *in5mde*, *guk*, *hygph*, *XPRT*, *GuaA*, *nt5*, *dadk*, *addeam*, *ASL*, *GuaB*, *23PDE*, *GK*, *ndk*), метаболизм ксантина у бактерий (*PbuG*, *PbuX*, *NupC*, *Xpt*)); 35 – пиримидины (синтез пиримидинов de novo (*pyrE*, *uraA*, *pyrAB*, *pyrAA*, *pyrF*, *pyrR11*, *pyrR1*, *pyrC*, *pyrB*), превращения пиримидинов (*ctps*, *punp*, *thydysy*, *punp*, *udk*, *dcyk*, *nt5*, *thydyk*, *cytk*, *thred*, *bntp*, *23cnp*,

cyde, thyk, pyrRI, ndk)); 4 – детоксикация (*MazG, YtkD-2, YtkD-1, NudF*); and 14 – без подкатегории (аденозилнуклеозидазы (*MTAN, SAHN, RTPN*); восстановление рибонуклеотидов (*RNRlb_B, RNRlb_A, NrdI, RNRTR*)).

Метаболизм РНК. Выявлено 57 подсистем, отвечающих за метаболизм РНК (рис. 9.2): 34 – транскрипция (транскрипционные регуляторы семейства Rrf2 (*Rrf2-III, Others, IscR, NsrR*), РНК-полимераза бактериальная (субъединицы омега, дельта, бета, альфа), инициация транскрипции, бактериальные сигма-факторы (*RpoD, SigZ, RpoE, SigV, SigF, FliA, SigH, sig70, SigK, SigW, SigE, SigI, RpoN, SigG*), факторы транскрипции бактериальные (*Rho, GreA, NusA, NusG, NusB, COG2740, Tap, TrcF*); 23 – процессинг и модификация РНК (*Rph, k2C, Rnz, RnpA, RnhC, Bsn, J1, J2, YhaM, RnhB; RsmD, RsmB, RsmA, TrmL, NrnB, RNaseR, RNaseII,; RNaseHIII, RNaseHIII, HI-Bac, 23-lig, yjcG*).

Метаболизм ДНК. За метаболизм ДНК у штамма 10-4 отвечает 71 подсистема (рис. 9.2), из них: 6 – репликация ДНК (*PolA-5pr PolC, Topo-VIB, GyrA*); 50 – репарация ДНК (*Ssb, ExoIII, EndoIV, DinP, DinP, XseA, SbcD, XseB, RadA, LexA, RecN, RecA, MutY, Ada, Ogt, EndoV; MutS2, MutL, MutS; YoaA, YpvA, UvrC, UvrA, UvrB; LigD, Ku, MutS, RecX, RecA, YrrC; RecA, RecX, RecS, RecQ, RecR, RecU, RecJ-p, RecA, RecF, Ssb, RecO*); 4 – поглощение ДНК, компетентность (*recR, bofA, Topo-III, dnaX*); 11 – Метаболизм ДНК – без подкатегории (рестрикция-модификация типа I (*HsdR, HsdM*), ДНК-лигазы (*LigD, Lig, Ku*), наружные и внешнемембранные нуклеазы (*Bsn*), система рестрикции-модификации (*HsdR, HsdM*), структурные белки ДНК, бактериальные (*HU-Bs, Smc*).

9.2.1. Гены *B. subtilis* 10-4, участвующие в колонизации и взаимодействии с растениями

Продукция экзополисахаридов и формирование биопленки. Способность *B. subtilis* 10-4 эффективно колонизировать поверхность корней и внутренние ткани растений является предпосылкой для фитостимуляции. Результаты показали, что геном штамма 10-4 содержит набор генов, участвующих в формировании биопленки, включая экзополисахаридный (EPS) *epsA-O*, состоящий из 15 генов (*epsO, epsN, epsM,*

epsL, epsK, epsJ, epsI, epsH, epsG, epsF, epsE, epsD, pel, pelB), что служит индикатором их потенциала к стимуляции роста и повышению устойчивости растений к стрессам в сочетании с другими механизмами (синтез осмолитов, гормонов, антиоксидантов).

Бактериальный хемотаксис, подвижность и колонизация. В геноме штамма 10-4 были обнаружены несколько оперонов (FliQGPTIRFKNEHMSJF, FlgCBFKGLEBDN, FlbBD, FlaA, FleN, FlhA, FtsI, RpoD, MotAB, RpoN), кодирующих структурные компоненты жгутикового аппарата и ключевые регуляторные факторы. Выявлено 48 субсистем, ответственных за жгутиковую подвижность бактерий: 40 – жгутики (*FliQ, FlhF, FliG, FlgC, FlhB, FliP, FliF, FlbB, RpoD, FliK, FlgF, FliJ, MotB, FlgK, FlgG, FlgL, FlgE, FlgB, FlaA, FlhA, FlgD, MotA, FliN, FLiE, FlbD, FliH, FliS, FleN, RpoN, FliM, FlgN, FliT, FliI, FliR*) и 8 – жгутики у *Campylobacter* (*FlaA, flgC, FtsI, FliE*). В то время как подсистемы и гены, кодирующие нежгутиковую подвижность, хемотаксис и магнитотаксис не были обнаружены с помощью RAST. Ген *PomA*, кодирующий белок хемотаксиса (PomA), был представлен в геноме штамма 10-4.

9.2.2. Метаболические пути *B. subtilis* 10-4, лежащие в основе ростстимулирующей и антистрессовой активностей на растения

Функциональные гены, связанные с ростом растений и минеральным питанием. Анализ генома *B. subtilis* 10-4 показал наличие ряда генов, связанных с стимуляцией роста растений и улучшением минерального питания, таких как продукция ауксина, метаболизм азота, фосфора, калия, серы, а также усвоение и метаболизм железа (рис. 9.2, табл. 9.3).

Таблица 9.3 – Предсказанные кластеры генов, связанных с стимуляцией роста (PGP) и минеральным питанием в геноме *B. subtilis* 10-4 с помощью веб-сервиса RAST

Описание PGP активности	Ген	Функция
Биосинтез ауксина	<i>trpA, trpB, trpC, trpP, trpD, trpE, trpF, TRPs, TSa, TSb, APRT, PRAI</i>	Биосинтез триптофана
	<i>dhaS, epsN</i>	Биосинтез ИУК
Метаболизм азота	<i>glnG, nrgB</i>	Регуляция азотистого обмена
	<i>NarG, NorD, NarH, NarJ, NorQ, NarI</i>	Денитрификация

	<i>amt, GOGDP2, GOGDP1, GOGATF, PII, GSI, NsrR</i>	Ассимиляция
	<i>NarH, NarJ, NarG, NiR1b, NarI, NiR1a</i>	Аммонификация нитратов и нитритов
	<i>gltA, gltB, glnA, fpgS</i>	Метаболизм глутамата/глутамина
	<i>narT, nasA, nasB, nasC, nasD, nasE, narX, narG, narH</i>	Ассимиляция и метаболизм нитратов/нитритов
Метаболизм фосфора	<i>pstA, pstC, pstS</i>	Связывание и транспорт фосфата
	<i>pstB</i>	Энергетика системы транспорта фосфатов
	<i>pitA</i>	Альтернативный транспорт фосфата
	<i>NaPi, PhoH, MDIP, PLAT, PhoP, PhoH, PpaX2, PhoR, AP</i>	Метаболизм фосфата
Усвоение и метаболизм железа	<i>dhbC, FeuA, FeuB, dhbB, FeuC, dhbE, dhbF, yuiI, dhbA, Hyp1, Fe-ABC1, X-ABC3, X-ABC2</i>	Сидерофоры
	<i>X-ABC1, X-ABC3, HtsA, S, A, HtsB, ZnH, Hyp, HtsC, X-ABC2, R4</i>	Системы поглощения и утилизации гема, гемина у грамположительных бактерий
	<i>EfeB, EfeU, EfeO</i>	Транспортер двухвалентного железа EfeUOB, индуцированный низким pH
Метаболизм калия	<i>KefA, MSC</i>	Гомеостаз калия
Метаболизм серы	<i>AS</i>	Метаболизм галактозилцерамида и сульфатида
	<i>Tpx, AhpC-like, TrxR, Bcp</i>	Тиоредоксин-дисульфидредуктаза

Синтез ИУК. В частности, в геноме штамма 10-4 выявлено 4 подсистемы, ответственные за биосинтез ауксина (*PRAI, Tsa, TSb, APRT*) (рис. 9.2). Выявлены гены *trpA* (альфа-цепь триптофансинтазы), *trpB* (бета-цепь триптофансинтазы), *trpC* (индол-3-глицеролфосфатсинтаза), *trpP* (предполагаемый триптофантранспортный белок), *trpD* (антранилатфосфорибозилтрансфераза) и *trpE* (компонент 1 антранилатсинтазы), *trpF* (N-(5'-фосфорибозил)антранилатизомераза) и *trpS* (триптофан-тРНКлигаза), которые участвуют в синтезе предшественника ИУК триптофана. Кроме того, геном 10-4 содержит гены *dhaS* и *epsN*, кодирующие пиридоксальфосфатзависимую аминотрансферазу, участвующую в различных биологических процессах, связанных с биосинтезом ИУК.

Наши предыдущие исследования подтвердили способность 10-4 синтезировать ИУК (табл. 3.2) (Lastochkina et al., 2023b). Продукция ИУК играет важную роль в стимуляции роста при стрессах, включая засуху и токсичные соединения (Silambarasan et al., 2019; 2022). Бактериальная ИУК действует как сигнальная молекула для взаимодействия растений с микробами и способствует усилению роста корней растений, тем самым улучшая усвоение воды и питательных веществ, что приводит к повышению урожайности растений (Duca et al., 2014; Gupta, Pandey, 2019; Zerrouk et al., 2019).

Результаты функциональной аннотации и биоинформатического анализа генома *B. subtilis* 10-4 демонстрируют наличие пула генов, ассоциированных с синтезом триптофана (*trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpP*, *trpD*, *trpE*, *trpF*, *TRPs*, *TSa*, *TSb*, *APRT*, *PRAI*, *epsN*) и биосинтезом ИУК через индол-3-пируватный (ИП) путь (гены аминотрансферазы (*yugH*, *dapX*), альдегид дегидрогеназы (*aldHT*, *aldY*, *alkH*, *dhaS*, *yfmT*), индол-3-пируват декарбоксилазы (*IPAC*)), индол-3-ацетамидный (ИАА) путь (гены индол-ацетамидгидралазы (*IAN*), нитрилазы 1 (*N3*)), индол-3-ацетальдегидный путь (ген индол-ацетальдегид дегидрогеназы (*IAD*)).

Вместе с тем важно отметить, что, как видно из рисунка 9.3, в геноме штамма *B. subtilis* 10-4 представлен полный набор генов синтеза триптофана, что свидетельствует о его способности самостоятельно производить эту аминокислоту, обеспечивая преимущество для выживания в бедных или изменчивых почвенных условиях, где доступность готовых органических веществ может быть ограничена. Наличие полного консервативного пути биосинтеза аминокислоты триптофана указывает на то, что штамм хорошо адаптирован к своей экологической нише и не утратил эти гены за ненадобностью, что иногда случается с бактериями, постоянно живущими в богатых питательными веществами средах (Сырова и др., 2022; Tang et al., 2023). В целом эти данные подчеркивают метаболическую самостоятельность штамма *B. subtilis* 10-4 и свидетельствуют о его потенциале как полезного для растений микроорганизма, способного синтезировать функционально важные соединения на основе триптофана.

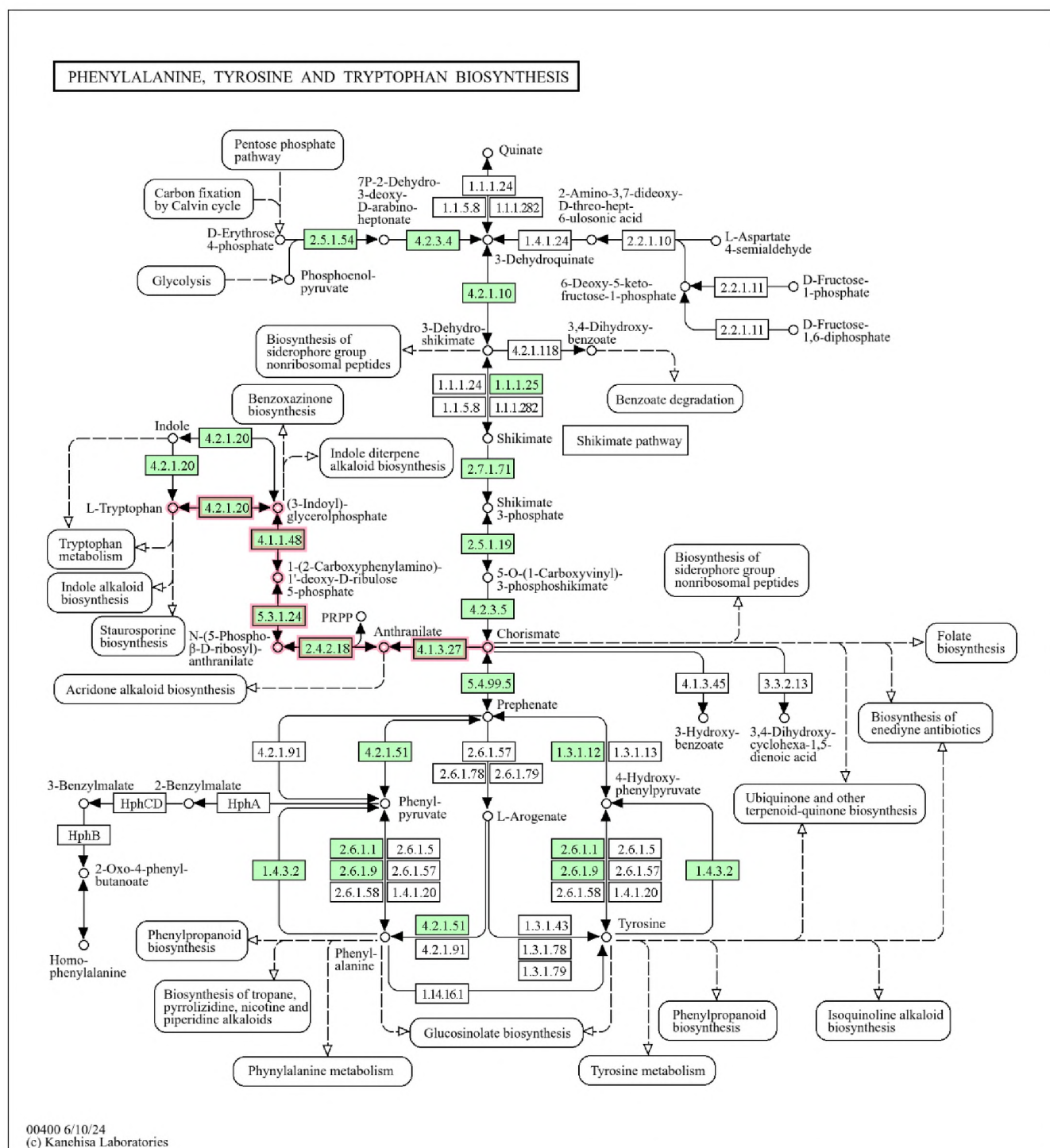


Рис. 9.3. Схема, демонстрирующая метаболический путь биосинтеза триптофана у *Bacillus subtilis* (построено с помощью KEEG) с выделением генов, идентифицированных в геноме *B. subtilis* 10-4 (зеленый цвет, красная рамка)

Метаболизм азота. Микробная фиксация азота играет решающую роль в азотном цикле, преобразуя азот (N_2) в воздухе в NH_4^+ для прямого усвоения растениями с помощью азотфиксирующих ферментов, тем самым поддерживая и увеличивая продуктивность растений (Chen et al., 2003). В геноме штамма 10-4 обнаружено 19

подсистем, отвечающих за азотистый обмен, из них: 6 – денитрификации (кластеры генов денитрифицирующей редуктазы *NarG*, *NorD*, *NarH*, *NarJ*, *NorQ*, *NarI*), 13 – ассимиляции аммиака (*amt*, *GOGDP2*, *GOGDP1*, *GOGATF*, *PII*, *GSI*, *NsrR*); нитрозативного стресса (*NsrR*); нитрат- и нитрит-аммонификации (*NarH*, *NarJ*, *NarG*, *NiR1b*, *NarI*, *NiR1a*) (рис. 9.2, табл. 9.3). Также были выявлены гены, связанные с метаболизмом азота в геноме *B. subtilis* 10-4 такие как *glnG* (белок регуляции азота NR(I)), *nrgB* (белок регуляции азота РII-подобный), *gltA* (глутаматсинтаза [NADPH] большая цепь), *gltB* (глутаматсинтаза [NADPH] малая цепь), *fpgS* (фолилполиглутаматсинтаза), *narT* (предполагаемый транспортер нитрата), *nasA* (транспортер нитрата), *nasB* (субъединица переноса электронов ассимиляционной нитратредуктазы), *nasC* (каталитическая субъединица ассимиляционной нитратредуктазы), *nasD* (нитритредуктаза [NAD(P)H]), *nasE* (малая субъединица ассимиляционной нитратредуктазы [NAD(P)H]), *narX* (белок, подобный нитратредуктазе), *narG* (альфа-цепь дыхательной нитратредуктазы 1), *narH* (бета-цепь дыхательной нитратредуктазы 1), *glnA* (глутаминсинтетаза). Присутствие этих генов, очевидно, определяют способность *B. subtilis* 10-4 к азотфиксации, как было показано нами ранее (табл. 3.2). Гены, отвечающие за стимулирование роста растений, демонстрируют сильное взаимодействие между собой. Экспрессия таких генов, как глутаминсинтаза (кодируемая *glnA*), играет центральную роль в азотистом обмене как у растений, так и у микроорганизмов. Глутаматсинтаза, кодируемая генами *gltA* и *gltB*, также играет решающую роль в активности глутаминсинтетазы и азотистом обмене в условиях стресса (Benedetto et al., 2017).

Метаболизм фосфора, калия, серы и железа. Выявлено, что геном *B. subtilis* 10-4 содержит 11 подсистем, отвечающих за метаболизм фосфора, из которых: 3 – гомеостаз калия, 8 – метаболизм серы, 31 – абсорбция и метаболизм железа, в том числе 15 из них реагируют на системы поглощения и утилизации сидерофора, гема, гемина у грамположительных бактерий и транспортер двухвалентного железа *EfeUOB*, индуцируемый низким рН (рис. 9.2, табл. 9.3). Кроме того, с помощью RAST были выявлены гены, кодирующие белки, участвующие в метаболизме фосфата *pstS* (фосфатсвязывающий белок), *pstA* (белок пермеазы системы транспорта фосфата), *pstB* (белок связывания АТФ импорта фосфата), *pstC* (белок пермеазы системы транспорта

фосфата), and *pitA* (низкоаффинный неорганический транспортер фосфата). Следует отметить, что система *pst* является высокоаффинным переносчиком неорганических фосфатов, обнаруживаемым у многих видов бактерий. Система *pst* может ускорить расщепление фосфорсодержащих органических соединений, которые трудно усваиваются почвенными видами, изменяя активность фосфатазы микроорганизмов и способствуя высвобождению фосфора, тем самым увеличивая его содержание в растениях (Lamarche et al., 2008). Эти результаты объясняют выявленное нами накопление фосфора, калия, железа в клубнях и растениях картофеля под влиянием инокуляции *B. subtilis* 10-4 (рис. S10, табл. S2).

В результате функциональной аннотации с помощью Prokka в геноме *B. subtilis* 10-4 обнаружены гены *pstS1* (phosphate-binding protein PstS 1), *pstC* (phosphate transport system permease protein PstC), *pstA* (phosphate transport system permease protein PstA), *pstB3* (phosphate import ATP-binding protein PstB 3), а также *pitA* (low-affinity inorganic phosphate transporter 1), что согласуется данными при анализе генома с помощью RAST.

Гены, связанные с устойчивостью растений к стрессу. Результаты показали наличие 47 категорий подсистем в геноме *B. subtilis* 10-4, ответственных за стрессовые реакции (рис. 9.2), из которых: 17 – Hfl-оперон (*Hfq*), регуляция стрессового ответа SigmaB (*RsbW*, *RsbU*, *RsbV*, *RsbR*, *RsbT*, *SigB*, *RsbS*), метаболизм диметиларгинина (*DMAAH*, *OAT*), бактериальные гемоглобины (*I_C12*), углеродное голодание (*CstA*, *CsrA*); 1 – периплазматический стресс (*RseP*); 14 – оксидативный стресс (глутатион: окислительно-восстановительный цикл (*GPX*), глутатион: неокислительно-восстановительные реакции (*GloA*), защита от АФК (*sodB*, *sodC*), окислительный стресс (*PerR*, *SODB*, *SODC*, *SODMn*, *OsmcI*, *OsmcIR*, *AhpC*, *NsrR*, *FUR*); 15 – осмотический стресс (поглощение холина, бетаина и биосинтез бетаина (*OpuD*, *OpuBA*, *GbsB*, *OpuAC*, *OpuAA*, *OpuBC*, *OpuBB*, *OpuBD*, *OpuAB*, *BetB*)); осморегуляция (*glpF*). Гены *ysnF* и *yhdN* кодирующие, соответственно, белок ответа на стресс (YsnF) и общие стрессовые белки.

В то же время, при дополнительном анализе последовательности генома *B. subtilis* 10-4, выявлены кластеры биосинтетических генов, кодирующих белки-переносчики глицин-бетаина (*opuD*, *opuCD*, *opuCC*, *opuCB*, *opuCA*), холина (*opuBD*, *puBC*, *opuBB*, *opuBA_1*), теопероксидазу (*tpx*), СОД (*sodA_1*, *yoj*, *sodA_2*), белки холодового шока

(*cspD*, *cspC*, *cspB*). Наличие этих генов помогает бактериям лучше адаптироваться к различным средам обитания. В геноме 10-4 также присутствуют гены, кодирующие ферменты биосинтеза полиаминов, такие как спермидин (*speG*, *paiA*, *bltD*, *speE*). Следует отметить, что спермидин является основным полиамином, синтезируемым бактериями, который вовлекается с стимуляцией роста растений и повышение устойчивости к щелочам и кислотам, например, засолению (Chen et al., 2017a).

Клеточный сигналинг. Было обнаружено 29 категорий подсистем, ответственных за регуляцию и клеточный сигналинг (рис. 9.2): 14 – системы репрессии катаболитов HPr (*Crh*, *CspA*, *PtsH*, *CspB*), cAMP сигналинг у бактерий (*AC*, *APRT*), половые феромоны у *Enterococcus faecalis* и других Firmicutes (*OppA*, *Hyp4*, *CamS*, *Hyp3*, *SPaseII*), строгий ответ, (p)ppGpp метаболизм (*SpoT*, *Spo*); 15 – программируемой клеточной гибели и токсин-антитоксин (*HA2*, *cidA*, *cidB*, *CDA*, *lytR*, *lrgA*, *lrgB*, *lytS*, *H2*, *YdcE*, *YdcD*, *YdcD*, *dcE*).

Уникальные геномные каркасы *B. subtilis* 10-4, ассоциированные с толерантностью бактерий к стрессу. Результаты показали наличие генов и регуляторных элементов в геноме штамма 10-4, обеспечивающих его способность противостоять различным стрессовым факторам окружающей среды, таким как высокие температуры, окислительный стресс или присутствие токсичных соединений. Это, очевидно, является объяснением выявленной нами устойчивости клеток *B. subtilis* 10-4 к ПЭГ, гербициду (рис. 3.9), ацетату Cd (рис. 3.11) и NaCl (рис. 3.12). В геноме штамма 10-4 детектированы гены *KtrA*, *KtrB* (Ktr system potassium uptake protein A and B), кодирующие белки поглощения калия, что предположительно обеспечивают выживание бактерий в средах с высокими концентрациями солей. Интересно, что в геноме *B. subtilis* 10-4 также предсказаны гены для детоксикации или сопротивления соединениям, накапливающимся в окружающей среде, таким как арсенит (*arsR*, *arsC*), органические пестициды или нитроароматические соединения (*sugE*, *qacC*, *mhqR*, *mhqA*).

Покой и споруляция – два взаимосвязанных и важных адаптивных механизма, которые позволяют бактериям выживать в стрессовых ситуациях. Покой – это состояние метаболической и физиологической неактивности, в котором клетки могут находиться для того, чтобы выжить в неблагоприятных условиях. Споруляция – это процесс, при котором клетка образует стабильную спору, способную выживать в

экстремальных условиях окружающей среды. Результаты показали (рис. 9.2), что в геноме *B. subtilis* 10-4 находится подсистем, отвечающих за покой и споруляцию: 12 – прорастание спор (*GerPE, GerPD, GerD, YvbX, YkvT, YpeB, CwlD, CwlJ, GerPB, YdhD, SleB, GerPC*); 11 – драфт споруляции (*Spo0A-P, KinB, KinA, YkvU, KbaA, V-B, Spo0A, Yaad, V-B1, GerD, PG*); 3 – белки, ассоциированные со споруляцией с широкими функциями (*SpoVC, SigH*); 12 – кластер споруляции (*R3, MazG, SpoIIE, R4, SpoVT, R7, R9, DivIC, R6, SpoIID, R2, R5*); 8 – кластер споруляции IIIA (*AG, AH, AB, AF, AC, AE, AA, AD*); 43 – гены-сироты споруляции (*SpoIIB, KapD, spoIIIF, SpoVE, SpoIVFA, SpoVAB, spoIIIH, SpoIIAB, SigE, KinC, SpoVAD, SpoIIIGA, Spo0F, SpoIIM, SpoVID, SpoVT, SpoIVB, SpoIVA, KinB, spoIIIG, SpoIIAD, SpoVAF, SigG, SpoIIAC, KapB, Spo0B, SigK, SpoIIAA, spoIIIE, SpoIID, SigF, KinA, SpoVAA, SpoIVFB, SpoIIP, SpoVB, Spo0A, SpoVAC, SpoIIE, SpoIIID, SpoIIQ, SpoIIR*); 2 – обезвоживание ядра спор (*SmpB, SmpA*); 1 – SpoVS семейство белков (*SpoIII_AE*); 6 – компонент белка матрикса биопленки *Bacillus* TasA и другие гомологи (*SipW, SinR, Slr, TasA, YqxM*).

Клеточная стенка и капсула. Выявлена 81 категория подсистем, ответственных за клеточную стенку и капсулу (рис. 9.2), из них: 29 грамположительные компоненты клеточной стенки (*SrtA, AMT, PGPP, ggaA, EPCT, TagF, ggaB, DltB, DltD, ypfP, agH, tag, DltA, TuaF, TuaC, TuaB, TuaE, TuaG, TuaA1, TuaH, TuaA, TuaD, DltC1, DltB, DltD, LtaS-IIIa, LtaS-Ib, LtaS-Ia*); 26 – капсульные и внеклеточные полисахариды (*EpsD, EpsB, EpsC, Glt1, RfbB, RfbD, RfbA, RfbF, RfbC, Pod, Pgd, NeuB, NeuC, 1, rmlD, 2, 14, 3, UGE, 10*); 26 – DP-N-ацетилмурамат биосинтеза фруктозо-6-фосфата (*PGAM, AGIPUT, GAIPAT, UAGCVT*), муреингидролазы (*AmiA, DacD, MCPase*) и рециклинг аминокислот пептидогликана (*AmpD, LdcA*).

Защита, устойчивость и конкурентоспособность. Геном штамма 10-4 содержит 36 подсистем, обеспечивающих его защиту, устойчивость к стрессам и конкурентоспособность (рис. 9.2), из которых: 17 – устойчивость к антибиотикам, токсичным соединениям и тяжелым металлам (гомеостаз меди (*CopC, CopD, CIA*), эффлюксные насосы множественной лекарственной устойчивости (*MATE_all*), устойчивость к стрептотрицину (*SatA*), бета-лактамазе (*BLI*), фосфомицину (*FosB*), фторхинолонам (*gyrA, gyrB*), гидролиз желчи (*bsh*), устойчивость к кобальту-цинку-

кадмию (*TRMer*, *CZCR*); 7 – синтез бактериоцинов (рибосомально синтезируемых антибактериальных пептидов) и устойчивость к антибактериальным пептидам (включая ответ на стресс бацитрацином) (*BceB*, *LiaI*, *LiaG*, *LiaH*, *BceR*, *BceS*, *BceA*); 12 – инвазия и внутриклеточная устойчивость (*Rv1642*, *Rv1641*, *Rv1643*, *Rv0667*, *Rv0668*, *Rv1595*, *Rv1596*, *Rv1594*, *Rv0683*, *Rv0685*, *Rv0682*, *Rv0684*). Выявленные гены, гомологичные *Rv*-генам микобактерий, предположительно отвечают за проникновение бактерии в клетки растения, её внутриклеточную персистенцию и размножение. Эта способность к внутриклеточному существованию является ключевым признаком многих PGP-бактерий, позволяющим им колонизировать корни и эндосферу растения, устанавливать симбиоз и избегать внешних стрессов.

9.2.3. Гены биосинтеза вторичных метаболитов в геноме *B. subtilis* 10-4

Гены, связанные с антагонистической активностью (биоконтроль). *Bacillus* spp. продуцируют большое количество антимикробных метаболитов с различной химической структурой и разнообразием, таких как биопептиды и гидролитические ферменты, которые могут эффективно подавлять патогенные для растений микроорганизмы и способствовать росту растений (Senol et al., 2014; Iesewalter et al., 2021; Yang et al., 2023a). *Bacillus* spp. могут эффективно разрушать клеточные стенки патогенных грибов и бактерий, секретируя целлюлазы, липазы, хитиназы, глюканы и протеазы, тем самым подавляя рост патогенов (Yang et al., 2023; Ma et al., 2020). К примеру, *B. subtilis* TV-125A, продуцирующий хитиназу, эффективно подавлял активность *F. culmorum* (Tran et al., 2022). *B. cereus* CDHWZ7, демонстрирующий активность по деградации целлюлазы и несущий гены синтеза целлюлазы и хитиназы, проявлял ингибирующую активность в отношении *F. graminearum*, *F. acuminatum* и *F. oxysporum* (Yang et al., 2023a). *In-vitro* эксперименты с использованием чашек Петри с средой PDA показали, что *B. subtilis* 10-4 может значительно ингибировать рост фитопатогенных грибов *Fusarium* spp. (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*), *B. sorokiniana* и оомицета *Ph. infestans* (рис. S1–S3) (Lastochkina et al., 2020; 2020c; 2021b), снижать заболеваемость клубней картофеля фитофторозом и фузариозом (Lastochkina et al., 2020), растений сахарной свеклы альтернариозом посредством

регуляции в них активности гидролитических ферментов амилазы и протеазы (Ласточкина и др., 2018). Действительно, проведенный геномный анализ показал, что *B. subtilis* 10-4 обладает генами, кодирующими β -глюканазу (*bglS*), эндоглюканазу (*eglS*), протеазы (*clpX*, *lon*, *ycdP*, *yraA*, *gpr*, *gluP*, *prsW*, *htpX*, *wprA*, *bepA*, *aprX*) (рис. 9.2). Глюканазы гидролизуют гликозидные связи в глюканах, которые являются важным компонентом клеточных стенок патогенных грибов и участвуют в их росте и делении клеток. Клеточные стенки грибов также содержат хитин, целлюлозу, липиды и белки. Бактериальные ферменты, такие как целлюлазы, липазы и протеазы играют важную роль в лизисе грибных клеточных стенок при взаимодействии патогенов и бацилл, а высокая адаптивность ферментов способствует эффективному биоконтролю в нестабильных условиях (Iesewalter et al., 2021; Yan et al., 2011). Сообщалось, что большую роль в проявлении противогрибковых свойств различными штаммами *Bacillus* spp. играют вторичные метаболиты с антибиотическими свойствами, синтезируемые рибосомальным (бактериоцины, антибактериальные белки, хитиназа, β -1,3-глюканаза) и нерибосомальным путями (сурфактины, итурин, фенгицин, бациллен) (Malfanova et al., 2012; Wang et al., 2021). Среди метаболитов *B. subtilis* наиболее важными считаются циклические липопептиды сурфактин, итурин и фенгицин, которые оказывают мембранотропное действие на клетки-мишени фитопатогенов. Каждое семейство липопептидов (сурфактины, итурины, фенгицины) имеет характерные структурные особенности, основанные на природе и организации пептидного фрагмента или жирнокислотного хвоста. На сегодняшний день описано по меньшей мере 8 фенгицинов, 13 сурфактинов и 14 вариантов итуринов, продуцируемых *B. subtilis* (Malfanova et al., 2012; Iesewalter et al., 2021; Stein, 2005; Maksimov et al., 2020). Семейство сурфактинов, включающее такие соединения, как сурфактин, лихенизин, пумилацидин, галобацилин и бамилоцин, представляет собой гептапептиды, выделенные из бактерий *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. coagulans* (Miljković et al., 2020). Циклические липопептиды, особенно сурфактины, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, играют ключевую роль в образовании биопленок и колонизации корней растений, а также имеют решающее значение для биоконтрольной активности и ИСУ (Alvarez et al., 2011; Aleti et al., 2016). Сурфактины

не только обладают способностью ингибировать рост мицелиальных грибов, но также проявляют свойство синергизма с другими противогрибковыми липопептидами, а также проявляют такие свойства, как антибактериальные, противовирусные, противогрибковые, антимикоплазматическое и гемолитическую активности (Alvarez et al., 2011). Выявленная способность *B. subtilis* 10-4 эффективно колонизировать ткани растений (глава 3.5), подавлять развитие болезней растений (табл. 3.9, рис. 3.18б), улучшать доступность питательных веществ (рис. S10, табл. S2), очевидно, во многом реализуется благодаря синтезу липопептидов семейства сурфактинов (C13–C15), что было нами показано ранее с использованием среды MOLP и масс-спектрометрического метода анализа (Lastochkina et al., 2021b). *In silico* анализ полного генома *B. subtilis* 10-4 также подтвердил наличие генов (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*) (рис. 9.2), кодирующих продукцию субъединиц сурфактин-синтазы 1, 2, 3 (Iesewalter et al., 2021).

На следующем этапе работы был проведен поиск генных кластеров, вовлеченных в синтез вторичных метаболитов в геноме *B. subtilis* 10-4 с использованием онлайн-программного обеспечения antiSMASH bacterial v.7.1.0. (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) (Blin et al., 2019; 2023). Следует отметить, что аннотация геномов *Bacillus* spp. обеспечивает общий обзор биосинтетических кластеров генов, отвечающих за синтез вторичных метаболитов с антимикробной активностью, включая липопептиды. Обнаружено, что геном штамма 10-4 содержит такие генные кластеры как поликетидсинтазы типа III (ТЗПКС), нерибосомные пептид синтазы (НРПС), беталактоны, сактипептиды, рантипептиды (глицин-богатые пептиды), нерибосомные пептидные металлофоны (НП-металлофоны), транс ацилтрансферазные поликетидсинтазы (трансАТ-ПКС) и терпены (табл. 9.4). В частности, выявлено 6 регионов НРПС, кодирующих кластеры генов синтеза сурфактина, фенгицина, плипастатина, по 1 региону трансАТ-ПКС, ПКС (бациллен), рантипептидов (фактор подавления споруляции), НП-металлофонов (бациллобактин), беталактонов (фенгицин) и других метаболитов (бациллизин), по 2 региона ТЗПКС (1-карбапен-2-эм-3-карбоновая кислота, бациллен), сактипептидов (субтилозин А, фактор подавления споруляции). Обнаружено, что основными антимикробными соединениями *B. subtilis* 10-4, демонстрирующими высокое сходство (от 80 до 100%) с известными

биосинтетическими кластерами генов, предположительно синтезируемыми НРПС, являются: липопептиды сурфактин и фенгицин (сходство 82 и 80%), а также бациллибактин (сходство 100%); трансАТ-ПКС, ТЗПКС и ПКС-подобные: бациллен (сходство 100%); сактипептид: субтилозин А (сходство 100%); а также бацилизин (сходство 100%) (табл. 9.3). Сходство других биосинтетических кластеров варьировало от 46% для плипастатина до 13% для 1-карбапен-2-эм-3-карбоновой кислоты. Важно отметить, что анализ выявил уникальный и потенциально новый терпеновый биосинтетический кластер генов в регионе 9, не имеющий сходства ни с одним известным кластером в базе данных (табл. 9.3).

Таблица 9.3 – Выявленные регионы вторичных метаболитов в геноме штамма *B. subtilis* 10-4 с помощью anti-SMASH bacterial v.7.1.0

Регион	Тип кластера	Координаты		Наиболее похожий известный кластер биосинтеза вторичных метаболитов с антимикробными свойствами	Схожесть, %
		от	до		
1	ТЗПКС	858.006	899.103	1-карбапен-2-эм-3-карбоновая кислота	16
2	НРПС, беталактон	1	27.612	Фенгицин	80
3	трансАТ-ПКС, ТЗПКС, ПКС-подобные	93.522	208.312	Бациллен	100
4	Сактипептид	412.249	433.860	Субтилозин А	100
5	Другие	436.845	478.263	Бацилизин	100
6	Сактипептид, рантипептид	27.747	50.700	Фактор подавления споруляции	100
7	НРПС	181.512	246.903	Сурфактин	82
8	НП-металлофоны, НРПС	82.202	133.979	Бациллобактин	100
9	Терпены	67.005	88.903	не обнаружено	-
10	НРПС	1	14.356	Плипастатин, фенгицин	23 20
11	НРПС	1	9.446	Плипастатин, фенгицин	15 13
12	НРПС	1	7.967	Плипастатин, фенгицин	46 20

Примечание: НРПС – нерибосомная пептид синтетаз (NRPS, non-ribosomal peptide synthetase); ПКС – поликетид синтетаз (PKS, polyketide synthetase), ТЗПКС – поликетид синтетаз типа III (T3PKS, type III polyketide synthetase).

Более детальный анализ показал, что *B. subtilis* 10-4 содержит кластеры генов, которые включают гены, кодирующие ферменты, необходимые для синтеза фенгицина и пилипастатина (*ppsD*, *ppsE*, *ldeI*, *ldeJ*, *ldeHA*, *ldeF*, *ldeE*, *galU*, *ppsA*, *ppsC*) (рис. 9.4а); бациллена (*pksB*, *pksD*, *pksS*, *pksR*, *pksH*, *pksI*, *pksN*, *pksM*, *pksL*, *pksJ*, *pksG*, *pksF*, *fabD*, *aprX*, *acpK*, *miaB*, *kbl*, *tdh*, *pbpX*) (рис. 9.3б); субтилозина А (*sboA*, *narG*, *albA*, *albE*, *albF*) (рис. 4в); бацилизина (*bacD*, *bacC*, *bacG*, *bacF*, *ywhC*, *rocC*, *pruA*, *spsL*, *rfbD*, *rfbB*, *spsI*, *spsG*, *spsC*) (рис. 9.4г); сактипептида и рантипептида (фактор подавления споруляции) (*skfA*, *skfB*, *skfC*, *ybdG*) (рис. 9.4д); сурфактина (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*, *nasB*, *zinU*, *yckB*, *ycxD*, *tcyA*, *ubiX*, *yclE*) (рис. 9.4е); бациллобактина (*dhbA*, *dhbB*, *dhbC*, *dhbE*, *dhbF*, *pncA*, *bznD*, *ald*, *mbtH*, *besA*, *yumB*, *yumC*, *yutJ*) (рис. 9.4ж); терпенов (*sqhC*, *dhaS*) (рис. 9.4з).

Полученные данные свидетельствуют о том, что важный вклад в вызываемую эндофитом *B. subtilis* 10-4 устойчивость растений к фитопатогенным микроорганизмам помимо синтеза сурфактинов (табл. 9.3, рис. 9.4е), также вносит потенциальная способность к синтезу фенгицина и пилипастатина (*ppsA*, *ppsC*, *ppsD*, *ppsE*, *ldeI*, *ldeJ*, *ldeHA*, *ldeF*, *ldeE*, *galU*) (табл. 9.3, рис. 9.4а). Фенгицины, синтезируемые *B. subtilis* нерибосомальным путем, являются структурно стабильными и важными антибактериальными веществами. Как эффективные индукторы устойчивости растений против многих грибных патогенов, фенгицины действуют двумя способами: стимулируют защитные реакции растений; напрямую атакуют грибные клетки, разрушая их мембраны. К примеру, *B. amyloliquefaciens* FZB42, продуцирующий фенгицин, непосредственно разрушал целостность клеточных мембран грибов, что приводило к эффлюксу (оттоку) внутриклеточного содержимого и гибели патогена (Hanif et al., 2019). Фенгицин, продуцируемый *B. subtilis* Z-14, вызывал разрушение внутренней структуры клеток патогена и приводил к подавлению роста и деформации мицелия (Xiao et al., 2021). У *B. velezensis* BA-26, проявляющего антимикробные свойства в отношении *Botrytis cinerea*, было выявлено наличие генов синтеза фенгицина и итурина (Wang et al., 2021). Семейство итуринов (итурин, бацилломицины D, F, L, микосубтилин и мохавенсин) также обладают противомикробной активностью. Однако, в геноме штамма 10-4 генов синтеза итурина не было обнаружено, как и других нерибосомных липопептидов (включая курстакины, бацитрацины, полимиксины, грамицидины и тирокидины), продуцируемых *Bacillus* spp. (Wang et al., 2021).

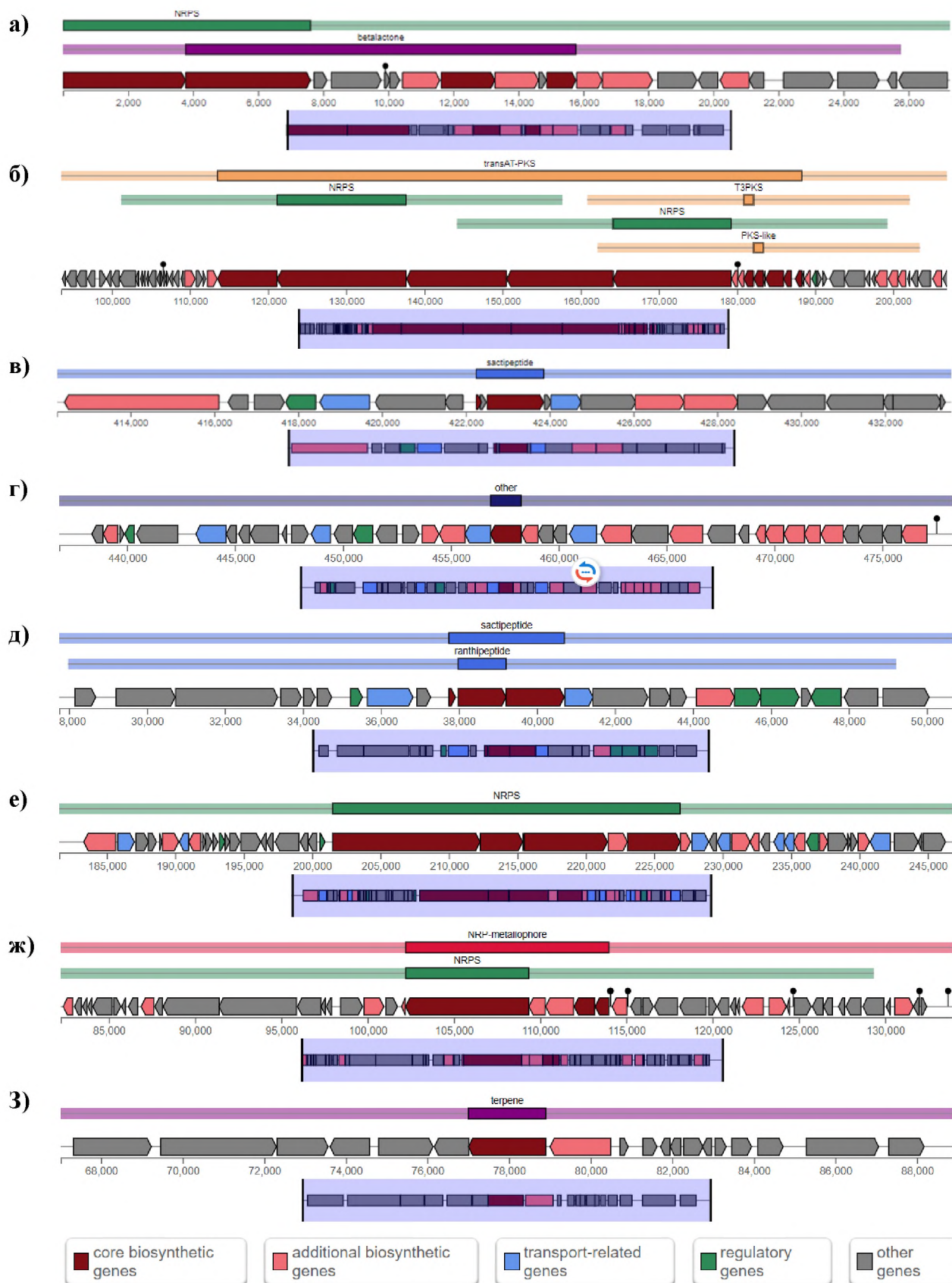


Рис. 9.4. Потенциальные кластеры генов, кодирующие вторичные метаболиты в геноме штамма *B. subtilis* 10-4. Категории кластеров были проанализированы в antiSMASH bacterial версии v.7.1.0. Кластеры генов, кодирующие гены синтеза фенглицина (а), бациллена (б), субтилозина А (в), бацилизина (г), сактипептида и рантипептида (фактор подавления споруляции) (д), сурфактина (е), бациллобактина (ж) и терпенов (з)

Вместе с тем, выявлено, что *B. subtilis* 10-4 кодирует необычную гибридную поликетидно-нерибосомальную пептидсинтазу, которая связана с продукцией антибиотика бациллена. В частности, у штамма 10-4 выявлены такие гены синтеза бациллена, как *pksB*, *pksS*, *pksD*, *pksJ*, *pksI*, *pksG*, *pksR*, *pksN*, *pksL*, *pksM*, *pksF*, *pksH*, *fabD*, *aprX*, *acpK*, *miaB*, *kbl*, *tdh* и *pbpX* (рис. 9.4б). Первоначально бациллен был открыт как бактериостатический агент, продуцируемый *B. subtilis*, ингибирующий синтез белка прокариот, но не эукариот, по неизвестному механизму (Patel et al., 1995). Хотя биологическая активность бациллена еще до конца не раскрыта, анализ генетических и метаболических ресурсов, необходимых для его синтеза, указывает на важную роль этого соединения в живых организмах. Кластер генов *pks* кодирует ферменты поликетидного синтазного комплекса и включает гены различных доменов и субъединиц, необходимых для сборки и модификации поликетидов. Ген *pksI* кодирует эноил-КоА изомеразу, которая катализирует изомеризацию эноил-КоА в более стабильную форму, что необходимо для дальнейших стадий синтеза поликетидов. Ген *pksF* кодирует фермент, который играет ключевую роль в поликетидном синтезе, катализируя декарбоксилирование малонил-АСР с образованием активного малонила-АСР, который используется для последующей сборки поликетидной цепи. НРПС и ПКС являются модульными ферментными комплексами, состоящими из нескольких функциональных доменов, а гены, кодирующие эти ферменты, часто расположены в геноме в той же последовательности, что и порядок доменов в белковом продукте. Благодаря этим особенностям, иногда возможно использовать биоинформатический анализ для предсказания структуры конечного продукта, синтезируемого этими ферментными комплексами (Lautru et al., 2005; McAlpine et al., 2005). Бацилленсинтаза состоит из 13 модулей ПКС и 3 модулей НРПС. Поскольку в отличие от типичных ПКС в структуре бацилленсинтазы отсутствуют домены ацилтрансферазы (АТ), она становится еще одним представителем класса ПКС, в которых мономеры вводятся в растущую поликетидную цепь посредством автономных АТ-доменов (Wenzel, Muller, 2005). Бацилленсинтаза уникальна даже среди транс-АТ-синтаз, поскольку она кодирует три автономных АТ-домена (*pksCDE*), один из которых слит с предсказанной флавинмонопнуклеотид-зависимой оксидоредуктазой (*pksE*). Кодированная геном *pksC*

малонил-КоА-специфичная АТ использует ацил-переносящий белок (кодируемый геном *acpK*) в качестве субстрата для домена тиолирования (Т-домена) (Calderone et al., 2006). Однако, неизвестно, взаимодействует ли фермент *pksC* с другими Т-доменами в составе ПКС, кодируемой геном *pksX*. Кроме того, гены *pksD* и *pksE* еще не были достаточно исследованы и их точная роль пока неясна. Кластер генов *pksL* отвечает за кодирование фермента PksL, который является частью поликетидного синтазного комплекса и играет роль в синтезе поликетидов, катализируя последовательную конденсацию и модификацию малых органических молекул (мономеров). Поликетиды, синтезируемые в растениях, могут иметь разнообразные функции, включая защиту от вредителей, привлечение опылителей, участие в сигнальных путях и других биологических процессах. Конкретные продукты синтеза поликетидов зависят от типа растения и условий его выращивания (Iesewalter et al., 2021).

У штамма 10-4 обнаружены гены, ассоциированные с синтезом бацилизина (*bacC*, *bacD*, *bacF*, *bacG*) (табл. 9.3, рис. 9.4г). Бацилизин, дипептид массой 270 Да [L-аланил-(2,3-эпоксциклогексанон-4)-L-аланин], состоит из L-аланина и непротеиногенной аминокислоты L-антикапсина. Однако, несмотря на свою простую структуру, он характеризуется широким спектром антагонистической активности против грибов и бактерий. Бацилизин индуцирует лизис микробной клеточной стенки путем ингибирования глюкозамин-6-фосфатсинтазы и, следовательно, биосинтеза маннопротеина или пептидогликана в грибах и бактериях соответственно. Также известно, что бацилизин термостабилен и остается активным в широком диапазоне pH (от 1.4 до 12.0) (Nannan et al., 2021). Ген *bacC* кодирует фермент, который катализирует превращение префената в антикапсин – ключевой предшественник бацилизина, в то время как ген *bacD* кодирует лигазу L-аминокислот, катализирующую образование амидной связи между остатками аланина и антикапсина, завершая синтез молекулы бацилизина. Несмотря на то, что бацилизин был открыт еще в 1946 г. и возможности его различного применения, мало что известно о распределении генетических детерминант внутри группы *B. subtilis* (Iesewalter et al., 2021; Nannan et al., 2021).

Кроме того, выявлено, что *B. subtilis* 10-4 может продуцировать пептидный фактор подавления споруляции (*skfA*), который индуцирует лизис и разрушение клеток

патогенов на стадии роста мицелия и споруляции (Iesewalter et al., 2021), а также предсказана способность синтезировать субтилозин А (*sboA*, *narG*, *albA*, *albE*, *albF*) (табл. 9.3, рис. 9.4). Первоначально субтилозин был выделен из *B. subtilis* в 1985 г. (Babasaki et al., 1985). Ген *sboA* кодирует предшественник субтилизин-подобного бактериального онтогенетического белка (SboA), который состоит из 43 аминокислот, посттрансляционно модифицирующихся с образованием циклического пептида. Механизм действия субтилозина был продемонстрирован *in vitro* (Thennarasu et al., 2005). Из-за своей гидрофобной природы субтилозин взаимодействует с гидрофобным ядром фосфолипидного бислоя клеточной мембраны клетки-мишени. Отрицательно заряженная часть пептида, подвергаясь воздействию окружающей среды, взаимодействует с мембранными рецепторами. Остаток триптофана в положении 34 внедряется в клеточную мембрану, что приводит к изменению конформации фосфолипидов и к их дестабилизации. Подобно бактериоцинам субтилину, эпидермину и галлидермину, субтилозин образует поры посредством специфических взаимодействий с клеточной мембраной (Thennarasu et al., 2005). В геноме штамма 10-4 также выявлены гены *dhbA*, *dhbB*, *dhbC*, *dhbE* и *dhbF*, кодирующие синтез бациллобактина (табл. 9.3, рис. 9.4ж) – сидерофора, который хелатирует Fe^{3+} в почве и ризосфере, лишая патогенные бактерии возможности получать достаточное количество ионов железа и, таким образом, подавляя их рост и размножение (Dimoroulou et al., 2021). Обнаруженные в геноме штамма 10-4 гены *sqhC* и *dhaS*, ответственные за синтез терпенов (рис. 9.4з), не проявили сходства с известными кластерами (табл. 9.3). Хотя антимикробный механизм действия терпенов остается в значительной степени неизвестным, большинство из них способны ингибировать два важнейших процесса, необходимых для выживания микробов: поглощение кислорода и окислительное фосфорилирование (Griffin et al., 1999; Zengin, Baysal, 2014).

Таким образом, результаты анализа свидетельствуют о том, что в проявлении защитного эффекта *B. subtilis* 10-4 против фитопатогенных микроорганизмов, основную роль играют такие вторичные метаболиты с антимикробными свойствами как сурфактин, фенгидин, бациллобактин, бациллен, субтилозин А и бацилизин, а также вносят вклад плипастатин, рантипептиды и терпены. Важно отметить, что

бактериальные терпены, помимо антифунгальной активности, играют роль (прямо и косвенно) в регуляции роста и устойчивости растений. Например, некоторые терпены взаимодействуют с рецепторами растений, запуская сигнальные пути, связанные с делением клеток; усиливают секрецию органических кислот бактериями, что повышает доступность фосфора в почве; связывание ионов железа и цинка терпенами облегчает их усвоение корнями. Терпены служат хемоаттрактантами для полезных бактерий и грибов (например, микоризы), формируя защитный микробиом вокруг корней; участвуют в формировании бактериальных биопленок на корнях, что повышает устойчивость растений к абиотическим стрессам. Бактериальные терпены играют многогранную роль в стимуляции роста растений, сочетая прямую регуляцию метаболизма, защиту от стрессов и улучшение почвенных условий.

Анализ устойчивости к противомикробным препаратам с использованием комплексной базы данных CARD показал, что у штамма *B. subtilis* 10-4 присутствуют гены, ассоциированные с механизмами устойчивости к антибиотикам. Среди них были обнаружены гены, кодирующие фосфомицинтиолтрансферазу (*FosBx1*), аминогликозидную нуклеотидилтрансферазу (*aadK*) и макролидфосфотransферазу (*mphK*). Эти ферменты обеспечивают устойчивость к антибиотикам группы производных фосфоновой кислоты, аминогликозидам и макролидам соответственно, путем их инактивации (табл. 9.4). Наличие семейства генов β -лактамазы у *B. cereus* Вс класса А (ВсIII), ответственных за устойчивость к цефалоспориному и пенему (ненасыщенным β -лактамным антибиотикам) через механизм инактивации, также было предсказано в геноме штамма 10-4. Выявлено присутствие генов *vanT*, *vanY*, *vanW*, кодирующих гликопептидные белки устойчивости к антибиотикам, действующие через механизм изменения мишени антибиотика. Ген *tmrB*, кодирует белок, который снижает проницаемость клетки для туникамицина, тем самым обеспечивая устойчивость к этому антибиотику. Белки, кодируемые геном *vmlR*, обеспечивают множественную устойчивость путем защиты рибосомной мишени от связывания с различными классами антибиотиков, включая линкозамиды, стрептограмины, плеуромутилины, нуклеозидные антибиотики (Alcock et al., 2023).

Таблица 9.4 – Семейства генов антимикробной устойчивости (AMR, Antimicrobial Resistance), предсказанные у штамма *B. subtilis* 10-4

Термин ARO	Семейства генов AMR	Класс лекарств	Механизм устойчивости
aadK	ANT(6)	Аминогликозидный АБ	Инактивация АБ
FosBx1	Фосфомицинтиолтрансфераза	АБ фосфоновой кислоты	Инактивация АБ
vanT ген в кластере vanG	<i>vanT</i> , кластер генов устойчивости к гликопептидам	Гликопептидный АБ	Изменение мишени АБ
qacJ	SMR	ДСА	Эффлюкс АБ
qacJ	SMR	ДСА	Эффлюкс АБ
ykkD	SMR	Аминогликозидный, тетрациклиновый, фениколовый АБ	Эффлюкс АБ
ykkC	SMR	Аминогликозидный, тетрациклиновый, фениколовый АБ	Эффлюкс АБ
qacG	SMR	ДСА	Эффлюкс АБ
qacJ	SMR	ДСА	Эффлюкс АБ
mphK	Макролидфосфотрансфераза	Макролидный АБ	Инактивация АБ
tmrB	Устойчивый к туникамицину белок	Нуклеозидный АБ	Сниженная проницаемость для АБ
vanT ген в кластере vanG	<i>vanT</i> , кластер генов устойчивости к гликопептидам	Гликопептидный АБ	Изменение мишени АБ
vmlR	Разнообразные АТФ-связывающие кассетные белки подсемейства ABC-F, обеспечивающие защиту рибосом	Стрептограминовые антибиотики А и В, стрептограминовый, линкозамидный, нуклеозидный, плевомутилиновый АБ	Защита мишеней от АБ
tet(45)	MFS	Тетрациклиновый АБ	Эффлюкс АБ
vanY ген в кластере vanM	<i>vanY</i> , кластер генов устойчивости к гликопептидам	Гликопептидный АБ	Изменение мишени АБ
BcI	бета-лактамаза класса А <i>Bacillus cereus</i> Bc	Цефалоспорин, пенем	Инактивация АБ
vanW ген в кластере vanI	<i>vanW</i> , кластер генов устойчивости к гликопептидам	Гликопептидный АБ	Изменение мишени АБ

Примечание: ДСА – дезинфицирующие средства и антисептики; АБ – антибиотик; SMR – small multidrug resistance antibiotic efflux pump; MFS – major facilitator superfamily antibiotic efflux pump.

Предсказано наличие генов (*qacJ*, *qacG*, *ykkD*, *YKKCC*, *tet(45)*), обеспечивающих устойчивость бактерий к дезинфицирующим средствам/антисептикам, аминогликозидным, тетрациклиновым, фениколовым и тетрациклиновым

антибиотикам (АБ) посредством активного их выведения (эффлюкса) из клетки (табл. 9.4). Бактерии используют специальные транспортные системы (эффлюксные насосы) для выкачивания АБ из своей внутренней среды, тем самым снижая их внутриклеточные концентрации до безопасного для бактерии уровня (Alcock et al., 2023).

Совокупность полученных результатов указывает на способность *B. subtilis* 10-4 подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов *in vitro* (рис. 3.1, рис. S1-S3) и *in planta* (рис. 3.18, табл. 3.9) и оказывать пролонгированное защитное воздействие на растения путем синтеза вторичных метаболитов с антимикробной активностью (поликетиды типа III, нерибосомные пептид-синтетазы, беталактоны, сактипептиды, рантипептиды, нерибосомные пептидные металлофоны, трансАТ-ПКС и терпены). Среди метаболитов с антимикробной активностью следует отметить липопептиды сурфактин, фенгицин, бациллен, субтилозин А и бациллобактин, в также широкий спектр генов, отвечающих за антимикробную устойчивость с разными механизмами действия, включая инактивацию, эффлюкс, изменение мишени антибиотиков. Выявленное разнообразие механизмов устойчивости у *B. subtilis* 10-4, а также наличие генов резистентности к различным классам АБ и дезинфектантов, свидетельствует о мощном арсенале средств, которые этот штамм может задействовать для подавления патогенов и повышения устойчивости растений к болезням.

В целом, результаты анализа генома *B. subtilis* 10-4, проявляющего ростстимулирующее и антистрессовое действие на растения в стрессовых условиях среды, позволили установить молекулярно-генетические основы этих свойств. В то время как тесты *in vitro* и *in planta* позволяют выявлять общие механизмы PGP-бактерий, то секвенирование их генома в сочетании с биоинформатическим анализом – быстро идентифицировать гораздо более широкий спектр молекулярных механизмов опосредованной ими стимуляции роста и стресс-устойчивости растений. Выявленные генетические детерминанты объясняют не только лабораторно документированные физиолого-биохимические сдвиги, но и прикладные эффекты – повышение урожайности и качества зерна и в полевых условиях (главы 3–8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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, приводя к значительным потерям урожая/качества продукции (FAO, 2022; Asseng et al., 2019; Zandalinas et al., 2022). Растения развивают широкий спектр защитно-приспособительных механизмов, но их оказывается недостаточно для противодействия стрессам в условиях глобального изменения климата (Ahmad et al., 2018; Farooqi et al., 2020). Биоинокулянты на основе эндофитных PGP-бактерий *B. subtilis* представляют перспективный природный ресурс для повышения стресс-устойчивости растений (Velloso et al., 2021; Chukwudi et al., 2025). Однако их применение ограничивается нестабильностью действия, обусловленной пробелами в понимании механизмов взаимодействия в системе «растение-микроорганизм» в стрессовых условиях, включая видо- и сортоспецифичность, влияние на пролонгированную адаптацию к комбинированным стрессам и формирование качества продукции, а также разрыв между фенотипическими проявлениями и генетическим потенциалом бактерий. Познавание естественных механизмов защиты к стрессовым воздействиям, лежащих в основе опосредованной эндофитными PGP-бактериями устойчивости растений, является одной из интригующих проблем физиологов.

Как показали результаты диссертационного исследования, 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. Общие (универсальные) защитные реакции инокулированных растений в стрессовых условиях обусловлены эффективной колонизацией растений, снижением уровня ПОЛ, регуляцией уровня пролина и поддержанием повышенной фотосинтетической активности, что отражается в улучшении интегральных показателей роста и продукционных параметров.

Хотя в литературе сообщалось о сопоставлении 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), сведения по сходствам и различиям действия эндофитов на растения пшеницы с различными стратегиями адаптации к засухе отсутствовали к моменту начала нашей работы, а данные о сигнальных путях, запускаемых ими при стрессах (и их комбинациях), носили фрагментарный характер. Установлено, что 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.

Известно, что СК является ключевым сигналом для защиты растений от биотрофных патогенов, однако, многие PGP-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. Кроме того, СК может 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. 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 с контрастными стратегиями засухоустойчивости.

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). Полученные нами приоритетные данные указывают на то, 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. Выявленное 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. Ранее сообщалось, что быстрое накопление ГАМК в тканях растений, подверженных стрессам, способствует повышению их устойчивости, обеспечивая критическую связь в цепи событий, ведущих от восприятия стрессов окружающей среды к своевременным физиологическим реакциям (Kinnersle, Turano, 2000; Seifikalhor et al., 2019). Помимо сигнальной функции ГАМК может принимать участие в поддержании осмотического и окислительного статуса растений через координацию накопления осмолитов (пролин) (Kolupaev et al., 2023) и регуляцию работы устьиц (Mekonnen et al., 2016; Hasan et al., 2021).

Итак, 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.

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). Проведенный нами 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-моноизолят», но и в условиях комплексных микробных сообществ. Дальнейшее изучение эндофитных штаммов *B. subtilis* в контексте холобионта, включая их взаимодействие с ризосферными микроконсорциумами 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 ростстимулирующих и антистрессовых свойств эндوفита 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 ацетоин, 2,3-бутандиол); (г) биоконтролем (NRPS-кластеры бацилизина, бациллаена, субтилозина А, бациллибактина, сурфактина, фенгицина, плипастагина, 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..

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Аллагулова Ч.Р., Плотников А.А., Ласточкина О.В. Анализ засухоустойчивости различающихся по стратегии адаптации к засухе растений пшеницы *Triticum aestivum* L. на начальном этапе онтогенеза // Сельскохозяйственная биология. 2024. Т. 59. № 1. С. 131–141.
- Андрианова Ю.Е., Тарчевский И.А. Хлорофилл и продуктивность растений. Изд-во Наука, 2000.
- Благова Д. К., Сарварова Е. Р., Хайруллин Р. М. Выделение и характеристика бактериальных эндофитов моркови (*Daucus carota* L. var. *sativus*) // Вест. Оренб. гос. ун-та. 2014. № 13(174). С. 10–12.
- Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. 2019. Т. 17(1). С. 19–32.
- Ведров Н.Г., Халипский А.Н. Изменение элементов структуры урожая и хозяйственно-биологических показателей в результате сортосмесей яровой пшеницы в Красноярском крае // Вест. Краснояр. гос. аграрн. ун-та. 2012. № 4. 89.
- Веселов Д.С., Кадиков Р.К., Мигранов Р.Р., Баимова Г.М. Концентрация осмотически активных веществ в листьях растений мягкой яровой пшеницы в засушливых условиях Южного Предуралья // Изв. УфНЦ РАН. 2013. № 3. С. 75–78.
- Галиева Г.Ш., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Растительный микробиом: происхождение, состав и функции // Уч. зап. Каз. ун-та. Серия Естественные науки. 2023. Т. 165(2). С. 231–262.
- Гарипова С.Р. Перспективы использования эндофитных бактерий в биоремедиации почв агроэкосистем от пестицидов и других ксенобиотиков // Усп. совр. биол. 2014. Т. 134. №1. С. 35–47.
- Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М.: Наука. 1982. 280 с.
- Грошева Е.В. Влияние аборигенных штаммов *Bacillus subtilis* на микробоценоз чернозема выщелоченного и продуктивность сахарной свеклы // автореферат дис... канд. с.-х. наук / ЕВ Грошева. Рамонь. 2009.

- Головко Т.К., Даллакян М.В., Прасолова М.Ф. Фотосинтетический аппарат растений при стрессе: реакция и адаптация // Физиология растений. 2023. Т. 70. № 3. С. 227–241.
- ГОСТ 33777-2016. Метод определения фитотоксичности на семенах высших растений. М.: Стандартиформ, 2017.
- ГОСТ 13496.4-93. Методы определения азота и сырого белка. Изд-во Стандартов, 1993.
- ГОСТ 26657-97. Методы определения содержания фосфора. Изд-во Стандартов, 1997.
- ГОСТ 30504-97. Пламенно-фотометрический метод определения содержания калия. Изд-во Стандартов, 1997.
- ГОСТ 55569-2013. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза. Изд-во Стандартов, 2015.
- ГОСТ 56372-2015. Определение массовой доли железа, марганца, цинка, кобальта, меди, молибдена и селена методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Изд-во Стандартов, 2016.
- Доспехов М.Б. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1979. 416 с.
- Жуковский П.М. Пшеница в СССР. М.: Сельхозгиз, 1957. 632 с.
- Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (экологогенетические основы): В 2 т. М.: Изд-во РУДН, 2001. Т. 1. 780 с; Т. 2. 785 с.
- Жученко А.А. Адаптивная стратегия устойчивого развития сельского хозяйства России в XXI столетии (эколого-генетические основы). Теория и практика. М.: Агрорус, 2010. 1053 с.
- Завалин А.А., Алферов А.А., Чернова Л.С. Ассоциативная азотфиксация и практика применения биопрепаратов в посевах сельскохозяйственных культур // Агрохимия. 2019. № 8. С. 83–96.
- Зимин А.К., Сердалин М.К., Лопарёв М.О. Изменение физиологического состояния растения пшеница под влиянием засухи // Теории, школы и концепции устойчив. разв. науки. 2022. С. 96.
- Зыкин В.А., Кираев Р.С. Экологически устойчивые сорта яровой мягкой пшеницы Салават Юлаев и Ватан // Вест. Алт. гос. агр. ун-та. 2011. Т. 82. № 8. С. 5–8.

- Кадырова Г.Х., Садуллаева М.С., Атаджанова Ш.Ш. Закирьяева С.И. Фосфат-солюбилизирующая активность ризобактерий пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Микробиология. 2022. Т. 12(102). С. 22–27.
- Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Галимзянова Н.Ф., Архипова Т.Н., Рябова А.С., Актуганов Г.Е., Сидорова Л.В., Кудоярова Г.Р., Мелентьев А.И. Характеристика нового ростостимулирующего штамма *Advenella kashmirensis* IB-K1 и оценка эффективности его применения в условиях засоления почвы // Микробиология. 2022. Т. 91. № 2. С. 204–216.
- Калинкина Л.Г. Накопление пролина в клетках морской и пресноводной хлореллы в зависимости от концентрации NaCl в среде и интенсивности роста водорослей // Физиол. растений. 1985. Т. 32. С. 42–52.
- Карпец Ю.В., Веденеева М.Л. Изменение содержания фотосинтетических пигментов у представителей рода *Triticum* L. в условиях засухи // Аграрный вестник Урала. 2022. № 05 (220). С. 2–10.
- Курамшина З.М., Смирнов, Ю.В., Хайруллин Р.М. Повышение толерантности *Triticum aestivum* к кадмий-стрессу с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // Физиол. растений. 2016. Т. 63. № 5. С. 679–687.
- Курамшина З.М., Хайруллин Р.М., Смирнова Ю.В. Сортовая отзывчивость *Triticum aestivum* L. на инокуляцию клетками эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // Росс. сельскохозяй. наука. 2019. Т. 6. С. 3–6.
- Лапина Л.П., Строгонов Б.П. Локализация солей в клетках в связи с приспособлением растений к условиям засоления // Успехи совр. биологии. 1979. Т. 88. Вып. 1(4). С. 93–107.
- Ласточкина О.В., Юлдашев Р.А., Пусенкова Л.И. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* 26Д на засухоустойчивость растений яровой мягкой пшеницы сортов лесостепного западносибирского и степного волжского экотипов на начальных этапах онтогенеза // Изв. УфНЦ РАН. 2017. №3(1). С. 99–102.
- Ласточкина О.В., Пусенкова Л.И., Юлдашев Р.А., Ильясова Е.Ю., Алиниэфард С. Физиолого-биохимические ответы растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.),

- зараженных грибом *Alternaria alternata*, на применение микробных препаратов на основе *Bacillus subtilis* // Сельскохозяйств. биология. 2018. Т. 53. № 5. С. 958–968.
- Ласточкина О.В. Адаптация и устойчивость растений пшеницы к засухе, опосредованная природными регуляторами роста *Bacillus* spp.: механизмы реализации и практическая значимость (обзор) // Сельскохозяйств. биология. 2021. Т. 56. № 5. С. 843–867.
- Ласточкина О.В., Гарипова С.Р., Пусенкова Л.И., Гаршина Д.Ю., Баймиев Ан.Х., Коряков И.С. Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на рост проростков и лигнификацию корней *Pisum sativum* L. в норме и в условиях натрий-хлоридного засоления // Физиол. растений. 2023. Т. 70. № 5. С. 514–525.
- Ласточкина О.В., Аллагулова Ч.Р. Механизмы рост-стимулирующего и защитного действия эндофитных RGP-бактерий в растениях пшеницы при воздействии засухи (обзор) // Прикл. биохим. микробиол. 2023а. Т. 59. № 1. С. 17–37.
- Максимов И.В., Максимова Т.И., Сарварова Е.Р., Благова Д.К. Эндофитные бактерии как агенты для биопестицидов нового поколения (обзор) // Прикл. биохим. микробиол. 2018. Т. 54(2). С. 134–148.
- Максимов И.В., Синг Б.П., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Хайруллин Р.М. Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) // Прикл. биохим. микробиол. 2020. Т. 56. № 1. С. 19–54.
- Маркова О.В., Гарипова С.Р., Пусенкова Л.И. Сорт-штаммовая специфичность взаимодействия *Bacillus subtilis* с растениями *Phaseolus vulgaris* L. при солевом стрессе // Изв. вузов. Прикл. хим. биотехн. 2023. Т. 13. № 3(46). С. 350–358.
- Масленникова Д.Р., Плотников А.А., Шакирова Ф.М. Сравнительный анализ физиологического действия оксида азота и 6-бензиламинопурина на состояние компонентов глутатионового комплекса в корнях проростков пшеницы// Агрохимия. 2019. Т. 3. 37.
- Мокроносова А.Т. Малый практикум по физиологии растений. МГУ: Москва, 1994. 184 с.
- Методика М 04-92-2020. Пищевые продукты, продовольственное сырье, пищевые и кормовые добавки. Методика измерений массовой доли фруктозы, глюкозы,

- лактозы и сахарозы методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза "Капель". 2020.
- Мухитов Л.А., Самуилов Ф.Д. Засухоустойчивость разных экотипов яровой мягкой пшеницы в лесостепи Оренбургского Предуралья // Вест. Каз. гос. аграрн. ун-та. 2007. Т. 2. № 1(5). С. 57–59.
- Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии (Практический курс по микробиологии). Изд-во Центр Академия: Москва, 2005. 608 с.
- Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. Изд-во Колос: Москва, 1976. 256 с.
- Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Юлдашев Р.А. Эффективность инокуляции яровой пшеницы эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д // Пробл. агрохим. экол. 2020. № 3. С. 56–64.
- Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Валиева В.А., Чистоедова А.В., Матюнина В.Д. Предпосадочная инокуляция эндофитами как способ управления семенной продуктивностью и качеством оздоровленных клубней картофеля // Агрохим. Вест. 2024. №5. С.78–86.
- Пусенкова Л.И., Ласточкина О.В. Повышение урожайности и качества клубней картофеля путем предпосадочной инокуляции оздоровленных гидропонных миниклубней эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* // Известия ВУЗов. Прикл. хим. биотехн. 2025. Т. 15. № 1(52). С. 6–16.
- Румянцев С.Д., Алексеев В.Ю., Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Максимов И.В., Веселова С.В. Поиск перспективных эндофитных липопептид-синтезирующих бактерий *Bacillus* spp. для защиты растений пшеницы от обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum*) // Вавил. журн. генет. селекц. 2024. Т. 28. №3. С. 276–287.
- Скворцова И.Н. Идентификация почвенных бактерий рода *Bacillus*. М.: Изд-во МГУ, 1984. 26 с.
- Соколова Т.Н., Карташов В.Р. Техническая биохимия. НГТУ им. Р.Е. Алексеева: Нижний Новгород, 2012. 170 с.

- Соловых А.А., Каплин В.Г. Влияние мезоформ рельефа и предпосевной обработки семян на пораженность корневыми гнилями, развитие и урожайность яровой пшеницы в степи Оренбургского Предуралья // Извест. Сам. НЦ РАН. 2012. Т. 14. № 5. С. 245–252.
- Сырова Д.С., Шапошников А.И., Юзихин О.С., Белимов А.А. Деструкция и трансформация фитогормонов микроорганизмами // Прикл. Биохим. Микробиол. 2022. Т. 58. № 1. С. 3–22.
- Темердашев З.А., Фролова Н.А., Колычев И.А. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях методом обращено-фазовой ВЭЖХ // Журнал аналит. химии. 2011. № 66. С. 417–424.
- Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. клонирование и характеристика индолил3-пируватдекарбоксилазы из *Methylobacterium extorquens* AM1 // Биохимия. 2010. Т. 75. № 12. С. 1651–1661.
- Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. М.: Наука, 1979. 155 с.
- Хайруллин Р.М., Недорезков В.Д., Мубинов И.Г., Захарова Р.Ш. Повышение устойчивости пшеницы к абиотическим стрессам эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* // Вест. Оренбург. гос. ун-та. 2007. № 2. С. 129–134.
- Хайруллин Р.М. Об истории уфимской научной школы эндофитологов // Биомика. 2023. Т. 15. № 4. С. 224–252.
- Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 1997. 800 с.
- Чеботарь В.К., Макарова Н.М., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 продуцента биопрепаратов // Прикл. биохим. микробиол. 2009. Т. 45(4). С. 465–469.
- Чеботарь В.К., Заплаткин А.Н., Щербаков А.В., Мальфанова Н.В., Старцева А.А., Костин Я.В. Микробные препараты на основе эндофитных и ризобактерий, которые перспективны для повышения продуктивности и эффективности использования минеральных удобрений у ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и овощных культур // Сельскохозяй. биол. 2016. Т. 51(3) С. 335–342.

- Четина О.А., Еремченко О.З., Боталова Е.И., Серeda А.М. Изменение в содержании пролина в растениях при воздействии NaCl-засоления и щелочности корневой среды // Совр. Пробл. Науки Образ. 2016. Т. 6. С. 582.
- Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Изд-во "Гилем", 2001. 160 с.
- Шапошников А.В., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2011. №3. С. 16–22.
- Шарипова М.Р., Марданова А.М., Рудакова Н.Л., Пудова Д.С. Бистабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации *Bacillus subtilis* в стационарной фазе // Микробиология. 2021. Т. 90. № 1. С. 24–42.
- Щербakov А.В., Заплаткин А.Н., Чеботарь В.К. Эндофитные бактерии, населяющие семена пшеницы, перспективные продуценты микробных препаратов для сельского хозяйства // Достижения науки и техники АПК. 2013. №7. С. 35–38.
- Щукин В.Б., Громов А.А. Практикум по физиологии растений 2-е изд. Оренбург: Изд-во Оренб. ГАУ, 2008. 176 с.
- Цыганков В.И. Создание адаптивных сортов яровой пшеницы для условий сухостепных зон Казахстана // Изв. Оренб. гос. аграрн. ун-та. 2011. Т. 2. №. 30-1. С. 46–50.
- Удовенко Г.В. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Методическое руководство. ВИР: Ленинград, 1988. 227 с.
- Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Изд-во МГУ, 1986. 136 с.
- Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: ГЕОС, 2007.
- Abd Allah E.F., Alqarawi A.A., Hashem A., Radhakrishnan R., Al-Huqail A.A., Al-Otibi F.O.N., Egamberdieva D. Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms // J. Plant Interact. 2017. V. 13(1). P. 37–44.
- Abd El-Daim I.A., Bejai S., Meijer J. Improved heat stress tolerance of wheat seedlings by bacterial seed treatment // Plant Soil. 2014. V. 379. P. 337–350.

- Abd El-Daim I.A., Bejai S., Meijer J. *Bacillus velezensis* 5113 induced metabolic and molecular reprogramming during abiotic stress tolerance in wheat // Sci. Rep. 2019. V. 9. 16282.
- Abd-El salam H.E., El-Hanafy A.A. Lignin biodegradation with ligninolytic bacterial strain and comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolated from Egyptian soil // American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 2009. V. 5(1). P. 39–44.
- Abriouel H., Franz C.M.A.P., Omar N.B., Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins* // FEMS Microbiol. Rev. 2011. V. 35. P. 201–232.
- Acuña-Rodríguez I.S., Ballesteros G.I., Atala C., Gundel P.E., Molina-Montenegro M.A. Hardening blueberry plants to face drought and cold events by the application of fungal endophytes // Agronomy. 2022. V. 12. 1000.
- Aebi H. Catalase in vitro // Meth. Enzymol. 1984. V. 105. P. 121–126.
- Afzal I., Shinwari Z.K., Sikandar S., Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants // Microbiol. Res. 2019. V. 221. P. 36–49.
- Ahmad Z., Waraich E.A., Akhtar S., Anjum S., Ahmad T., Mahboob W., Hafeez O.B.A., Tapera T., Labuschagne M., Rizwan M. Physiological responses of wheat to drought stress and its mitigation approaches // Acta Physiol. Plant. 2018. V. 40. P. 80.
- Akhtyamova Z., Martynenko E., Arkhipova T., Seldimirova O., Galin I., Belimov A., Vysotskaya L., Kudoyarova G. Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on the formation of apoplastic barriers and uptake of water and potassium by wheat plants // Microorganisms. 2023. V. 11(5). 1227.
- Akhtyamova Z., Arkhipova T., Sharipova G., Ivanov R., Nuzhnaya T., Kudoyarova G., Veselov D. The effect of plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* IB-22 on the hydraulic conductivity and abundance of PIP2 aquaporins in the roots of an abscisic acid-deficient barley mutant // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25(19). 10706.
- Akhtar S.S., Mekureyaw M.F., Pandey C., Roitsch T. Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects // Front. Plant Sci. 2020. V. 10. 1777.
- Allard-Massicotte R., Tessier L., Lécuyer F., Lakshmanan V., Lucier J.F., Garneau D., Caudwell L., Vlamakis H., Bais H.P., Beaugregard P.B. *Bacillus subtilis* early colonization of

- Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors // mBio. 2016. V. 7(6). e01664-16.
- Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., Smith K.W., Raphenya A.R., Wlodarski M.A., Edalatmand A., Petkau A., Syed S.A., Tsang K.K., Baker S.J.C., Dave M., McCarthy M.C., Mukiri K.M., Nasir J.A., Golbon B., Imtiaz H., Jiang X., Kaur K., Kwong M., Liang Z.C., Niu K.C., Shan P., Yang J.Y.J., Gray K.L., Hoad G.R., Jia B., Bhando T., Carfrae L.A., Farha M.A., French S., Gordzevich R., Rachwalski K., Tu M.M., Bordeleau E., Dooley D., Griffiths E., Zubyk H.L., Brown E.D., Maguire F., Beiko R.G., Hsiao W.W.L., Brinkman F.S.L., Van Domselaar G., McArthur A.G. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the comprehensive antibiotic resistance database // Nucleic Acids Res. 2023. V. 51(D1). P. D690–D699.
- AlKahtani M.D.F., Fouda A., Attia K.A. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from desert plants and their application as bioinoculants for sustainable agriculture // Agronomy. 2020. V. 10. № 9. P. 1325.
- Allen D.J., Ort D.R. Impact of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants // Trends Plant Sci. 2001. V. 6. P. 36–42.
- Ali S.Z., Sandhya V., Grover M., Linga V.R., Bandi V. Effect of inoculation with a thermotolerant plant growth promoting *Pseudomonas putida* strain AKMP7 on growth of wheat (*Triticum* spp.) under heat stress // J. Plant Interact. 2011. V. 6. P. 239–246.
- Ali Q., Yu C., Wang Y., Sheng T., Zhao X., Wu X., Jing L., Gu Q., Wu H., Gao X. High killing rate of nematode and promotion of rice growth by synthetic volatiles from *Bacillus* strains due to enhanced oxidative stress response // Physiol. Plant. 2023. V. 175(1). e13868.
- Alnasrawi A., Sanadhya P., Zhang L., Gleason C., Minor K., Crippen D., Goggin F.L. The effects of *Bacillus subtilis* expressing a plant elicitor peptide on nematode infection on soybean // Phytopathology. 2024. V. 114(9). P. 2143–2150.
- Alferov A.A., Chernova L.S., Zavalin A.A., Chebotar V.K. The efficiency of the endophytic biopreparations and nitrogen fertilizer application // Bull. Russ. Agric. Sci. 2017. V. 5. P. 21–24.

- Alvarez A., Virla E.G., Pera L.M., Baigorí M.D. Biological characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Spodoptera frugiperda* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 27. № 10. P. 2343–2349.
- Aleti G., Lehner S., Bacher M., Compant S., Nikolic B., Plesko M., Schuhmacher R., Sessitsch A., Brader G. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus* // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. № 8. P. 2634–2645.
- Ambreetha S., Chinnadurai C., Marimuthu P., Balachandar D. Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture // Rhizosphere. 2018. V. 5. P. 57–66.
- Anand U., Pal T., Yadav N., Singh V.K., Tripathi V., Choudhary K.K., Shukla A.K., Sunita K., Kumar A., Bontempi E., Ma Y., Kolton M., Singh A.K. Current scenario and future prospects of endophytic microbes: promising candidates for abiotic and biotic stress management for agricultural and environmental sustainability // Microb. Ecol. 2023. V. 86. P. 1455–1486.
- Anjum S.A., Xie X.Y., Wang L.C., Saleem M.F., Man C., Lei W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress // Afr. J. Agric. Res. 2011. V. 6. P. 2026–2032.
- Anjum S.A., Wang L.C., Farooq M., Hussain M., Xue L.L., Zou C.M. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange // J. Agron. Crop Sci. 2011b. V. 197. № 3. P. 177–185.
- Aranjuelo G., Molero G., Erice G., Avicé J.C., Nogués S. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.) // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 111–123.
- Arif S., Munis M.F.H., Liaquat F., Gulzar S., Haroon U., Zhao L.A., Zhang Y.D. *Trichoderma viride* establishes biodefense against clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and fosters plant growth via colonizing root hairs in pak choi (*Brassica campestris* spp. *chinesensis*) // Biol. Control. 2023. V. 183. P. 105265.
- Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I., Martynenko E.V., Kudoyarova G.R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants // Plant Soil. 2005. V. 272. P. 201–209.

- Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.U., Martinenko E.V., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // *Plant Soil*. 2007. V. 292. P. 305–315.
- Arzanesh M.H., Alikhani H.A., Khavazi K., Rahimian H.A., Miransari M. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 27. P. 197–205.
- Asaf S., Khan A.L., Khan M.A., Al-Harrasi A., Lee I.J. Complete genome sequencing and analysis of endophytic *Sphingomonas* sp. LK11 and its potential in plant growth // *Biotech.* 2018. V. 8. P. 389.
- Asseng S., Martre P., Maiorano A., Rötter R.P., O’Leary G.J., Fitzgerald G.J., Girousse C., Motzo R., Giunta F., Ali Babar M., Reynolds M.P., Kheir A.M.S., Thorburn P.J., Waha K., Ruane A.C., Aggarwal P.K., Ahmed M., Balkovič J., Basso B., Biernath C., Bindi M., Cammarano D., Challinor A.J., De Sanctis G., Dumont B., Eyshi Rezaei E., Fereres E., Ferrise R., Garcia-Vila M., Gayler S., Gao Y., Horan H., Hoogenboom G., Izaurrealde R.C., Jabloun M., Jones C.D., Kassie B.T., Kersebaum K.C., Klein C., Koehler A.K., Liu B., Minoli S., Montesino San Martin M., Müller C., Naresh Kumar S., Nendel C., Olesen J.E., Palosuo T., Porter J.R., Priesack E., Ripoche D., Semenov M.A., Stöckle C., Stratonovitch P., Streck T., Supit I., Tao F., Van der Velde M., Wallach D., Wang E., Webber H., Wolf J., Xiao L., Zhang Z., Zhao Z., Zhu Y., Ewert F. Climate change impact and adaptation for wheat protein // *Glob. Chang. Biol.* 2019. V. 25. P. 155–173.
- Audrain B., Mohamed A.F., Riu Ch.M., Ghigo J.M. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. V. 39. № 2. P. 222–233.
- Ayaz M., Ali Q., Jiang Q., Wang R., Wang Z., Mu G., Khan S.A., Khan A.R., Manghwar H., Wu H., Gao X., Gu Q. Salt tolerant *Bacillus* strains improve plant growth traits and regulation of phytohormones in wheat under salinity stress // *Plants*. 2022. V. 11(20). 2769.
- Azeem M., Javed S., Zahoor A.F. *Bacillus* species as potential plant growth promoting rhizobacteria for drought stress resilience // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70. 59.
- Baez-Rogelio A., Morales-García Y.E., Quintero-Hernández V., Muñoz-Rojas J. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation // *Microb. Biotechnol.* 2017. V. 10. P. 19–21.

- Babasaki K., Takao T., Shimonishi Y., Kurahashi K. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis // J. Biochem. 1985. V. 98. P. 585–603.
- Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. 1473.
- Barea J.M., Navarro E., Montoya E. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria // J. Appl. Bacteriol. 1976. V. 40, P. 129–134.
- Barnawal D., Bharti N., Pandey S.S., Pandey A., Chanotiya C.S., Kalra A. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and *TaCTR1/TaDREB2* expression // Physiol. Plant. 2017. V. 161. P. 502–514.
- Barnawal D., Singh R., Singh R.P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes // In PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2019; pp. 107–128.
- Bari A., Akther M.S., Reza A., Kabir A.H. Cadmium tolerance is associated with the root-driven coordination of cadmium sequestration, iron regulation, and ROS scavenging in rice // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 136. P. 22–33.
- Bates I.S., Waldern R.P., Teare D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205–207.
- Batool T., Ali S., Seleiman M.F., Naveed N.H., Ali A., Ahmed K. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 16975.
- Bhore S.J., Nithya R., Loh C.Y. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of *Sambung Nyawa* [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds // Bioinformation. 2010. V. 5. №5. P. 191–197.
- Bais H.P., Weir T.L. Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 233–266.

- Bokhari A., Essack M., Lafi F.F., Andres-Barrao C., Jalal R., Alamoudi S., Razali R., Alzubaidy H., Shah K.H., Siddique S., et al. Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 18154.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. Lignin biosynthesis // Ann. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. № 1. P. 519–546.
- Buqori D.M.A.I., Sugiharto B., Suherman, Siswoyo T.A., Hariyono K. Mitigating drought stress by application of drought-tolerant *Bacillus* spp. enhanced root architecture, growth, antioxidant and photosynthetic genes expression in sugarcane // Sci. Rep. 2025. V.15(1). 5259.
- Bukhat S., Imran A., Javaid S., Shahid M., Majeed A., Naqqash T. Communication of plants with microbial world: exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling // Microbiol. Res. 2020. V. 238. P. 126486.
- Burkhanova G. *Bacillus subtilis* strain:26D genome sequencing // NCBI Accession PRJNA1182114. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences. 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA1182114>
- Blake C., Christensen M.N., Kovács Á. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis* // Mol. Plant-Microbe Interact. 2021. V. 34. P. 15–25.
- Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S.Y., Weber T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47(W1). P. W81–W87.
- Blin K., Shaw S., Augustijn H.E, Reitz Z.L., Biermann F., Alanjary M., ... Weber T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation // Nucl. Acid Res. 2023. V. 51 (W1). P. W46–W50.
- Blum A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation // Plant Growth Regul. 1996. V. 20. P. 135–148.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive methods for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 74. P. 248–254.

- Bindschedler L.V., Minibaeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // *New Phytol.* 2001. V. 151. P. 185–194.
- Bitas V., Kim H.S., Bennett J.W., Kang S. Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health // *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2013. V. 26. № 8. P. 835–843.
- Boleta E.H.M., Shintate Galindo F., Jalal A., Santini J.M.K., Rodrigues W.L., Lima B.H., Arf O., Silva M.R., Buzetti S., Teixeira Filho M.C.M. Inoculation with growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and its effects on productivity and nutritional accumulation of wheat cultivars // *Front. Sust. Food Syst.* 2020. V. 4. 607262.
- Bourahla M., Djebbar R., Kaci Y., Abrous-Belbachir O. Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain isolated from wheat rhizosphere // *Analele Univ. din Oradea.* 2018. V. 25. № 2. P. 74–83.
- Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Dumova V.A., Shaposhnikov A.I., Ladatko A.G., Davies W.J. Absciscic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 74. P. 84–91.
- Benevenuto R.F., Zanatta C.B., Guerra M.P., Nodari R.O., Agapito-Tenfen S.Z. Proteomic profile of glyphosate-resistant soybean under combined herbicide and drought stress conditions // *Plants.* 2021. V. 10. P. 2381.
- Benedetti L., Rangani G., Viana V.E., Carvalho-Moore P., Merotto A. et al. Rapid reduction of herbicide susceptibility in jungle rice by recurrent selection with sublethal dose of herbicides and heat stress // *Agronomy.* 2020. V. 10. № 11. 1761.
- Benedetto N.A., Corbo M.R., Campaniello D., Cataldi M.P., Bevilacqua A., Sinigaglia M., Flagella Z. The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat // *AIMS Microbiol.* 2017. V. 3. № 3. P. 413.
- Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents // *Genet. Mol. Biol.* 2012. V. 4. P. 1044–1051.

- Bernat P., Nykiel-Szymańska J., Gajewska E., Różalska S., Stolarek P., Dackowa J., Słaba M. *Trichoderma harzianum* diminished oxidative stress caused by 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in wheat, with insights from lipidomics // J. Plant Physiol. 2018. P. 229.
- Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions // Anal Biochem. 1987. V. 161. P. 559–566.
- Bruto M., Prigent-Combaret C., Muller D., Moënne-Loccoz Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria // Sci. Rep. 2014. V. 4. P. 6261.
- Cabane M., Afif D., Hawkins S. Lignins and abiotic stresses // In Lignins Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering. (Jouanin L., Lapierre C., Eds.); Academic Press. Advances in Botanical Research: London, UK. 2012. V. 61. P. 219–262.
- Çakmakçı R., Turan M., Ktır N., Güneş A., Nikerel E., Özdemir B.S., Yıldırım E., Olgun M., Topçuoğlu B., Tüfenkçi Ş., Karaman M.R., Leyla Tarhan L., Mokhtari N.E.P. The role of soil beneficial bacteria in wheat production: a review // In Wheat Improvement, Management and Utilization. (Wanyera R., Owuoche J., Eds.); 2017. IntechOpen: London.
- Calderone C.T., Kowtoniuk W.E., Kelleher N.L., Walsh C.T., Dorrestein P.C. Convergence of isoprene and polyketide biosynthetic machinery: Isoprenyl-S-carrier proteins in the pksX pathway of *Bacillus subtilis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 8977–8982.
- Galindo F.S., Thiengo C.C., Pagliari P.H., Bernardes J.V.S., Dos Santos G.D., Longato P.A.F., Vilela L.S., Teixeira Filho M.C.M, Lavres J. Synergism of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* for enhanced N-use efficiency and maize growth: Evidence from ¹⁵N isotopic and physiological responses // Physiol. Plant. 2025. V. 177(2). e70205.
- Cantoro R., Palazzini J.M., Yerkovich N., Miralles D.J., Chulze S.N. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum*: Effect on penetration, growth and TRI5 expression in wheat spikes // Biol. Control. 2021. V. 66. P. 259–270.
- Carro-Huerga G., Compant S., Gorfer M., Cardoza R.E., Schmoll M., Gutierrez S., Casquero P.A. Colonization of *Vitis vinifera* L. by the endophyte *Trichoderma* sp. strain T154: biocontrol activity against *Phaeoacremonium minimum* // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1170.

- Carmo-Silva A.E., Gore M.A., Andrade-Sanchez P., French A.N., Hunsaker D.J., Salvucci M.E. Decreased CO₂ availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field // *Environ. Exp. Bot.* 2012. V. 83. P. 1–11.
- Catalog MBI Fermentas. P. 146–157.
- Compant S., Mitter B., Colli-Mull J.G., Gangl H., Sessitsch A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: Identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization // *Microb. Ecol.* 2011. V. 62. P. 188–197.
- Compant S., Samad A., Faist H., Sessitsch A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application // *J. Adv. Res.* 2019. V. 19. P. 29–37.
- Compant S., Cambon M.C., Vacher C., Mitter B., Samad A., Sessitsch A. The plant endosphere world – bacterial life within plants // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 1812–1829.
- Cope-Selby N., Cookson A., Squance M., Donnison I., Flavell R., Farrar K. Endophytic bacteria in *Miscanthus* seed: Implications for germination, vertical inheritance of endophytes, plant evolution and breeding // *GCB Bioenergy*. 2017. V. 9(1). P. 57–77.
- Cordell D., Neset T.S. Phosphorus vulnerability: a qualitative framework for assessing the vulnerability of national and regional food systems to the multi-dimensional stressors of phosphorus scarcity // *Glob. Environ. Change*. 2014. V. 24. P. 108–122.
- Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // *Crit. Rev. Microbiol.* 1995. V. 21. P. 1–18.
- Coulson T.J.D., Patten C.L. Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* UW5, a Rhizobacterium capable of high levels of Indole-3-acetic acid production // *Genome Announc.* 2015. V. 3. e00843-15.
- Cox C.E., Brandl M.T., de Moraes M.H., Gunasekera S., Teplitski M. Production of the plant hormone auxin by salmonella and its role in the interactions with plants and animals // *Front. Microbiol.* 2018. V. 8. 2668.
- Chandra D., Srivastava R., Gupta V.V.S.R., Franco C.M.M., Paasricha N., Saifi S.K., Tuteja N., Sharma A.K. Field performance of bacterial inoculants to alleviate water stress effects in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Soil*. 2019. V. 441. P. 261–281.

- Chagas F.O., de Cassia Pessotti R., Caraballo-Rodriguez A.M., Pupo M.T. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions // Chem. Soc. Rev. 2018. V. 47. № 5. P. 1652–1704.
- Chatterjee P., Samaddar S., Anandham R., Kang Y., Kim K., Selvakumar G., Sa T. Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* OS261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 705.
- Chakraborty U., Chakraborty B.N., Chakraborty A.P., Dey P.L. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29.
- Chebotar V.K., Malfanova N.V., Shcherbakov A.V., Ahtemova G.A., Borisov A.Y., Lugtenberg B., Tikhonovich I.A. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. P. 271–277.
- Chebotar V.K., Zaplatkin A.N., Komarova O.V., Baganova M.E., Chizhevskaya E.P., Polukhin N.I., Balakina S.V. Endophytic bacteria for development of microbiological preparations for increasing productivity and protection of new potato varieties // Res. Crops. 2021. V. 22(spl). P. 104–107.
- Chebotar V.K., Zaplatkin A.N., Chizhevskaya E.P., Gancheva M.S., Voshol G.P., Malfanova N.V., Baganova M.E., Khomyakov Y.V., Pishchik V.N. Phytohormone production by the endophyte *Bacillus safensis* TS3 increases plant yield and alleviates salt stress // Plants. 2024. V. 13. 75.
- Cherepanova E.A., Galyautdinov I.V., Burkhanova G.F., Maksimov I.V. Isolation and identification of lipopeptides of *Bacillus subtilis* 26D // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. P. 636–642.
- Chen, G.; Zhu, H.; Zhang, Y. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation // Res. Microbiol. 2003. V.154. P. 393–398.
- Chen X.H., Koumoutsis A., Scholz R., Schneider K., Vater J., Süßmuth R., Piel J., Borriss R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens // J. Biotechnol. 2009. V. 140. P. 27–37.
- Chen Y., Gozzi R., Yan F., Chai Y. Acetic acid acts as a volatile signal to stimulate bacterial biofilm formation // ASM J. 2015. V. 6. № 3. e00392.

- Chen C., Xin K., Liu H., Cheng J., Shen X., Wang Y., Zhang L. *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 41564.
- Chen L., Liu Y., Wu G., Zhang N., Shen Q., Zhang R. Beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 Induces plant salt tolerance through spermidine production // Mol. Plant Microbe Interact. 2017a. V. 30. P. 423–432.
- Chen H., Bullock Jr.D.A., Alonso J.M., Stepanova A.N. To fight or to grow: The balancing role of ethylene in plant abiotic stress responses // Plants. 2021. V. 11. № 1. P. 33.
- Chen J., Xu H., Seven J., Zilla T., Dippold M.A., Kuzyakov Y. Microbial phosphorus recycling in soil by intra-and extracellular mechanisms // ISME Communic. 2023. V. 3(1). 135.
- Chennappa G. Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. *Azotobacter salinestris*: a novel pesticide-degrading and prominent biocontrol PGPR bacteria // In Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability. (Panpatte D., Jhala Y., Shelat H., Vyas R., Eds.); 2018. Springer, Singapore. P. 23–43.
- Cherif H., Marasco R., Rolli E., Ferjani R., Fusi M., Soussi A., Mapelli F., Blilou I., Borin S., Boudabous A., Cherif A., Daffonchio D., Ouzari H. Oasis desert farming selects environment-specific date palm root endophytic communities and cultivable bacteria that promote resistance to drought // Environ. Microbiol. Rep. 2015. V. 7. P. 668–678.
- Chetverikov S.P. Selection of anti-stress bacterial agents for the protection of agricultural plants // Nat. Techn. Sci. 2019. V. 11. № 137. P. 81–84.
- Chetverikov S., Sharipov D., Bakaeva M., Chetverikova D., Timergalin M., Rameev T. Bacterial strain *Pseudomonas avellanae* 6CH2 with antifusarium activity in mitigation of herbicidal stress in wheat plants // Jordan J. Biol. Sci. 2021. V. 14.
- Chetverikov S.P., Timergalin M.D., Rameev T.V., Feoktistova A.V., Chetverikova D.V. Kendzhieva A.A., Sharipov D.A., Starikov S.N., Bakaeva M.D., Hudaygulov G.G., Sultangazin Z.R. A new «Agrobiolog» biopreparation to improve the quality of soft spring wheat grain in conditions of drought and herbicidal stress // Nat. Techn. Sci. 2022. V. 6. № 169. P. 47–50.
- Chiappero J., Cappellari L. del R., Alderete L.G.S., Palermo T.B., Banchio E. Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under

- drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content // Ind. Crop. Prod. 2019. V. 139. 111553.
- Chieb M., Gachomo E.W. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses // BMC Plant Biol. 2023. V. 23. 407.
- Cho S.M., Kang B.R., Han S.H., Anderson A.J., Park J.Y., Lee Y.H., Kim Y.C. 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana* // APS Pub. 2008. V. 21. № 8. P. 1067–1075.
- Choi S.J., Lee Z., Kim S., Jeong E., Shim J.S. Modulation of lignin biosynthesis for drought tolerance in plants // Front. Plant Sci. 2023. V. 14. 1116426.
- Chourdary D., Johri B. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR) // Microbiol. Res. 2009. V. 164. № 5. P. 493–513.
- Chukwudi U.P., Babalola O.O., Glick B.R., Santoyo G., Rigobelo E.C. Field application of beneficial microbes to ameliorate drought stress in maize // Plant Soil. 2025. <https://doi.org/10.1007/s11104-025-07446-y>
- Cuttriss A.J., Pogson B.J. In: Davies, K.M. (Ed.), Carotenoids. Plant pigments and their manipulation. CRC Press, Boca Raton. 2004.
- Danylovyh H.V., Hruzina T.H., Ul'berh Z.R., Kosterin S.O. Identification and catalytic properties of Mg²⁺-dependent ATP-hydrolase of cytoplasmic membrane of *Bacillus* sp. B4253 capable of gold accumulation // Ukr. Biokhim. Zh. 2004. V. 76. P. 45–51.
- Danish S., Zafar-ul-Hye M. Co-application of ACC-deaminase producing PGPR and timber-waste biochar improves pigments formation, growth and yield of wheat under drought stress // Sci. Rep. 2019. V. 9(1). 5999.
- Deivanai S., Bindusara A.S., Prabhakaran G., Bhore S.J. Culturable bacterial endophytes isolated from Mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in rice // J. Nat. Sci. Biol. Med. 2014. V. 5. P. 437.
- Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Petrova Stoyanova Z., Feller U. Cadmium stress in barley: growth, leaf pigment, and protein composition and detoxification of reactive oxygen species // J. Plant Nutr. 2006. V. 29(3). P. 451–468.

- Desmond O.J., Edgar C.I., Manners J.M., Maclean D.J., Schenk P.M., Kazan K. Methyljasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2006. V. 67. P. 171–179.
- Deng Y., Zhu Y., Wang P., Zhu L., Zheng J., Li R., Ruan L., Peng D., Sun M. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora carotovora* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 2070–2071.
- Del Carmen Orozco-Mosqueda M., Flores A., Rojas-Sánchez B., Urtis-Flores C.A., Morales-Cedeño L.R., Valencia-Marin M.F., Chávez-Avila S., Rojas-Solis D., Santoyo G. Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement // *Agronomy.* 2021. V. 11. P. 1167.
- Diabankana R.G.C., Afordoanyi D.M., Filimonova M.N., Validov S.Z., Safin R.I. Biological traits of vertically seed-transmitted *Bacillus mojavensis* in *Triticum aestivum* L. // *Microbiol. Res.* 2024. V. 15(4). P. 2369–2380.
- Díaz-Cornejo S., Otero M.C., Banerjee A., Gordillo-Fuenzalida F. Biological properties of exopolysaccharides produced by *Bacillus* spp. // *Microbiol. Res.* 2023. V. 268. 127276.
- Dimopoulou A., Theologidis I., Benaki D., Koukounia M., Zervakou A., Tzima A., Diallinas G., Hatzinikolaou D.G., Skandalis N. Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 // *Mosphere.* 2021. V. 6. № 4. P. 1110–1128.
- Diniz F.V., Scherwinski-Pereira J.E., Costa F.H.S., Carvalho C.M. Effects on plant physiology in response to inoculation of growth-promoting bacteria: systematic review // *Brazil. J. Biol.* 2025. V. 85. e287279
- Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status // *Ann. Appl. Biol.* 2010. V. 157. P. 361–379.
- de Oliveira-Paiva C.A., Bini D., de Sousa S.M., Ribeiro V.P., Dos Santos F.C., de Paula Lana U.G., de Souza F.F., Gomes E.A., Marriel I.E. Inoculation with *Bacillus megaterium* CNPMS B119 and *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 improve P-acquisition and maize yield in Brazil // *Front. Microbiol.* 2024. V. 15. 1426166.

- dos Santos T.B., Ribas A.F., de Souza S.G.H., Budzinski I.G.F., Domingues D.S. Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review // *Stresses*. 2022. V. 2. P. 113–135.
- Du L., Huang X., Ding L., Wang Z., Tang D., Chen B., Ao L., Liu Y., Kang Z., Mao H. TaERF87 and TaAKS1 synergistically regulate TaP5CS1/TaP5CR1-mediated proline biosynthesis to enhance drought tolerance in wheat // *New Phytologist*. 2023. V. 237(1). P. 232–250.
- Duca D., Lorv J., Patten C.L., Rose D., Glick B.R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014. V. 106. P. 85–125.
- Dutta B., Panja A.S., Nigam V.K., Nanjappan S.K., Ravichandiran V., Bandopadhyay R. Computational and biochemical characterization of the immobilized esterase of *Salinicoccus roseus* for pesticide degradation // *Scientific Reports*. 2024. V. 14. 30661.
- Dutilloy E., Arias A.A., Richet N., Guise J.F., Duban M., Leclere V., Selim S., Jacques P., Jacquard C., Clément C., Ait Barka E., Esmaeel Q. *Bacillus velezensis* BE2 controls wheat and barley diseases by direct antagonism and induced systemic resistance // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2024. V. 108(1). 64.
- Eichmann R., Richards L., Schäfer P. Hormones as go-betweens in plant microbiome assembly // *Plant J.* 2021. V. 105. 518.
- Etesami H., Glick B.R. Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience // *Microbiol. Res.* 2024. V. 281. 127602.
- Emanuele J.J., Heasley C.J., Fitzpatrick P.F. Purification and characterization of the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase expressed at high levels in *Escherichia coli* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 316. P. 241–248.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. Plant Drought stress: effects, mechanisms and management // *Agron. Sustain. Dev.* 2009. V. 29. P. 185–212.
- Farooq M., Hussain M., Siddique K.H.M. Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods // *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2014. V. 33. P. 331–349.
- Farooqi Z.U.R., Ayub M.A., Zia ur Rehman M., Sohail M.I., Usman M., Khalid H., Naz K. Regulation of drought stress in plants // *In Plant Life under changing Environment*. Elsevier; 2020. P. 77–104.

- Farris J.S. Estimating phylogenetic trees from distance matrices // Am. Nat. 1972. V. 106. P. 645–667.
- FAO. The state of food and agriculture. Climate Change, Agriculture and Food Security. Rome, Italy. 2016.
- FAO. Cereal Supply and Demand Brief, 2021. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/ru/>
- FAO. 2022. FAOSTAT: Production: Crops and Livestock Products. FAO. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Feoktistova A.V., Timergalin M.D., Rameev T.V., Chetverikov S.P. Treatment of wheat plants with bacteria *Pseudomonas protegens* DA 1.2 reduced the negative effect of the herbicide chistalan in conditions of water deficit // Agrochem. 2021. V. 10. P. 89–96.
- Feoktistova A., Timergalin M., Chetverikov S., Nazarov A., Kudoyarova G. Effects on *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4-D and humic substances on the growth, pigment indices and concentration of hormones in wheat seedlings grown under water deficit // Microorganisms. 2023. V. 11. 549.
- Feng Q.J., Cao S.L., Liao S.J., Wassie M., Sun X.Y., Chen L., Xie Y. *Fusarium equiseti*-Inoculation altered rhizosphere soil microbial community, potentially driving perennial ryegrass growth and salt tolerance // Sci. Total Environ. 2023. V. 871. 162153.
- Ferrante R., Campagni C., Vettori C., Checcucci A., Garosi C., Paffetti D. Meta-analysis of plant growth-promoting rhizobacteria interaction with host plants: implications for drought stress response gene expression // Front. Plant Sci. 2024. V. 14. 1282553.
- Fira D.J., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species // J. Biotechnol. 2018. V. 285. P. 44–55.
- Frank A.C., Saldierna Guzmán J.P., Shay J.E. Transmission of bacterial endophytes // Microorganisms. 2017. V. 5. P. 70.
- Franco-Sierra N.D., Posada L.F., Santa-Maria G., Romero-Tabarez M., Villegas-Escobar V., Alvarez J.C. *Bacillus subtilis* EA-CB0575 genome reveals clues for plant growth promotion and potential for sustainable agriculture // Funct. Integr. Genom. 2020. V. 20. P. 575–589.
- Foster K.R., Schluter J., Coyte K.Z., Rakoff-Nahoum S. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash // Nature. 2017. V. 548. P. 43–51.

- Forchetti G., Masciarelli O., Alemano S., Alvarez D., Abdala G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.) isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. P. 1145–1152.
- Forchetti G., Masciarelli O., Izaguirre M.J., Alemano S., Alvarez D., Abdala G. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi // Curr. Microbiol. 2010. V. 61. P. 485–493.
- Fotovat R., Valizadeh M., Toorehi M. Association between water-use efficiency components and total chlorophyll content (SPAD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and drought stress conditions // J. Food Agric. Environ. 2007. V. 5. P. 225–227.
- Fouladvand S., Soltani J. Halophytic bacterial endophyte microbiome from coastal desert-adapted wild poaceae alleviates salinity stress in the common wheat *Triticum aestivum* L. // Curr. Microbiol. 2024. V. 81(5). 132.
- Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // Antioxid. Redox Signal. 2009. V. 11. № 4. P. 861–905.
- Gamalero E., Bona E., Glick B.R. Current techniques to study beneficial plant-microbe interactions // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 1380.
- Garipova S.R. Prospects of using endophytic bacteria for bioremediation of arable soils polluted by residual amounts of pesticides and xenobiotics // Uspekhi Sovrem. Biologii. 2014. V. 134. P. 35–47.
- Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M.A., Iksanova M.A., Kamaletdinova A.A., Lastochkina O.V., Pusenkova L.I. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria // Acta Physiol. Plant. 2022. V. 44. P. 89.
- Garipova S., Matyunina V., Chistoedova A., Markova O., Lubyanova A., Lastochkina O., Pusenkova L. Antioxidant system activity in roots and shoots of bean cultivars in response to seed treatment with auxin as a potential model of interaction with endophytic bacteria // Plants. 2024. V. 13(23). 3365.

- Gautam S., Chauhan A., Sharma R., Sehgal R., Shirkot C.K. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis* // Microb. Pathog. 2019. V. 130. P. 196–203.
- Gebeyaw M. Role of seed priming on seed quality: a review // Int. J. Plant Breed. Crop Sci. 2020. V. 7(2). P. 779–784.
- Glick B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // Microbiol. Res. 2014. V. 169. P. 30–39.
- Glick B.R. Beneficial plant-bacterial interactions. 2nd ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; pp. 1–383.
- Glick B.R., Gamalero E. Recent developments in the study of plant microbiomes // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1533.
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. P. 909–930.
- Gimenez M.J., Piston F., Atienza S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae // Planta. 2011. V. 233. P. 163–173.
- Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity // Flavour Fragr. J. 1999. V. 14. P. 322–332.
- Gogoi P., Sharmah B., Manna P., Gogoi P., Baishya G., Saikia R. Salicylic acid induced by *Bacillus megaterium* causing systemic resistance against collar rot in *Capsicum chinense* // Plant Cell Rep. 2025. V. 44(4). 86.
- Gontia-Mishra I., Sapre S., Sharma A., Tiwari S. Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria // Plant Biol. 2016. V. 18. P. 992–1000.
- González M.F. Ali M.S., Baek K.-H. Endophyte *Bacillus velezensis* isolated from *Citrus* spp. controls streptomycin-resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker // Agronomy. 2019. V. 9. P. 470.

- Goswami M., Deka S. Plant growth-promoting rhizobacteria – alleviators of abiotic stresses in soil: A review // *Pedosphere*. 2020. V. 30. P. 40–61.
- Gowtham H.G., Singh B., Murali M., Shilpa N., Prasad M., Aiyaz M., Niranjana S.R. Induction of drought tolerance in tomato upon the application of ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* Rhizo SF 48 // *Microbiological Research*. 2020. V. 234. 126422.
- Guan C., Cen H.F., Cui X., Tian D.Y., Tadesse D., Zhang Y.W. Proline improves switchgrass growth and development by reduced lignin biosynthesis // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. e20117.
- Gupta S., Pandey S. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) plants // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1506.
- Gupta K., Dubey N.K., Singh S.P., Kheni J.K., Gupta S., Varshney A. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for crop improvement // In: *Current trends in microbial biotechnology for sustainable agriculture* (Eds. A.N. Yadav, J. Singh, C. Singh, N. Yadav). Singapore: Springer, 2021. P. 203–226.
- Gupta A., Bano A., Rai S., Kumar M., Ali J., Sharma S., Pathak N. ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in *Pisum sativum* // *Biotech.* 2021a. V. 11. e514.
- Gupta A., Rai S., Bano A., Khanam A., Sharma S., Pathak N. Comparative evaluation of different salt-tolerant plant growth-promoting bacterial isolates in mitigating the induced adverse effect of salinity in *Pisum sativum* // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2021b. V. 11. 13141.
- Guo X., Liu D., Chong K. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation // *JIPB*. 2018. V. 60. P. 745–756.
- Guo D.J., Singh R.K., Singh P., Li D.P., Sharma A., Xing Y.X., et al. Complete genome sequence of *Enterobacter roggenkampii* ED5, a nitrogen fixing plant growth promoting endophytic bacterium with biocontrol and stress tolerance properties, isolated from sugarcane root // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 580081.

- Guler N.S., Pehlivan N., Karaoglu S.A., Guzel S., Bozdeveci A. *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings // *Acta Physiol. Plant.* 2016. V. 38. P. 1–9.
- Guleria S., Walia A., Chauhan A., Shirkot C.K. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum* // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 232. P. 134–143.
- Gupta R., Elkabetz D., Leibman-Markus M., Sayas T., Schneider A., Jami E., Kleiman M., Bar M. Cytokinin drives assembly of the phyllosphere microbiome and promotes disease resistance through structural and chemical cues // *ISME J.* 2022. V. 16(1). P. 122–137.
- Ghanem M.E., Albacete A., Smigocki A.C., Frebort I., Pospíšilova H., Martinez-Andujar C., Acosta M., Sanchez-Bravo J., Lutts S., Dodd I.C., Pe´rez-Alfocea F. Root-synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 125–140.
- Ghazala I., Chiab N., Saidi M.N., Gargouri-Bouزيد R. The plant growth-promoting bacteria strain *Bacillus mojavensis* I4 enhanced salt stress tolerance in durum wheat // *Curr. Microbiol.* 2023. V. 80(5). 178.
- Ghazanfar S., Hussain A., Dar A., Ahmad M., Anwar H., Al Farraj D.A., Rizwan M., Iqbal R. Prospects of iron solubilizing *Bacillus* species for improving growth and iron in maize (*Zea mays* L.) under axenic conditions // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. 26342.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops // *Can. J. Microbiol.* 1997. V. 43. P. 895–914.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life // *Plant Physiol.* 2006. V. 141(2). P. 312–322.
- Han Q., Wu F., Wang X., Qi H., Shi L., Ren A., Liu Q., Zhao M., Tang C. The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signaling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity // *Environ. Microb.* 2015. V. 17. P. 1166–1188.
- Hanif A., Zhang F., Li P., Li C., Xu Y., Zubair M., Zhang M., Jia D., Zhao X., Liang J., Majid T., Yan J., Farzand A., Wu H., Gu Q., Gao X. Fengycin produced by *Bacillus*

- amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis // Toxins. 2019. V. 11. P. 295.
- Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015. V. 79. P. 293–320.
- Harwood C.R. *Bacillus subtilis* and its relatives: Molecular biological and industrial workhorses // Trends Biotechnol. 1992. V. 10. P. 247–256.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Gill S.S., Gill R., Fujita M. Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense // In: Climate change and plant abiotic stress tolerance. (Tuteja N., Gill S.S. Eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: KGaA, Weinheim, 2014. pp. 209–249.
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Fujita M., Fotopoulos V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator // Antioxidants. 2020. V. 9. P. 681.
- Hasanuzzaman M., Raihan M.R.H., Nowroz F. Fujita M. Insight into the mechanism of salt-induced oxidative stress tolerance in soybean by the application of *Bacillus subtilis*: coordinated actions of osmoregulation, ion homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification // Antioxidants. 2022. V. 11. P. 1856.
- Herrmann M.N., Wang Y., Hartung J., Hartmann T., Zhang W., Nkebiwe P.M., Chen X., Müller T., Yang H. A global network meta-analysis of the promotion of crop growth, yield, and quality by bioeffectors // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. 816438.
- Hertlein G., Müller S., Garcia-Gonzalez E., Poppinga L., Süssmuth R.D., Genersch E. Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* // PLoS ONE. 2014. V. 9. e108272.
- Hobley L., Li B., Wood J.L., Kim S.H., Naidoo J., Ferreira A.S., Khomutov M., Khomutov A., Stanley-Wall N.R., Michael A.J. Spermidine promotes *Bacillus subtilis* biofilm formation by activating expression of the matrix regulator slrR // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. P. 12041–12053.

- Horváth E., Szalai G., Janda T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling // J. Plant Growth Regul. 2007. V. 26. P. 290–300.
- Hove-Jensen B., McSorley F.R., Zechel D.L. Catabolism and detoxification of 1-aminoalkylphosphonic acids: N-acetylation by the *phnO* gene product // PLoS One. 2012. V. 7(10). e46416.
- Hsieh Y.J., Wanner B.L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system // Cur. Opin. Microbiol. 2010. V. 13(2). P. 198–203.
- Hung P.Q., Annapurna K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.) // Omonrice. 2004. V. 12. №. 4. P. 92-101.
- Hussain M.B., Hussain M.B., Zahir Z.A., Asghar H.N., Asgher M. Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat? // Int. J. Agri. Biol. 2014. V. 16. P. 3–13.
- Hussain A., Kamran M.A., Javed M.T., Hayat K., Farooq M.A., Ali N., Ali M., Manghwar H., Jan F. Individual and combinatorial application of *Kocuria rhizophila* and citric acid on phytoextraction of multi-metal contaminated soils by *Glycine max* L // Environ. Exp. Bot. 2019. V. 159. P. 23–33.
- Huseynova I.M., Suleymanov S.Y., Aliyev J.A. Structural-functional state of thylakoid membranes of wheat genotypes under water stress // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1767. № 6. P. 869–875.
- Hirooka K. Transcriptional response machineries of *Bacillus subtilis* conducive to plant growth promotion // Biosci. Biotech. Biochem. 2014. V. 78(9). P. 1471–1484.
- Hissin P.J., Hilf R.A. A Fluorometric method for determination of oxidize and reduced glutathione in tissues // Anal. Biochem. 1976. V. 47(1). P. 214–226.
- Ibort P., Molina S., Ruiz-Lozano J.M., Aroca R. Molecular insights into the involvement of a never ripe receptor in the interaction between two beneficial soil bacteria and tomato plants under well-watered and drought conditions // Mol. Plant Microbe Interact. 2018. V. 31. P. 633–650.
- IGC. International Grains Council, <https://www.igc.int/en/default.aspx>
- Innis M., Gelfand D., Sninsky J. PCR protocols – a guide to methods and applications. Academic press, 1990. pp. 14–15.

- Ishak Z., Mohd Iswadi M.K., Russman Nizam A.H., Ahmad Kamil M.J., Ernie Eileen R.R., Wan Syaidatul A., Ainon H. Plant growth hormones produced by endophytic *Bacillus subtilis* strain LKM-BK isolated from cocoa // Malays. Cocoa J. 2016. V. 9. P. 127–133.
- Kiesewalter H.T., Lozano-Andrade C.N., Wibowo M., Strube M.L., Maróti G., Snyder D., Jørgensen T.S., Larsen T.O., Cooper V.S., Weber T., Kovács Á.T. Genomic and chemical diversity of *Bacillus subtilis* secondary metabolites against plant pathogenic fungi // MSystems. 2021. V. 6(1). P. 1110–1128.
- Khalvandi M., Amerian M., Pirdashti H., Keramati S. Does co-inoculation of mycorrhiza and *Piriformospora indica* fungi enhance the efficiency of chlorophyll fluorescence and essential oil composition in peppermint under irrigation with saline water from the Caspian Sea? // PLoS One. 2021. V. 16(7). e0254076.
- Iqbal A., Arshad M., Hashmi I., Karthikeyan R., Gentry T.J., Schwab A.P. Biodegradation of phenol and benzene by endophytic bacterial strains isolated from refinery wastewater-fed *Cannabis sativa* // Environ. Technol. 2018. V. 39. P. 1705–1714.
- Iqbal S., Ullah N., Janjua H.A. In vitro evaluation and genome mining of *Bacillus subtilis* strain RS10 reveals its biocontrol and plant growth-promoting potential // Agriculture. 2021. V. 11. P. 1273.
- Jan R., Khan M.A., Asaf S., Lubna Lee I.-J., Kim K.M. Metal resistant endophytic bacteria reduces cadmium, nickel toxicity, and enhances expression of metal stress related genes with improved growth of *Oryza sativa*, via regulating its antioxidant machinery and endogenous hormones // Plants. 2019. V. 8. 363.
- Jeffrey S., Humphrey G. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pfl. 1975. V. 167. P. 191–194.
- Jensen W.A. Botanical histochemistry // W.H. Freeman and Company. San Francisco. 1962.
- Jeyaram K., Romi W., Singh T.A., Adewumi G.A., Basanti K., Oguntoyinbo F.A. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance // J. Microbiol. Methods. 2011. V. 87(2). P. 161–164.
- Jha Y. Cell water content and lignification in maize regulated by rhizobacteria under salinity // Braz. J. Biol. Sci. 2017. V. 4. 9.

- Ji X., Dong B., Shiran B., Talbot M.J., Edlington J.E., Hughes T., White R.G., Gubler F., Dolferus R. Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 647–662.
- Jiang Z., van Zanten M., Sasidharan R. Mechanisms of plant acclimation to multiple abiotic stresses // *Commun. Biol.* 2025. V. 8. 655.
- Jin M., Chen L., Deng X.W., Tang X. Development of herbicide resistance genes and their application in rice // *Crop J.* 2022. V. 10. Issue 1. P. 26–35.
- Juturu V., Wu J.C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. P. 2187–2200.
- Kandel S.L., Joubert P.M., Doty S.L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants // *Microorganisms.* 2017. V. 5. 77.
- Kang S.M., Khan A.L., Waqas M., You Y.H., Kim J.H., Kim J.G., Muhammad H., Lee I.J. Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus* // *J. Plant Interact.* 2014. V. 9. P. 673–682.
- Kang B.H., Anderson C.T., Arimura S.I., Bayer E., Bezanilla M., Botella M.A., Brandizzi F., Burch-Smith T.M., Chapman K.D., Dünser K., Gu Y., Jaillais Y., Kirchhoff H., Otegui M.S., Rosado A., Tang Y., Kleine-Vehn J., Wang P., Zolman B.K. A glossary of plant cell structures: Current insights and future questions // *Plant Cell.* 2022. V. 34(1). P. 10–52.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 3. P. 287–291.
- Kavi K.P.B., Hima K.P., Sunita M.S., Sreenivasulu, N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 66. e544.
- Kaushal M., Wani S.P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands // *Ann. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 35–42.
- Kaushal M. Microbes in cahoots with plants: MIST to hit the jackpot of agricultural productivity during drought // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1769.

- Kaushal M. Portraying rhizobacterial mechanisms in drought tolerance: a way forward toward sustainable agriculture // In PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. (Singh, A.K., Rumar, A., Singh, P.K. Eds.). Elsevier Inc., 2019; pp. 195–216.
- Kaur G., Asthir B. Molecular responses to drought stress in plants // Biol. Plant. 2017. V. 61(2). P. 201–209.
- Kaur T., Devi R., Kour D., Yadav A.N. Genotype-specific modulation of drought resilience in wheat by ACC deaminase-producing rhizobacteria: Linking ethylene metabolism to root architecture and stress tolerance // Plant Physiol. Biochem. 2023. V. 194. P. 146–158.
- Kavi K.P.B., Hima K.P., Sunita M.S., Sreenivasulu N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny // Front. Plant Sci. 2015. V. 66. e544.
- Kim K., Jang Y.J., Lee S.M., Oh B.T., Chae J.C., Lee K.J. Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and arabidopsis is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants // Mol. Cell. 2014. V. 37. P. 109–117.
- Kim Y.N., Khan M.A., Kang S.M., Hamayun M., Lee I.J. Enhancement of drought-stress tolerance of *Brassica oleracea* Var. italica L. by newly isolated *Variovorax* sp. YNA59 // J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 30. P. 1500–1509.
- Kim H., Seomun S., Yoon Y., Jang G. Jasmonic acid in plant abiotic stress tolerance and interaction with abscisic acid // Agronomy. 2021. V. 11(9). P. 1886.
- Kirova E., Pecheva D., Simova-Stoilova L. Drought response in winter wheat: protection from oxidative stress and mutagenesis effect // Acta Physiol. Plant. 2021. V. 43. P. 1–11.
- Klessig F.K., Choi H.W., Dempsey D.A. Systemic acquired resistance and salicylic acid: Past, present, future // Mol. Plant-Microbe Interact. 2018. V. 31. P. 871–888.
- Koga J., Adachi T., Hidaka H. IAA biosynthesis pathway from tryptophan via indole-3-pyruvic acid in *Enterobacter cloacae* // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. P. 701–706.
- Kolesnikov L.E., Novikova I.I., Pavlyushin V.A., Zuev E.V., Kolesnikova Y.R. Modeling the effectiveness of *Bacillus subtilis* strains depending on natural and climatic factors in soft wheat cultivation // Russ. Agricult. Sci. 2023. V. 49. P. 488–500.

- Kolodkin-Gal I., Cao S., Chai L., Bottcher T., Kolter R., Clardy J., Losick R. A self- produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide // *Cell*. 2012. V. 149. P. 684–692.
- Kondo T., Sibponkrung S., Tittabutr P., Boonkerd N., Ishikawa S., Teaumroong N., Yoshida K.I. *Bacillus velezensis* S141 improves the root growth of soybean under drought conditions // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2025. V. 89(2). P. 304–312.
- Korobov A.E., Lelyak V.A., Ivleva A.A. Spring wheat protection against herbicide stress by biological preparation Phytop 8.67 // *Proceed. Intern. Sci. Conf. “Plant Protection in the Transition to Precision Farming”* (27–29 July 2021), Belarus Nat. Acad. Sci. 2021, 204 p.
- Korver R.A., Koevoets I.T., Testerink C. Out of shape during stress: a key role for auxin // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23. 783.
- Kost T., Stopnisek N., Agnoli K., Eberl L., Weisskopf L. Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated *Burkholderia* species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by *Burkholderia phytofirmans* // *Front. Microbiol.* 2014. V. 4. P. 1–9.
- Kosová K., Vítámvás P., Urban M.O., Klíma M., Roy A., Prášil I.T. Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops – a proteomic perspective // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16(9). P. 20913–20942.
- Kowal J., Arrigoni E., Serra J., Bidartondo M. Prevalence and phenology of fine root endophyte colonization across populations of *Lycopodiella inundata* // *Mycorrhiza*. 2020. V. 30(5). P. 577–587.
- Kreft L., Botzki A., Coppens F., Vandepoele K., Van Bel M. PhyD3: A phylogenetic tree viewer with extended phyloXML support for functional genomics data visualization // *Bioinformatics*. 2017. V. 33. P. 2946–2947.
- Khan A., Doshi H.V., Thakur M.C. *Bacillus* spp.: A prolific siderophore producer // In *Bacilli and agrobiotechnology* (Islam M., Rahman M., Pandey P., Jha C., Aeron A., Eds.). Springer: Cham, Germany, 2016; pp. 309–323.
- Khan M.I.R., Poor P., Janda T. Salicylic acid: A versatile signaling molecule in plants // *J. Plant Growth Regul.* 2022. V. 41. P. 1887–1890.
- Khare E., Mishra J., Arora N.K. Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and prospects // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. 2732.

- Kudoyarova G.R., Veselov S.Y., Karavaiko N.N., Gyulizade V.Z., Cheredova E.P., Mustafina A.R., Moshkov I.E., Kulaeva O.N. Immunoenzyme test system for assaying cytokinins // Fiziol. Rast. 1990. V. 37. P. 193–199.
- Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. 1368.
- Kulaeva O.N., Prokoptseva O.S. Recent advances in the study of mechanisms of action of phytohormones // Biochemistry (Mosc). 2004. V. 69(3). P. 233–247.
- Kuramshina Z.M., Khairullin R.M. Endophytic strains of *Bacillus subtilis* promote drought resistance of plants // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70. 45.
- Kuramshina Z.M., Khairullin R.M., Maksimov I.V. Endophytic bacteria *Bacillus* spp. in the formation of adaptive potential of plants // Russ. J. Plant Physiol. 2023a. V. 70. №. 8. P. 186.
- Kusari P., Kusari S., Spiteller M., Kayser O. Implications of endophyte-plant crosstalk in light of quorum responses for plant biotechnology // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99(13). P. 5383–5390.
- Kuklinski-Sorbal J., Araujo W.L., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani-Kleiner A.A., Azevedo J.L. Isolation and characterisation of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion // Env. Microb. 2004. V. 6(12). P. 1244–1251.
- Lafi F.F., AlBladi M.L., Salem N.M., Al-Banna L., Alam I., Bajic V.B., Hirt H., Saad M.M. Draft genome sequence of the plant growth-promoting *Pseudomonas punonensis* strain D1-6 isolated from the desert plant *Erodium hirtum* in Jordan // Genome Announce. 2017. V. 5(2). e01437-16.
- Lamarche M.G., Wanner B.L., Crépin S., Harel J. The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. P. 461–473.
- Lamers J., van der Meer T., Testerink C. How plants sense and respond to stressful environments // Plant Physiol. 2020. V. 182(4). P. 1624–1635.
- Larcher W. Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer Science & Business Media. 2003.

- Larcher W. The primary reactions of plants to stress are directed towards the prevention of cell damage and are thus of a universal nature // *Physiol. Plant Ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2003b.
- Lastochkina O.V., Il'yasova E. Yu., Shirokov A.V., Pusenkova L.I. Antifungal and growth stimulating activities of new *Bacillus subtilis* strains // *Sci. enq. contempor. world: theoret. basics innov. approach*. L&L Publishing. Titusville, FL, USA. 2012. V. 1. P. 96–98.
- Lastochkina O., Pusenkova L., Yuldashev R., Babaev M., Garipova S., Blagova D., Khairullin R., Aliniaiefard S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity // *Plant Physiol. Biochem.* 2017. V. 121. P. 80–88.
- Lastochkina O., Seifi Kalhor M., Aliniaiefard S., Baymiev A., Pusenkova L., Garipova S., Kulabuhova D., Maksimov I. *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables // *Plants*. 2019. V. 8. P. 97.
- Lastochkina O., Aliniaiefard S., Kalhor M.S., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth promoting bacteria biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat // *In Wheat production in changing environments: management, adaptation and tolerance*. (Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain A., Eds.). Springer: Singapore, Singapore. 2019a. pp. 579–614.
- Lastochkina O. *Bacillus subtilis*-mediated abiotic stress tolerance in plants // *In Bacilli and AgroBiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*. (Islam M., Rahman M., Pandey P., Boehme M., Haesaert G., Eds.). Springer Nature: Cham, Switzerland, 2019b. pp. 97–133.
- Lastochkina O., Baymiev A., Shayahmetova A., Garshina D., Koryakov I., Shpirnaya I., Pusenkova L., Mardanshin I., Kasnak C., Palamutoglu R. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers // *Plants*. 2020. V. 9. 76.
- Lastochkina O., Garshina D., Ivanov S., Yuldashev R., Khafizova R., Allagulova Ch., Fedorova K., Avalbaev A., Maslennikova D., Bosacchi M. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* modulates physiological responses of two different *Triticum aestivum* L. cultivars under drought stress // *Plants*. 2020a. V. 9. P. 1810.

- Lastochkina O., Garshina D., Allagulova C., Fedorova K., Koryakov I., Vladimirova A. Application of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid to improve wheat growth and tolerance under combined drought and fusarium root rot stresses // *Agronomy*. 2020b. V. 10. 1343.
- Lastochkina O., Pusenikova, L., Garshina D., Yuldashev R., Shpirnaya I., Kasnak C., Palamutoglu R., Mardanshin I., Garipova S., Sobhani M., Aliniaiefard S. 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 // *Plants*. 2020c. V. 9. № 6. 738.
- Lastochkina O., Aliniaiefard S., Garshina D., Garipova S., Pusenikova L., Allagulova Ch., Fedorova K., Baymiev A., Koryakov I., Sobhani M. 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 // *J. Plant Physiol.* 2021. V. 263. 153462.
- Lastochkina O., Garshina D., Ibragimov A. Enhanced performance of endophytic *Bacillus subtilis* in conjunction with salicylic acid meliorated simultaneous drought and fusarium root rot stresses in *Triticum aestivum* L // *Biol. Life Sci. Forum*. 2021a. V. 4. 20.
- Lastochkina O., Pusenikova L., Garshina D., Kasnak C., Palamutoglu R., Shpirnaya I., Mardanshin I., Maksimov I. 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 // *Horticulturae*. 2022. V. 8. 117.
- Lastochkina O., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Bosacchi M., Maslennikova D., Lubyanova A. Novel approaches for sustainable horticultural crop production: advances and prospects // *Horticulturae*. 2022a. V. 8. 910.
- Lastochkina O., Ivanov S., Petrova S., Garshina D., Lubyanova A., Yuldashev R., Kuluev B., Zaikina E., Maslennikova D., Allagulova C., Avtushenko I., Yakupova A., Farkhutdinov R. 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 // *Plants*. 2022b. V. 11. 3365.

- Lastochkina O., Yakupova A., Avtushenko I., Lastochkin A., Yuldashev R. Effect of seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* on some physio-biochemical parameters of two wheat varieties exposed to drought after selective herbicide application // *Plants*. 2023. V. 12(8). 1724.
- Lastochkina O., Bosacchi M. Potential roles of PGPMs in wheat adaptation and tolerance under herbicide and drought stresses combination // *Turk. J. Agric. Forestry*. 2023a. V. 47(5). P. 688–712.
- Lastochkina O., Yuldashev R., Avalbaev A., Allagulova C., Veselova S. 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 // *Microorganisms*. 2023b. V. 11(12). 2955.
- Lastochkina O. *Bacillus subtilis* strain:10-4 genome sequencing and assembly // NCBI Accession PRJNA1008864. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences. 2023c. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN37131992>
- Lautru S., Deeth R.J., Bailey L.M., Challis G.L. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining // *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 265–269.
- Lawlor D.W., Tezara W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 561–579.
- Leach J.E., Triplett L.R., Argueso S.T., Trivedi P. Communication in the phytobiome // *Cell*. 2017. V. 169. № 4. P. 587–596.
- Leal C., Fontaine F., Aziz A., Egas C., Clément C., Trotel-Aziz P. Genome sequence analysis of the beneficial *Bacillus subtilis* PTA-271 isolated from a *Vitis vinifera* (cv. Chardonnay) rhizospheric soil: assets for sustainable biocontrol. *Environ Microbiome*. 2021. №16(1). 3.
- Lebeis S.L., Paredes S.H., Lundberg D.S., Breakfield N., Gehring J., McDonald M., Malfatti S., Glavina del Rio T., Jones C.D., Tringe S.G., Dangkl J.L. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa // *Science*. 2015. V. 349. P. 860–864.
- Lemfack M.C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., Piechulla B. mVOC: a database of microbial volatiles // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 1. P. 744–748.

- Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production // *Nature*. 2016. V. 529. P. 84–87.
- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses // In *Water, radiation, salt, and other stresses* (Vol. 2), Elsevier: Academic Press. 2015.
- Lefevre H., Bauters L., Gheysen G. Salicylic acid biosynthesis in plants // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. 338.
- Lefort V., Desper R., Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program // *Mol. Biol. Evol.* 2015. 32. P. 2798–2800.
- Leon J., Shulaev V., Yalpani N., Lawton M.A., Raskin I. Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 10413–10417.
- Li Y., Shi H., Zhang H., Chen S. Amelioration of drought effects in wheat and cucumber by the combined application of super absorbent polymer and potential biofertilizer // *PeerJ*. 2019. V. 7. e6073.
- Li A., Sun X., Liu L. Action of salicylic acid on plant growth // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. 878076.
- Liu X., Meng J., Starkey S., Smith C.M. Wheat gene expression is differentially affected by a virulent Russian wheat aphid biotype // *J. Chem. Ecol.* 2011. V. 37. P. 472–482.
- Liu F., Xing S., Ma H., Du Z., Ma B. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 9155–9164.
- Liu H., Carvalhais L.C., Crawford M., Singh E., Dennis P.G., Pieterse C.M., Schenk P.M. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. 2552.
- Liu Q., Luo L., Zheng L. Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 335.
- Liu C., Yu H., Rao X., Li L., Dixon R.A. Absciscic acid regulates secondary cell-wall formation and lignin deposition in *Arabidopsis thaliana* through phosphorylation of NST1 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2021. V. 118. e2010911118.

- Liu J., Qiu G., Liu C., Li H., Chen X., Fu Q., Lin Y., Guo B. Salicylic acid, a multifaceted hormone, combats abiotic stresses in plants // *Life*. 2022. V. 12(6). 886.
- Liu H., Li J., Singh B.K. Harnessing co-evolutionary interactions between plants and *Streptomyces* to combat drought stress // *Nature Plants*. 2024. V. 10. P. 1159–1171.
- Llanes A., Andrade A., Alemano S., Luna V. Alterations of endogenous hormonal levels in plants under drought and salinity // *Am. J. Plant Sci*. 2016. V. 7. P. 1357–1371.
- Lu S., Friesen T.L., Faris J.D. Molecular characterization and genomic mapping of the pathogenesis-related protein 1 (PR-1) gene family in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Mol. Genet. Genom*. 2011. V. 285. P. 485–503.
- Lubyanova A.R., Bezrukova M.V., Shakirova F.M. Involvement of nitric oxide in methyl jasmonate-mediated regulation of water metabolism in wheat plants under drought stress // *Stresses*. 2022. V. 2. P. 477–492.
- Lubyanova A.R., Allagulova C.R., Lastochkina O.V. 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 // *Plants*. 2023. V. 12. 2684.
- Lugtenberg B.J., Dekkers L., Bloemberg G.V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* // *Annu. Rev. Phytopathol*. 2001. V. 39. P. 461–490.
- Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria // *Annu. Rev. Microbiol*. 2009. V. 63. P. 541–556.
- Lopes R., Cerdeira L., Tavares G.S., Ruiz J.C., Blom J., Horacio E.C.A., Mantovani H.C., de Queiroz M.V. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogen // *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2017. V. 33. 185.
- Łozowicka B., Wolejko E., Kaczyński P., Konecki R., Iwaniuk P., Drągowski W., Jabłońska-Trypuć A. Effect of microorganism on behaviour of two commonly used herbicides in wheat/soil system // *Appl. Soil Ecol*. 2021. V. 162. 103879.
- Ma Y., Rajkumar M., Zhang C., Freitas H. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation // *J. Environ. Manage*. 2016. V. 174. P. 14–25.

- Ma Y., Zhang C., Oliveira R.S., Freitas H., Luo Y. Bioaugmentation with endophytic bacterium E6S homologous to *Achromobacter piechaudii* enhances metal rhizoaccumulation in host *Sedum plumbizincicola* // Front. Plant. Sci. 2016a. V. 7. 75.
- Ma Y. Beneficial bacteria for disease suppression and plant growth promotion // In Plant-microbe interactions in agroecological perspectives (Singh, D., Singh, H., Prabha, R., Eds.); Springer: Singapore, 2017; pp. 513–529.
- Ma L., Lu Y., Yan H., Wang X., Yi Y., Shan Y., Liu B., Zhou Y., Lu X. Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from *Bacillus methylotrophicus* // BMC Biotechnol. 2020. V. 20. P. 1–13.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sa T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) // Chemosphere. 2007. V. 69(2). P. 220–228.
- Mageshwaran V., Gupta R., Singh S., Sahu P.K., Singh U.B., Chakdar H., Bagul S.Y., Paul S., Singh H.V. Endophytic *Bacillus subtilis* antagonize soil-borne fungal pathogens and suppress wilt complex disease in chickpea plants (*Cicer arietinum* L.). Front. Microbiol. 2022. 13. 994847.
- McAlpine J.B., Bachmann B.O., Pirae M., Tremblay S., Alarco A.M., Zazopoulos E., Farnet S.M. Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example // J. Nat. Prod. 2005. V. 68. P. 493–496.
- Maksimov I., Khairullin R. The role of *Bacillus* bacterium in formation of plant defense: Mechanism and reaction // The Handbook Microbial. Biores. 2016. P. 56–80.
- Maksimov I.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Veselova S.V., Alekseev V.Y., Shein M.Y., Avalbaev A.M., Dhaware P.D., Mehetre G.T., Singh B.P. Mechanisms of plant tolerance to RNA viruses induced by plant growth-promoting microorganisms // Plants. 2019. V. 8(12). 575.
- Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Sarvarova S.D., Rumyantsev V., Alekseev Y., Khayrulli R.M. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene Btcry1Ia encoding Cry1Ia toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond // Biol. Control. 2020. V. 144. 104242.

- Malfanova N., Kamilova F., Validov S., Shcherbakov A., Chebotar V., Tikhonovich I., Lugtenberg B. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed // Microb. biotech. 2011. V. 4(4). P. 523–532.
- Malfanova N., Franzil L., Lugtenber B., Chebotar V., Ongena M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8 // Arch. Microbiol. 2012. V. 194. P. 893–899.
- Malik D.K., Sindhu S.S. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*) // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2011. V. 17(1). P. 25–32.
- Mansour M.M.F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress // Biol. Plant. 2000. V. 43. P. 491–500.
- Manulis S., Haviv-Chesner A., Brandl M.T., Lindow S., Barash I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* // Mol. Plant-Microbe Interact. 1998. V. 11. P. 634–642.
- Manjunatha B.S., Nivetha N., Krishna G.K., Elangovan A., Pushkar S., Chandrashekar N., et al. Plant growth-promoting rhizobacteria *Shewanella putrefaciens* and *Cronobacter dublinensis* enhance drought tolerance of pearl millet by modulating hormones and stress-responsive genes // Physiol. Plant. 2022. V. 174. e13676.
- Marček T., Hamow K., Végh B., Janda T., Darko E. Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes // PLoS ONE. 2019. V. 14. e0212411.
- Martynenko E., Arkhipova T., Safronova V., Seldimirova O., Galin I., Akhtyamova Z., Veselov D., Ivanov R., Kudoyarova G. Effects of phytohormone-producing rhizobacteria on casparian band formation, ion homeostasis and salt tolerance of durum wheat // Biomolecules. 2022. V. 12(2). 230.
- Martinez R.M. *Bacillus subtilis* // Brenner's Encycloped. Genet. 2013. P. 246–248.
- Martinez-Medina A., Flors V., Heil M., Mauch-Mani B., Pieterse C.M.J., Pozo M.J., Ton J., van Dam N.M., Conrath U. Recognizing plant defense priming // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. № 10. P. 818–822.

- Maslennikova D., Lastochkina O. Contribution of ascorbate and glutathione in endobacteria *Bacillus subtilis*-mediated drought tolerance in two *Triticum aestivum* L. genotypes contrasting in drought sensitivity // *Plants*. 2021. V. 10(12). 2557.
- Maslennikova D., Koryakov I., Yuldashev R., Avtushenko I., Yakupova A., Lastochkina O. Endophytic plant growth-promoting bacterium *Bacillus subtilis* reduces the toxic effect of cadmium on wheat plants // *Microorganisms*. 2023. V. 11(7). 1653.
- Meena K.K., Bitla U.M., Sorty A.M., Singh D.P., Gupta V.K., Wakchaure G.C., Kumar S. Mitigation of salinity stress in wheat seedlings due to the application of phytohormone-rich culture filtrate extract of methylotrophic actinobacterium *Nocardioides* sp. NIMMe6 // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. 2091.
- Mendoza-Alatorre M., Infante-Ramírez R., González-Rangel M.O. et al. Enhancing drought stress tolerance and growth promotion in chiltepin pepper (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) through native *Bacillus* spp. // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. 15383.
- Mengistu A.A. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism // *Int. J. Microbiol.* 2020. V. 1. 6927219.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinformatics*. 2013. V. 14. 60.
- Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genomebased taxonomy // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. 2182.
- Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J., Peinado-Olarte R.L., Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes // *Nucleic Acid Res.* 2022. V. 50. P. D801–D807.
- Meier M.A., Xu G., Lopez-Guerrero M.G., Li G., Smith C., Sigmon B. Association analyses of host genetics, root-colonising microbes, and plant phenotypes under different nitrogen conditions in maize // *Elife*. 2022. V. 11. e75790.
- Mickky B., Aldesuquy H., Elnajar M. Effect of drought on yield of ten wheat cultivars linked with their flag leaf water status, fatty acid profile and shoot vigor at heading // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2020. V. 26. P. 1111–1117.

- Miller M.R., Norsworthy J.K. Influence of soil moisture on absorption, translocation, and metabolism of florypyrauxifenbenzyl // *Weed Sci.* 2018. V. 66. P. 418–423.
- Miljakovic D., Marinkovic J., Balesevic-Tubic S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops // *Microorganisms*. 2020. V. 8. 1037.
- Mingot-Ureta C., Lopez-Moya F., Lopez-Llorc L.V. Isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* are endophytic in banana roots and promote plant growth // *Agronomy*. 2020. V. 10. 1299.
- Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // *Protoplasma*. 2001. V. 217. P. 125–128.
- Mironenka J., Różalska S., Bernat P. Potential of *Trichoderma harzianum* and its metabolites to protect wheat seedlings against *Fusarium culmorum* and 2,4-D // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. 13058.
- Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination // *Tr. Plant Sci.* 2006. V. 11(1). P. 15–19.
- Mitter B., Petric A., Shin M.W., Chain P.S., Hauberg-Lotte L., Reinhold-Hurek B., Nowak J., Sessitsch A. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants // *Front. Plant. Sci.* 2013. V. 4. 120.
- Miura K., Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. 4.
- Mnif I., Ghribi D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management // *Crop Prot.* 2015. V. 77. P. 52–64.
- Morales M., Munné-Bosch S. Malondialdehyde: Facts and artifacts // *Plant Physiol.* 2019. V. 180. 1246.
- Moura J.C.M.S., Bonine C.A.V., Viana J.O.F., Dornelas M.C., Mazzafera P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. 360.

- Mukhopadhyay R., Sarkar B., Jat H.S., Sharma P.C., Bolan N.S. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security // J. Environ. Manage. 2021. V. 280. e111736.
- Mukherjee S.D., Batagello C., Adler A., Agudelo J., Zampini A., Suryavanshi M., Miller A.W. Complex system modeling reveals oxalate homeostasis is driven by diverse oxalate-degrading bacteria // Elife. 2025. V. 14. RP104121.
- Munakata Y., Heuson E., Daboudet T., Deracinois B., Duban M., Hehn A., Slezack-Deschaumes S. Screening of antimicrobial activities and lipopeptide production of endophytic bacteria isolated from vetiver roots // Microorganisms. 2022. V. 10(2). 209.
- Mundt J.O., Hinkle N. F. Bacteria within ovules and seeds // Applied and Environmental Microbiology. 1976. V. 32(5). P. 694–698.
- Nascimento F.X., Rossi M.J., Soares C.R., McConkey B.J., Glick B.R. New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance // PLoS ONE. 2014. V. 9. e99168.
- Nannan C., Vu H.Q., Gillis A., Caulier S., Nguyen T.T.T., Mahillon J. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against gram-negative foodborne pathogens // J. Biotechnol. 2021. V. 327. P. 28–35.
- Narayanasamy S., Thankappan S., Kumaravel S., Ragupathi S., Uthandi S. Complete genome sequence analysis of a plant growth-promoting phylloplane *Bacillus altitudinis* FD48 offers mechanistic insights into priming drought stress tolerance in rice // Genomics. 2023. 110550.
- Naorem R. *Bacillus subtilis* strain: MBB3B9_DBT-NECAB genome sequencing // NCBI Accession PRJNA786394. Assam Agricultural University. 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA786394>
- Naveed M., Hafeez S., Rafique M., Mumtaz M.Z., Subhani Z., Holatko J., Hammerschmiedt T., Malicek O., Mustafa A., Kintl A., Brtnicky B. Plant-endophyte mediated improvement in physiological and bio-protective abilities of marigold (*Tagetes patula*) // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. 993130.
- Naylor D., Coleman-Derr D. Drought stress and root-associated bacterial communities // Front. Plant Sci. 2018. V. 8.

- Naz I., Bano A., Ul-Hassan T. Isolation of phytohormones producing plant growth promoting rhizobacteria from weeds growing in Khewra salt range, Pakistan and their implication in providing salt tolerance to *Glycine max* L // Afr. J. Biotechnol. 2009. V. 8. P. 5762–5766.
- Nedukha O. Tolerance of plant cell wall to environment // In Advances in plant defense mechanisms; IntechOpen: London, UK, 2022.
- Negrão S., Schmöckel, S.M., Tester M.J.A.O.B. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress // Ann. Bot. 2017. V. 119(1). P. 1–11.
- Niinemets Ü. Mild versus severe stress and BVOCs: thresholds, priming and consequences // Tr. Plant Sci. 2010. V. 15. № 3. P. 145–153.
- Noman M., Ahmed T., Ijaz U., Shahid M., Li D., Manzoor I., Song F. Plant-microbiome crosstalk: dawning from composition and assembly of microbial community to improvement of disease resilience in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22(13). 6852.
- Numan M., Bashir S., Khan Y., Mumtaz R., Shinwari Z.K., Khan A.L., Khan A., AL-Harrasi A. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review // Microbiol. Res. 2018. V. 209. P. 21–32.
- Nuzhnaya T.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Maksimov I.V., Veselova S.V. The role of cytokinins and abscisic acid in the growth, development and virulence of the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum* (Berk.) // Biomolecules. 2024. V. 14(5). 517.
- Oberhaensli T., Defago G., Haas D. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase // J. Gen. Microbiol. 1991. V. 137. P. 2273–2279.
- Ojuederie O., Olanrewaju O., Babalola O. Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: implications for sustainable agriculture // Agronomy. 2019. V. 9. 712.
- Olmo R., Wetzels S.U., Armanhi J.S.L., Arruda P., Berg G., Cernava T., Cotter P.D., Araujo S.C., de Souza R.S.C., Ferrocino I., Frisvad J.C., Georgalaki M., Hansen H.H., Kazou M., Kiran G.S., Kostic T., Krauss-Etschmann S., Kriaa A., Lange L., Maguin E., Mitter B., Nielsen M.O., Olivares M., Quijada N.M., Romaní-Pérez M., Sanz Y., Schlöter M., Schmitt-Kopplin P., Seaton S.C., Selvin J., Sessitsch A., Wang M., Zwirzitz B., Selberherr E.,

- Wagner M. Microbiome research as an effective driver of success stories in agrifood systems – A selection of case studies // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. 834622.
- Omae N., Tsuda K. Plant-microbiota interactions in abiotic stress environments // *MPMI.* 2022. V. 35. P. 511–526.
- Ongena M., Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol // *Tr. Microbiol.* 2008. V. 16(3). P. 115–125.
- Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., López-Bucio J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling // *Plant Signal. Behav.* 2008. V. 3. P. 263–265.
- Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Rudikovskaya E.G., Pomortsev A.V., Muzalevskaya O.V., Pshenichnikova T.A. Chlorophyll metabolism and photosynthetic performance in Triticale under drought stress // *Plants.* 2023. V. 12(15). 2851.
- Oyedoh O.P., Compant S., Doty S.L., Santoyo G., Glick R.G., Babalola O.O. Root colonizing microbes associated with notable abiotic stress of global food and cash crops // *Plant Stress.* 2025. V. 15. 100714.
- Ozturk M., Turkyilmaz U.B, Garcia-Caparros P., Khursheed A., Gul A., Hasanuzzaman M. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants // *Physiol. Plant.* 2021. V. 172. P. 1321–1335.
- Palmisano M.M., Nakamura L.K., Duncan K.E., Istock C.A., Cohan F.M. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. P. 1671–1679.
- Palmieri D., Vitale S., Lima G., Di Pietro A., Turrà D. A bacterial endophyte exploits chemotropism of a fungal pathogen for plant colonization // *Nat. Commun.* 2020. V. 11(1). P. 1–11.
- Pandey P.K., Singh M.C., Singh S.S., Kumar M., Pathak M., Shakywa R.C., Pandey A.K. Inside the plants: endophytic bacteria and their functional attributes for plant growth promotion // *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2017. V. 6(2). P. 11–21.
- Panpatte D.G., Shukla Y.M., Shelat H.N., Vyas, R.V., Jhala Y.K. Microbes for sustainable crop production // In *Microorganisms for green revolution* (Ed. D.G. Panpatte, Y.K. Jhala, R.V. Vyas, H.N. Shelat). Singapore: Springer, 2017. 443 p.

- Park Y.G., Mun B.G., Kang S.M., Hussain A., Shahzad R., Seo C.W., Kim A.Y., Lee S.U., Oh K.Y., Lee D.Y., Lee I.J., Yun B.-W. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones // PLoS ONE. 2017. V. 12. e0173203.
- Pascual L.S., Segarra-Medina C., Gómez-Cadenas A., López-Climent M.F., Vives-Peris V., Zandalinas S.I. Climate change-associated multifactorial stress combination: a present challenge for our ecosystems // J. Plant Physiol. 2022. V. 276. 153764.
- Patten C.L., Glick B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // Can. J. Microbiol. 1996. V. 42. P. 207–220.
- Paterson J., Jahanshah G., Li Y., Wang Q., Mehnaz S., Gross H. The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 93(3). fiw249.
- Patel P.S., HuANG S., Fisher S., Pirnik D., Aklonis C., Dean L., Meyers E., Fernandes P., Mayerl F. Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity // J. Antibiot. 1995. V. 48. № 9. P. 997–1003.
- Paul G.K., Mahmud S., Dutta A.K., Sarkar S., Laboni A.A., Hossain S., Nagata A., Karmaker P., Razu M.H., Kazi T., Uddin S., Zaman S., Islam S., Khan M., Saleh A. Volatile compounds of *Bacillus pseudomyoides* induce growth and drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Sci. Rep. 2022. V. 12. 19137.
- Pavlicek A. Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap\jackknife analysis of tree robustness. Appl. RAPD analysis genus // Frenkelia Folia Biol. (Praha). 1999. V. 45(3). P. 97–99.
- Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C., Bakker P.A. Induced systemic resistance by beneficial microbes // Ann. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52(1). P. 347–375.
- Pishchik V.N., Vorobyev N.I., Moiseev K.G., Sviridova O.V., Surin V.G. Influence of *Bacillus subtilis* on the physiological state of wheat and the microbial community of the soil under different rates of nitrogen fertilizers // Eur. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 77–84.

- Pishchik V.N., Filippova P.S., Mirskaya G.V., Khomyakov Y.V., Vertebny V.E., Dubovitskaya V.I., Ostankova Y.V., Semenov A.V., Chakrabarty D., Zuev E.V., Chebotar V.K. Epiphytic PGPB *Bacillus megaterium* AFI1 and *Paenibacillus nicotianae* AFI2 improve wheat growth and antioxidant status under Ni stress // *Plants*. 2021. V. 10(11). 2334.
- Pikovskaya R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species // *Mikrobiologiya*. 1948. V. 17. P. 362–370.
- Pedersen O., Sauter M., Colmer T.D., Nakazono M. Regulation of root adaptive anatomical and morphological traits during low soil oxygen // *New Phytologist*. 2021. V. 229(1). P. 42–49.
- Pedrosa F.O., Monteiro R.A., Wassem R., Cruz L.M., Ayub R.A., Colauto N.B., Fernandez M.A., M.H.P. Fungaro, Grisard E.C., Hungria M., Madeira H.M.F., Nodari R.O., Osaku C.A., Petzl-Erler M.L., Terenzi H., Vieira L.G.E., Steffens M.B.R., Weiss V.A., Pereira L.F.P., Almeida M.I.M., Alves L.R., Marin A., Araujo L.M., Balsanelli E., Baura V.A., Chubatsu L.S., Faoro H., Favetti A., Friedermann G., Glienke C., Karp S., Kava-Cordeiro V., Souza E.M. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses // *PLoS Genet*. 2011. V. 7(5). e1002064.
- Pequeno D.N.L., Hernández-Ochoa I.M., Reynolds M., Sonder K., MoleroMilan A. Robertson R.D., Lopes M.S., Xiong W., Kropff M., Asseng S. Climate impact and adaptation to heat and drought stress of regional and global wheat production // *Env. Res. Lett*. 2021. V. 16(5). 054070.
- Provorov N.A., Tikhonovich I.A. Agricultural microbiology and symbiogenetics: synthesis of classical ideas and construction of highly productive agrocenoses // *Sel'skokhoz. Biol*. 2022. V. 57. № 5. P. 821–831.
- Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H. *Azospirillum brasilense* indol-3-acetic biosynthesis: evidence for non-tryptophan dependent pathway // *Mol. PlantMicrobe Interact*. 1993. V. 6. P. 609–615.
- Priya P., Patil M., Pandey P., Singh A., Babu V., Senthil-Kumar M. Stress combinations and their interactions in plants database: a one-stop resource on combined stress responses in plants // *Plant J*. 2023. V. 116(4). P. 1097–1117.
- Poveda J., González-Andrés F. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2021. V. 105. P. 8629–8645.

- Pusenkova L., Lastochkina O., Ercişli S. The potential of hydroponic seed minituber enrichment with the endophyte *Bacillus subtilis* for improving the yield components and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) // Agriculture. 2023. V. 13(8). 1626.
- Puthiyottil P., Akkara Y. Pretreatment with *Bacillus subtilis* mitigates drought induced photo-oxidative damages in okra by modulating antioxidant system and photochemical activity // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2021. V. 27. P. 945–957.
- Quarrie S.A. Genetic variability and heritability of drought-induced abscisic acid accumulation in spring wheat // Plant Cell Environ. 1981. V. 4. P. 147–151.
- Radchenko M., Ponomareva I., Pozynych I., Morderer Y. Stress and use of herbicides in field crops // Agric. Sci. Pract. 2021. V. 8. P. 50–70.
- Rare E. Stress physiology: the functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds // J. Hortic. Sci. 1990. V. 65. P. 231–243.
- Ramandi A., Jaghargh M.B., Nourashrafeddin S.M., Seifi A. *Cupriavidus metallidurans*: a species-non-specific and multifaceted plant growth-promoting bacteria // BMC. Plant. Biol. 2024. V. 24. 1197.
- Rana K.L., Kour D., Kaur T., Devi R., Yadav A.N., Yadav N., Dhaliwal H.S., Saxena A.K. Endophytic microbes: Biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability // Antonie Van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 1075–1107.
- Rana K.L., Negi R., Sharma B., Yadav A., Devi R., Kaur T., Shreaz S., Rustagi S., Rai A.K., Singh S., Kour D., Yadav A.N. Potential effect of novel endophytic nitrogen fixing diverse species of *Rahnella* on growth promotion of wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Crop Sci. Biotechnol. 2024. V. 27. P. 605–615.
- Rankenberg T., Geldhof B. van Veen H., Holsteens K., Van de Poel B., Sasidharan R. Age-dependent abiotic stress resilience in plants // Tr. Plant Sci. 2021. V. 26(7). P. 692–705.
- Rabbee M.F., Ali M.S., Choi J., Hwang B.S., Jeong S.C., Baek K.H. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes // Molecules. 2019. V. 24:1046.
- Rafiq I., Reshi Z.A. Global meta-analysis of endophytic inoculation effects on seed germination, seedling growth, and nutrient uptake of trees // Rhizosphere. 2025. V. 34. 101079.

- Raza W., Wang J., Wu Y., Ling N., Wei Z., Huang Q., Shen Q. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 17. P. 7639–7650.
- Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1996. V. 110. P. 125–136.
- Rashid U., Yasmin H., Hassan M.N., Naz R., Nosheen A., Sajjad M., Ilyas N., Keyani R., Jabeen Z., Mumtaz S., Alyemeni M.N., Ahmad P. Drought-tolerant *Bacillus megaterium* isolated from semi-arid conditions induces systemic tolerance of wheat under drought conditions // Plant Cell Rep. 2021. P. 1–21.
- Raheem A., Shaposhnikov A., Belimov A.A., Dodd I.C., Ali B. Auxin production by rhizobacteria was associated with improved yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress // Arch. Agron. Soil Sci. 2018. V. 64. P. 574–587.
- Rho H., Doty S.L., Kim S.H. Estimating microbial respiratory CO₂ from endophytic bacteria in rice // Plant Signal. Behav. 2018. V. 13(8). e1500067.
- Romero F.M., Marina M., Pieckenstein F.L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 351. P. 187–194.
- Rooney A.P., Price N.P., Ehrhardt C., Swezey J.L., Bannan J.D. Phylogenetic and genomic analysis of the genus *Bacillus sensu lato* reveals multiple independent paths to solvent tolerance // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75(21). P. 6969–6983.
- Rowe J.H., Topping J.F., Liu J., Lindsey K. Absciscic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin // N. Phytol. 2016. V. 211. P. 225–239.
- Redman R.S., Kim Y.O., Woodward C.J., Greer C., Espino L., Doty S.L., Rodriguez R.J. Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: A strategy for mitigating impacts of climate change // PLoS ONE. 2011. V. 6. e14823.
- Rehman A., Azhar M.T., Hinze L., Qayyum A., Li H., Peng Z., Qin G., Jia Y., Pan Z., He S., Du X. Insight into absciscic acid perception and signaling to increase plant tolerance to abiotic stress // J. Plant Interact. 2021. V. 16(1). P. 222–237.

- Riaz M.W., Yousaf M.I., Hussain Q., Yasir M., Sajjad M., Shah L. Role of lignin in wheat plant for the enhancement of resistance against lodging and biotic and abiotic stresses // *Stresses*. 2023. V. 3. P. 434–453.
- Ruban A.V. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage // *Plant Physiol*. 2016. V. 170(4). P. 1903–1916.
- Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Burkhanova G.F., Alekseev V.Y., Maksimov I.V. *Bacillus subtilis* 26D triggers induced systemic resistance against *Rhopalosiphum padi* L. by regulating the expression of genes AGO, DCL and microRNA in bread spring wheat // *Microorganisms*. 2023. V. 11(12). 2983.
- Russo A., Carrozza G.P., Vettori L., Felici C., Cinelli F., Toffanin A. Plant beneficial microbes and their application in plant biotechnology // *Innov. Biotechn.* 2012. P. 57–72.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Paré P.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2004. V. 134. № 3. P. 1017–1026.
- Safronova V., Sazanova A., Belimov A., Guro P., Kuznetsova I., Karlov D., Tikhonovich, I. Synergy between rhizobial co-microsymbionts leads to an increase in the efficiency of plant-microbe interactions // *Microorganisms*. 2023. V. 11(5). 1206.
- Salazar F., Ortiz A., Sansinenea E. Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2017. V. 11. P. 177–182.
- Salehinia S., Didaran F., Aliniaieifard S., Macpherson S., Orsat V., Lefsrud M. Effects of different light spectra and intensities on stomatal function in lettuce and basil // *J. Hortic. Res.* 2025. V. 33(1).
- Salem G., Stromberger M.E., Byrne P.F., Manter D.K., El-Feki W., Weir T.L. Genotype-specific response of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) to irrigation and inoculation with ACC deaminase bacteria // *Rhizosphere*. 2018. V. 8. P. 1–7.
- Salomon M.V., Bottini R., de Souza Filho G.A., Cohen A.C., Moreno D., Gil M., Piccoli P. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce

- abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine // *Physiol. Plant.* 2014. V. 151. P. 359–374.
- Samish Z., Etinger-Tulczynska R., Bick M. Microflora within healthy tomatoes // *Applied Microbiology.* 1961. V. 9(1). P. 20–25.
- Samish Z., Etinger-Tulczynska R., BICK M. The microflora within the tissue of fruits and vegetables // *Journal of Food Science.* 1963. V. 28(3). P. 259–266.
- Sankarasubramanian H. Whole genome sequence of *Bacillus subtilis*, Bbv57 // NCBI Accession PRJNA794929. Tamil Nadu Agricultural University. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA794929/>
- Saradadevi R., Palta J.A., Siddique K.H.M. ABA-mediated stomatal response in regulating water use during the development of terminal drought in wheat // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. 1251.
- Sarma R.K., Saikia R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21 // *Plant Soil.* 2014. V. 377. P. 111–126.
- Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores // *Anal. Biochem.* 1987. V. 160(1). P. 47–56.
- Sedlarova M., Lebeda A. Histochemical detection and role of phenolic compounds in the defense response of *Lactuca* spp. to lettuce downy mildew (*Bremia lactacae*) // *J. Phytopathology.* 2001. V. 149. P. 693–697.
- Selye H. Stress and the general adaptation syndrome // *British Medical J.* 1950. V. 1(4667). 1383.
- Selye H. The stress of life. New York: McGraw-Hill. 1956.
- Selye H. Stress in health and disease. Boston: Butterworths. 1976.
- Senol M., Nadaroglu H., Dikbas N., Kotan R. Purification of chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum* // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2014. V. 12. P. 13–35.
- Serino L., Reimann C., Baur H., Beyeler M., Visca P., Haas D. Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa* // *Mol. Genet. Genom.* 1995. V. 249. P. 217–228.
- Sessitsch A., Hardoim P., Döring J., Weilharter A., Krause A., Woyke T., Mitter B., HaubergLotte L., Friedrich F., Rahalkar M., Hurek T., Sarkar A., Bodrossy L., van

- Overbeek L., Brar D., van Elsas J.D., Reinhold-Hurek B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis // MPMI. 2012. V. 25(1). P. 28–36.
- Shahzad R., Waqas M., Khan A.L., Asaf S., Khan M.A., Kang S.-M., Yun B.-W., Lee I.-J. Seedborne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa* // Plant Physiol. Biochem. 2016. V. 106. P. 236–243.
- Shaymullina G.K., Safin R.I., Egorova O.A., Valiev A.R., Kalimullin M.N. Influence of endophytic *Bacillus* bacteria on the growth and stress tolerance of spring wheat and soybean seedlings // Russ. Agricult. Sci. 2024. V. 50. P. 668–673.
- Sicuia O.A., Dinu S., Topa S.I., Dima R., Cornea C.P. The genus *Bacillus* and novel *Bacillus*-like bacteria // Biointerface Res. Appl. Chem. 2015. V. 5(6). P. 1036–1046.
- Siddiqui M.H., Alamri S.A., Al-Khaishany M.Y.Y., Al-Qutami M.A., Ali H.M., Khan M.N. Sodium nitroprusside and indole acetic acid improve the tolerance of tomato plants to heat stress by protecting against DNA damage // J. Plant Interact. 2017. V. 12. P. 177–186.
- Siddiqui R.A., Singh T.P., Rani M., Sogi D.S., Bhat M.A. Diversity in grain, flour, amino acid composition, protein profiling, and proportion of total flour proteins of different wheat cultivars of North India // Front. Nutr. 2020. V. 7. 141.
- Silambarasan S., Logeswari P., Cornejo P., Kannan V.R. Role of plant growth-promoting rhizobacterial consortium in improving the *Vigna radiata* growth and alleviation of aluminum and drought stresses // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 27647–27659.
- Silambarasan S., Logeswari P., Sivaramakrishnan R., Cornejo P., Sipahutar M.K., Pugazhendhi A. Amelioration of aluminum phytotoxicity in *Solanum lycopersicum* by co-inoculation of plant growth promoting *Kosakonia radicincitans* strain CABV2 and *Streptomyces corchorusii* strain CASL5 // Sci. Total Environ. 2022. V. 832. 154935.
- Singh D.P., Singh V., Gupta V.K., Shukla R., Prabha R., Sarma B.K., Patel J.S. Microbial inoculation in rice regulates antioxidative reactions and defense related genes to mitigate drought stress // Sci. Rep. 2020. V. 10. 4818.
- Singh R.P., Ma Y., Shadan A. Perspective of ACC-deaminase producing bacteria in stress agriculture // J. Biotechnol. 2022. V. 352. P. 36–46.

- Singh A., Roychoudhury A. Absciscic acid in plants under abiotic stress: Crosstalk with major phytohormones // *Plant Cell Rep.* 2023. V. 42(6). P. 961–974.
- Singh D., Dhiman V.K., Pandey H., Dhiman V.K., Pandey D. Crosstalk between salicylic acid and auxins, cytokinins and gibberellins under biotic stress // In *Auxins, cytokinins and gibberellins signaling in plants*. Cham: Springer International Publishing. 2022. pp. 249–262.
- Singha K.M., Pandey P. Endophytic bacteria with host-supportive genetic determinants in their genomes induce growth and antioxidant activity related gene functions in transcriptome of black rice (*Oryza sativa* L.) // *Environ. Exp. Bot.* 2023. V. 213. 105396.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants // *Biotechnol. Adv.* 2014. V. 32(1). P. 2–11.
- Sood G., Kaushal R., Sharma M. Significance of inoculation with *Bacillus subtilis* to alleviate drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Vegetos.* 2020. V. 33. P. 782–792.
- Sofy M.R., Aboseidah A.A., Heneidak S.A., Ahmed H.R. ACC deaminase containing endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Pisum sativum* through reduced oxidative damage and induction of antioxidative defense systems // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021. V. 28. 40971.
- Solecka D., Kacperska A. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold // *Physiol. Plant.* 2003. V. 119. P. 253–262.
- Soltani J., Samavati R., Jalili B., Bagheri H., Hamzei J. Halotolerant endophytic bacteria from desert-adapted halophyte plants alleviate salinity stress in germinating seeds of the common wheat *Triticum aestivum* L. // *Cereal Res. Commun.* 2023. V. 11. P. 1–11.
- Sorokan A., Cherepanova E., Burkhanova G., Veselova S., Rummyantsev S., Alekseev V., Maksimov I. Endophytic *Bacillus* spp. as a prospective biological tool for control of viral diseases and non-vector *Leptinotarsa decemlineata* Say. in *Solanum tuberosum* L // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. 569457.
- Sorokan A., Veselova S., Benkovskaya G., Maksimov I. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26D increases levels of phytohormones and repairs growth of potato plants after Colorado potato beetle damage // *Plants.* 2021. V. 10(5). 923.

- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 425–448.
- Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol. Microbiol. 2005. V. 56. P. 845–857.
- Stoll A., Salvatierra-Martínez R., González M., Araya M. The role of surfactin production by *Bacillus velezensis* on colonization, biofilm formation on tomato root and leaf surfaces and subsequent protection (ISR) against *Botrytis cinerea* // Microorganisms. 2021. V. 9(11). 2251.
- Su Y., Liu C., Fang H., Zhang D. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine // Microb. Cell Fact. 2020. V. 19. 173.
- Sudakov K., Rana A., Faigenboim-Doron A., Gordin A., Carmeli S., Shimshoni J.A., Cytryn E., Minz D. Diverse effects of *Bacillus* sp. NYG5-emitted volatile organic compounds on plant growth, rhizosphere microbiome, and soil chemistry // Microbiol. Res. 2025. V. 295. 128089.
- Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Fatkhutdinova D.R. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity // Plant Sci. 2003. V. 164. P. 317–322.
- Shakirova F.M., Kildibekova A.R., Bezrukova M.V., Avalbaev A.M. Wheat germ agglutinin regulates cell division in wheat seedling roots // Plant Growth Regul. 2004. V. 42. P. 175–180.
- Shakirova F.M. Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and antistress action of salicylic acid // In Salicylic acid: A plant hormone (Hayat S., Ahmad A., Eds.); Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007.
- Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V., Kudoyarova G.R. Role of endogenous hormonal system in the realization of the antistress action of plant growth regulators on plants // Plant Stress. 2010. V. 4. P. 32–38.
- Shakirova F., Avalbaev A., Bezrukova M., Fatkhutdinova R., Maslennikova D., Yuldashev R., Allagulova C., Lastochkina O. Hormonal intermediates in the protective action of exogenous phytohormones in wheat plants under salinity // In Phytohormones and abiotic

- stress tolerance in plants (Eds.: Khan N., Nazar R., Iqbal N., Anjum N.). Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; pp. 185–228.
- Shakirova F.M., Allagulova C.R., Maslennikova D.R., Klyuchnikova E.O., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V. Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity in wheat plants // *Environ. Exp. Bot.* 2016. V. 122. P. 19–28.
- Shanmugam P., Narayanasamy M. Optimization and production of salicylic acid by rhizobacterial strain *Bacillus licheniformis* MML2501 // *Int. J. Microbiol.* 2008. V. 6(1). P. 1–8.
- Sharma A., Kapoor D., Gautam S., Landi M., Kandhol N., Araniti F., Ramakrishnan M., Satish L., Singh V.P., Sharma p., Bhardwaj R., Tripathi D.K., Zheng B. Heavy metal induced regulation of plant biology: Recent insights // *Physiol. Plant.* 2022. V. 174(3). e13688.
- Sharipova G.V., Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Timergalin M.D., Wilkinson S. Effect of ethylene perception inhibitor on growth, water relations, and abscisic acid content in wheat plants under water deficit // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 573–580.
- Shahid M., Khan M.S. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities // *Biotech.* 2018. V. 8. 131.
- Shahzad R., Khan A.L., Bilal S., Asaf S., Lee I.J. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. 24.
- Shahzad A., Hameed S., Qin M., Li H., Zafar S., Siddiqui S., Sattar S., Mahmood Z., Mehwish S. Cadmium (Cd) detoxification and activation of plant defense enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) through the use of endophytic *Bacillus thuringiensis* and *Salix alba* root powder // *Env. Pollut.* 2025. V. 364(1). 125147.
- Shi Y., Yang H., Zhang T., Lou K. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 6375–6385.
- Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Functions of reactive oxygen species in plant cells under normal conditions and during adaptation // *Ecol. Genet.* 2021. V. 19(4). P. 343–363.

- Schmid-Siebert E., Loscos J., Farmer E.E. Inducible malondialdehyde pools in zones of cell proliferation and developing tissues in *Arabidopsis* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. 8954.
- Shukla N., Awasthi R.P., Rawat L., Kumar J. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 54. P. 78–88.
- Skelton J.J., Ma R., Riechers D.E. Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) control under drought stress with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and glyphosate // Weed Biol. Manag. 2016. V. 16. P. 34–41.
- Svolacchia N., Sabatini S. Cytokinins // Curr. Biol. 2023. V. 33(1). R10-R13.
- Szymańska S., Borruso L., Brusetti L., Hulisz P., Furtado B., Hryniewicz K. Bacterial microbiome of root-associated endophytes of *Salicornia europaea* in correspondence to different levels of salinity // Env. Sci. Pollut. Res. 2018. V. 25. P. 25420–25431.
- Tao L., Yu G., Chen H., Wang B., Jiang L., Han X., Lin G., Cheng X.G. SIDREB2 gene specifically recognising to the universal DRE elements is a transcriptional activator improving drought tolerance in tomato // Sci. Hortic. 2022. V. 295. 110887.
- Tamošiūnė I., Stanienė G., Haimi P., Stanys V., Rugienius R., Baniulis D. Endophytic *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. modulate apple shoot growth, cellular redox balance, and protein expression under in vitro conditions // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. e889.
- Tang J., Li Y., Zhang L., Mu J., Jiang Y., Fu H., Zhang Y., Cui H., Yu X., Ye Z. Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms // Microorganisms. 2023. V. 11. 2077.
- Tatar Ö., Brück H., Asch F. Atmospheric and soil water deficit induced changes in chemical and hydraulic signals in wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Agron. Crop Sci. 2023. V. 209. P. 242–250.
- Taiz L., Zeiger E. Plant Physiology, 5th Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. "The initial responses of plants to stress are generally non-specific, involving the activation of a variety of protective mechanisms." 2010.
- Tian B.-Y., Cao Y., Zhang K.-Q. Metagenomic insights into communities, functions of endophytes and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots // Sci. Rep. 2015. V. 5(1). 17087.

- Timmusk S., Abd El-Daim I.A., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., Stenström E., Niinemets Ü. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles // PLoS ONE 2014. V. 9. e96086.
- Timergalin M.D., Feoktistova A.V., Rameev T.V., Kudoyarova G.R., Chetverikov S.P. Role of auxin- producing bacteria in overcoming the stress of wheat plants under treatment with the herbicide Chistalan // Agrochemistry. 2020. V. 11. P. 35–40.
- Tran T.P.H., Wang S.-L., Nguyen V.B., Tran D.M., Nguyen D.S., Nguyen A.D. Study of novel endophytic bacteria for biocontrol of black pepper root-knot nematodes in the central highlands of Vietnam // Agronomy. 2019. V. 9. 714.
- Tran C., Cock I.E., Chen X., Feng Y. Antimicrobial *Bacillus*: metabolites and their mode of action // Antibiotics. 2022. V. 11. 88.
- Truyens S., Weyens N., Cuypers A., Vangronsveld J. Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants // Environ. Microbiol. Rep. 2015. V. 7. P. 40–50.
- Todorova D., Sergiev I. Brankova L., Katerova Z., Shopova E., Dimitrova L. Assessment of the biochemical responses of wheat seedlings to soil drought after application of selective herbicide // Plants. 2021. V. 10. 733.
- Todorova D., Aleksandrov V., Anev S., Sergiev I. Photosynthesis alterations in wheat plants induced by herbicide, soil drought or flooding // Agronomy. 2022. V. 12. P. 1–13.
- Toral L., Rodríguez M., Béjar V., Sampedro I. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. 1315.
- Tombesi S., Nardini A., Frioni T., Soccolini M., Zadra C., Farinelli D., Poni S., Palliotti A. Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine // Sci. Rep. 2015. V. 5(1). 12449.
- Theatre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Léonard A., Lins L., Arabolaza A., Gramajo H., Gross H., Jacques P. The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. 623701.

- Thennarasu S., Lee D.K., Poon A., Kawulka K.E., Vederas J.C., Ramamoorthy A. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A // Chem. Phys. Lipids. 2005. V. 137. P. 38–51.
- Ulrich N., Nagler K., Laue M., Cockell C.S., Setlow P., Moeller R. Experimental studies addressing the longevity of *Bacillus subtilis* spores – The first data from a 500-year experiment // PloS ONE. 2018. V. 13(12). e0208425.
- van Loon L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 119. P. 243–254.
- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moëgne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. 356.
- Vadez V., Sinclair T.R., Serraj R. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean // Physiol. Plant. 2000. V. 110(2). P. 215–223.
- Vandenkoornhuyse P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont // New Phytol. 2015. V. 206. P. 1196–1206.
- Vaishnav A., Varma A., Tuteja N., Choudhary D.K. Characterization of bacterial volatiles and their impact on plant health under abiotic stress // In Volatiles and Food Security. Role of Volatiles in Agro-ecosystems (D.K. Choudhary, A.K. Sharma, P. Agarwal, A. Varma, N. Tuteja, Eds). Singapore: Springer, 2017. 373 p.
- Vaishnav A., Shukla A.K., Sharma A., Kumar R., Choudhary D.K. Endophytic bacteria in plant salt stress tolerance: Current and future prospects // J. Plant Growth Regul. 2019. V. 38. P. 650–668.
- Varshney S., Hayat S., Alyemeni M.N., Ahmad A. Effects of herbicide applications in wheat fields // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. P. 570–575.
- Vardharajula S., Zulfikar A.S., Grover M., Reddy G., Bandi V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp., effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress // J. Plant Interact. 2011. V. 6. P. 1–14.
- Vasileva E.N., Akhtemova G.A., Afonin A.M., Borisov A. Yu., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Culturable endophytic bacteria from stems and leaves of garden pea (*Pisum sativum* L.) // Ecol. Genetics. 2020. V. 18. 169.

- Veselov S., Kudoyarova G., Egutkin N., Gyuli-Zade V., Mustafina A., Kof E. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // *Physiol. Plant.* 1992. V. 86. P. 93–96.
- Veselov S.Y., Valcke R., Van Onckelen H., Kudoyarova G.R. Cytokinin content and location in the leaves of the wild-type and transgenic tobacco plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 1999. V. 46. P. 26–31.
- Veselov S.Y., Simonyan M.V. Immunoenzyme analysis of cytokinins as an assay for cytokinin oxidase activity // *Russ. J. Plant Physiol.* 2004. V. 51. P. 266–270.
- Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V. Role of cytokinins in stress resistance of plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 15–27.
- Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Rummyantsev S.D., Cherepanova E.A., Alekseev V.Y., Sarvarova E.R., Kasimova A.R., Maksimov I.V. By modulating the hormonal balance and ribonuclease activity of tomato plants *Bacillus subtilis* induces defense response against potato virus X and potato virus Y // *BioMolecules.* 2022. V. 12. 288.
- Veselova S., Nuzhnaya T., Maksimov I. The role of salicylic, jasmonic acid and ethylene in the development of the resistance/susceptibility of wheat to the SnTox1-producing isolate of the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum* (Berk.) // *Plants.* 2024. V. 13(18). 2546.
- Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants // *Plant Sci.* 2003. V. 164. P. 645–655.
- Singh V., Ravindran P., Kumar P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses // *BMC Plant Biology.* 2016. V. 16. P. 1–10.
- Verma P., Yadav A.N., Kumar V., Singh D.P., Saxena A.K. Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement // *Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives.* V. 2: Microbial interactions and agro-ecological impacts. 2017. P. 543–580.
- Verma S.K. Integrated weed management in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // *Curr. Res. Agric. Farming.* 2021. V. 2. P. 1–4.
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009. V. 47. P. 177–206.

- Vikrant J.A., Roobavathi M.R. Impacts of drought and herbicide stress on seed germination and early seedling growth in a legume crop mung bean (*Vigna radiata* L.) // J. Plant Stress Physiol. 2021. V. 7. P. 32–41.
- Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., Yadav G., Singh J., Mishra R., Kumar V., Verma R., Upadhyay R., Pandey M., Sharma S. Absciscic Acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. 161.
- Villa-Rodriguez E., Parra-Cota F., Castro-Longoria E., López Cervantes J., de los Santos-Villalobos S. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) // Biol. Control. 2019. V. 132. P. 135–143.
- Vukelić I.D., Prokić L.T., Racić G.M., Pešić M.B., Bojović M.M., Sierka E.M., Kalaji H.M., Panković D.M. Effects of *Trichoderma harzianum* on photosynthetic characteristics and fruit quality of tomato plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. 6961.
- Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M., Sk Z.A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria // Microbiol. Res. 2016. V. 184. P. 13–24.
- Wang G., Zhang J., Wang G., Fan X., Sun X., Qin H., Xu N., Zhong M., Qiao Z., Tang Y., Song R. Proline responding plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize // Plant Cell. 2014. V. 26. 2582.
- Wang Y., Wen T., Huang Y., Guan Y., Hu J. Salicylic acid biosynthesis inhibitors increase chilling injury to maize (*Zea mays* L.) seedlings // Plant Growth Regul. 2018. V. 86. P. 11–21.
- Wang B., Liu C., Yang X., Wang Y., Zhang F., Cheng H., Zhang L., Liu H. Genomics-guided isolation and identification of active secondary metabolites of *Bacillus velezensis* BA-26 // Biotech. Biotechnol. Equipment. 2021. V. 35. № 1. P. 895–904.
- Wang S., Zhou S., Wang L., Liu X., Ma Y., Tong L., Zhang Y., Wang F. Effect of an environment friendly heat and relative humidity approach on gamma-aminobutyric acid accumulation in different highland barley cultivars // Foods 2022. V. 11. 691.
- Wagner M.R. How hungry roots get their microbes // eLife. 2022. V. 11. e82391.

- Wenzel S.C., Muller R. Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005. V. 9. P. 447–458.
- Wei L., Wang L., Yang Y., Wang P., Guo T., Kang G. Absciscic acid enhances tolerance of wheat seedlings to drought and regulates transcript levels of genes encoding ascorbate-glutathione biosynthesis // *Front. Plant. Sci.* 2015. V. 6. P. 1–11.
- Werther T., Spinka M., Tittmann K., Schuetz A., Golbik R., Mrestani-Klaus C., Huebner G., Koenig S. Amino acids allosterically regulate the thiamine diphosphate-dependent α -keto acid decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 5344–5354.
- Wu L.M., Fang Y., Yang H.N., Bai L.Y. Effects of drought-stress on seed germination and growth physiology of quincloracresistant *Echinochloa crusgalli* // *PLoS ONE*. 2019. V. 14. e0214480.
- Xia J., Qiu Y., Li W., Zhang Y., Liu L., Wang Y., Xue, D. Genome-wide *in silico* analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene family in rice (*Oryza sativa* L.) // *Plants*. 2024. V. 13(24). 3490.
- Xiao J., Guo X., Qiao X., Zhang X., Chen X., Zhan D. Activity of fengycin and iturin A isolated from *Bacillus subtilis* Z-14 on *Gaeumannomyces graminis* var. tritici and soil microbial diversity // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. 682437.
- Xie M., Zhang J., Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., Chen J.-G., Muchero W. Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. 1427.
- Xu W., Yang Q., Xie X., Goodwin P.H., Deng X., Zhang J., Sun R., Wang Q., Xia M., Wu C., Yang L. Genomic and phenotypic insights into the potential of *Bacillus subtilis* YB-15 isolated from rhizosphere to biocontrol against crown rot and promote growth of wheat // *Biology*. 2022. V. 11(5). 778.
- Yalpani N., Leon J., Lawton M.A., Raskin I. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco // *Plant Physiol.* 1993. V. 103. P. 315–321.
- Yan L.I.U., Jing T.A.O., Yujun Y.A.N., Bin L.I., Hu L.I., Chun L.I. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase // *Chin. J. Chem. Eng.* 2011. V. 19. P. 128–134.

- Yan L., Zou Y.N., Wu Q.S. Effects of *Diversispora spurca* inoculation on growth, root system architecture and chlorophyll contents of four citrus genotypes // Int. J. Agric. Biol. 2013. V. 15. P. 342–346.
- Yan L., Zhu J., Zhao X., Shi J., Jiang C., Shao D. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103(8). P. 3327–3340.
- Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 1–14.
- Yang P.-M., Huang Q.-C., Qin G.-Y., Zhao S.-P., Zhou J.G. Different drought-stress responses in photosynthesis and reactive oxygen metabolism between autotetraploid and diploid rice // Photosynthetica. 2014. V. 52. P. 193–202.
- Yang P., Zhao Z., Fan J., Liang Y., Bernier M.C., Gao Y., Zhao L., Opiyo S.O., Xia Y. *Bacillus proteolyticus* OSUB18 triggers induced systemic resistance against bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis* // Front Plant Sci. 2023. V. 14. 1078100.
- Yang X., Xie Y., Qiao Y., Chen L., Wang T., Wu L., Li J., Gao Y. Analysis of the biological activity and whole genome sequencing of *Bacillus cereus* CDHWZ7 isolated from the rhizosphere of *Lycium ruthenicum* on the Tibetan Plateau // Agriculture. 2023a. V. 13. 1041.
- Yarullina L.G., Burkhanova G.F., Tsvetkov V.O. Effects of *Bacillus* bacteria on activity of pathogen-induced proteins and wheat resistance to bunt caused by *Tilletia caries* (DC.) Tul // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 564–571.
- Yarullina L., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Sorokan A.V., Zaikina E.A., Tsvetkov V.O., Nikalaichuk V.V. Stimulation of the defense mechanisms of potatoes to a late blight causative agent when treated with *Bacillus subtilis* bacteria and chitosan composites with hydroxycinnamic acids // Microorganisms. 2023. V. 11(8). 1993.
- Yue Z., Chen Y., Chen C., Ma K., Tian E., Wang Y., Liu H., Sun Z. Endophytic *Bacillus altitudinis* WR10 alleviates Cu toxicity in wheat by augmenting reactive oxygen species scavenging and phenylpropanoid biosynthesis // J. Hazard. Mater. 2021. V. 405. 124272.
- Zafar-ul-Hye M., Danish S., Abbas M., Ahmad M., Munir T.M. ACC deaminase producing PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* and *Agrobacterium fabrum* along with biochar improve wheat productivity under drought stress // Agronomy. 2019. V. 9(7). 343.

- Zandalinas S.I., Mittler R., Balfagón D., Arbona V., Gómez-Cadenas A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures // *Physiol. Plant.* 2018. V. 162(1). P. 2–12.
- Zandalinas S.I., Fritschi F.B., Mittler R. Global warming, climate change, and environmental pollution: recipe for a multifactorial stress combination disaster // *Tr. Plant Sci.* 2021. V. 26. P. 588–599.
- Zandalinas S.I., Mittler R. Plant responses to multifactorial stress combination // *New Phytol.* 2022. V. 234. P. 1161–1167.
- Zadražnik T., Egge-Jacobsen W., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. Proteomic analysis of common bean stem under drought stress using in-gel stable isotope labeling // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 209. P. 42–50.
- Žiarovská J., Medo J., Kysel M., Zamiešková L., Kačániová M. Endophytic bacterial microbiome diversity in early developmental stage plant tissues of wheat varieties // *Plants.* 2020. V. 9. 266.
- Zia R., Nawaz M.S., Siddique M.J., Hakim S., Imran A. Plant survival under drought stress: implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation // *Microbiol. Res.* 2021. V. 242. 126626.
- Zengin H., Baysal A. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by sem microscopy // *Molecules.* 2014. V. 11. P. 17773–17798.
- Zerrouk I.Z., Rahmoune B., Khelifi L., Mounir K., Baluška F., Müller J.L. Algerian Sahara PGPR confers maize root tolerance to salt and aluminum toxicity via ACC deaminase and IAA // *Acta Physiol. Plant.* 2019. V. 41. 91.
- Zhao X., Kuipers O.P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of *Bacillales* species // *BMC Genom.* 2016. V. 17. 882.
- Zhao X., Yuan X., Xing Y., Dao J., Zhao D., Li Y., Li W., Wang Z. A meta-analysis on morphological, physiological and biochemical responses of plants with PGPR inoculation under drought stress // *Plant Cell Env.* 2023. V. 46(1). P. 199–214.

- Zhao W., Ban Y., Su Z., Li S., Liu X., Guo Q., Ma P. Colonization ability of *Bacillus subtilis* NCD-2 in different crops and its effect on rhizosphere microorganisms // *Microorganisms*. 2023. V. 11(3). 776.
- Zhang Y.J., Zhang Y., Wang Y.J., Su P.X., An L.P., Gao H. Effect of water stress on leaf photosynthesis, chlorophyll content, and growth of oriental lily // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 844–850.
- Zhang H., Wang X., Giroux M.J., Huang L. A wheat COP9 subunit 5-like gene is negatively involved in host response to leaf rust // *Mol. Plant Pathol.* 2017. V. 18(1). P. 125–133.
- Zhang G., Sun Y., Sheng H., Li H., Liu X. Effects of the inoculations using bacteria producing ACC deaminase on ethylene metabolism and growth of wheat grown under different soil water contents // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 125. P. 178–184.
- Zhang J., Zhang S., Cheng M., Jiang H., Zhang X., Peng C., Lu X., Zhang V., Jin J. Effect of drought on agronomic traits of rice and wheat: a meta-analysis // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2018a. V. 15. 839.
- Zhang W., Xie Z., Zhang X., Lang D., Zhang X. Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status // *J. Plant Interact.* 2019. V. 14. P. 580–589.
- Zhang P., Jin T., Kumar Sahu S., Xu J., Shi Q., Liu H., Wang Y. The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unravelled by large-scale genomic analysis // *Molecules*. 2019a. V. 24. 1411.
- Zhang H., Zhu J., Gong Z., Zhu J.K. Abiotic stress responses in plants // *Nature Rev. Genet.* 2022. V. 23. P. 104–119.
- Zhang L., Liu Z., Wang Y., Zhang J., Wan S., Huang Y., Yun T., Xie J., Wang W. Biocontrol potential of endophytic *Streptomyces malaysiensis* 8ZJF-21 from medicinal plant against banana *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 // *Front. Plant Sci.* 2022a. V. 11. 874819.
- Zhang Y., Xu J., Li R., Ge Y., Li Y., Li R. Plants' response to abiotic stress: mechanisms and strategies // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. 10915.

- Zhou C., Ma Z., Zhu L., Xia X., Xie Y., Zhu J., Wang J. Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. 97.
- Zhu J.K. Abiotic stress signaling and responses in plants // Cell. 2016. V. 167(2). 313–324.

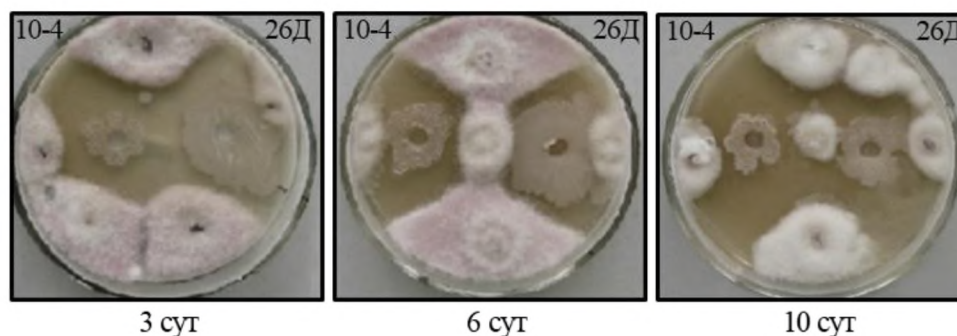


Рисунок S1. Антагонистическая активность *B. subtilis* 10-4 и 26Д (3, 6, 10 сут культур) в отношении тест-гриба *Fusarium culmorum*

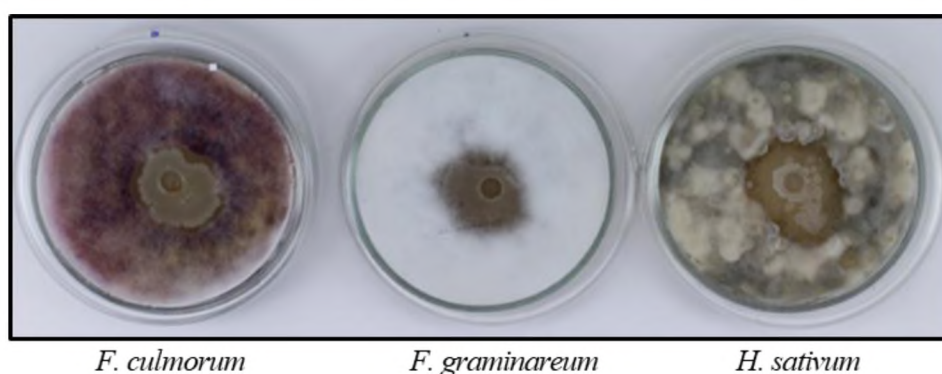


Рисунок S2. Антагонистическая активность *B. subtilis* 10-4 (1 сут культура) против фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* и *Helminthosporium sativum*

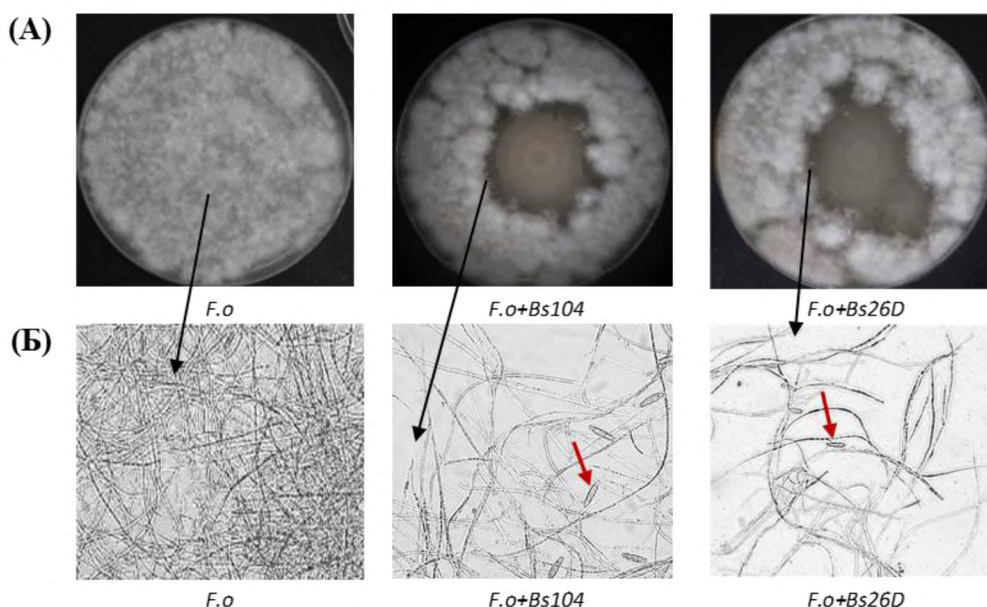


Рисунок S3. *In vitro* антагонистическая активность *B. subtilis* 10-4 (Bs104) и *B. subtilis* 26Д (Bs26D) против фитопатогенов *F. oxysporum* (F.o) (A) и микроскопическая визуализация роста и морфологии гриба *F. oxysporum* в отсутствии и присутствии *B. subtilis* 10-4 и 26Д (Б). Визуализация произведена с использованием электронного сканирующего микроскопа Biozero BZ-8100E (Keyence Co., Osaka, Japan). F.o – *F. oxysporum*; Bs – *B. subtilis*. Красными стрелками указаны макроконидии гриба

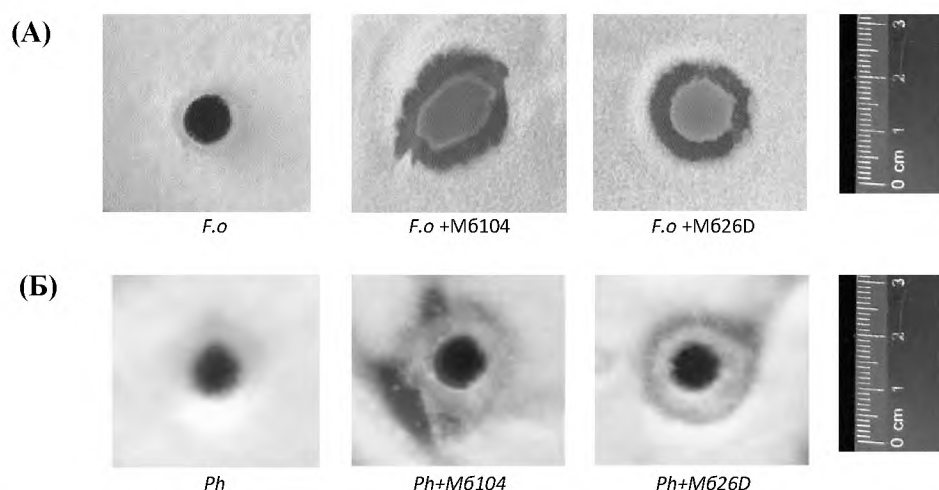


Рисунок S4. *In vitro* антагонистическая активность метаболитов *B. subtilis* 10-4 (M6104) и *B. subtilis* 26Д (M626D) (после культивирования на среде MOLP и до экстракции *n*-бутанолом) против фитопатогенных микроорганизмов *F. oxysporum* (F.o) (А) и *Ph. infestans* (Ph) (Б)

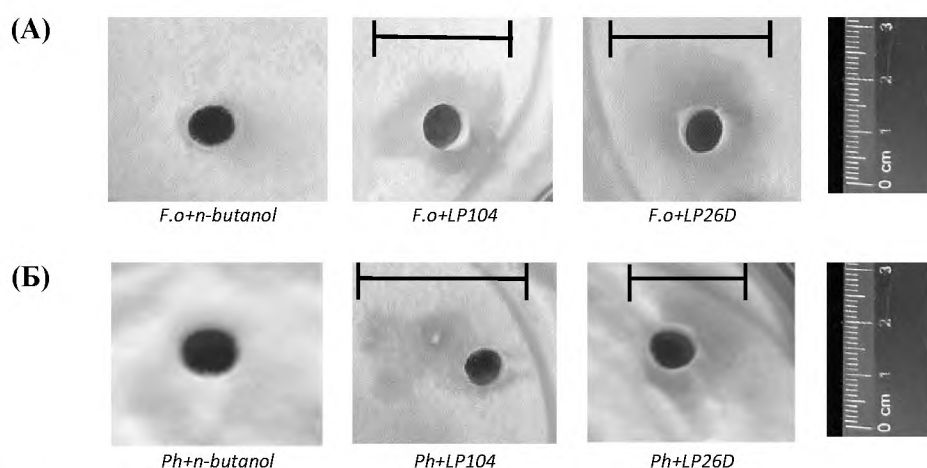


Рисунок S5. *In vitro* антагонистическая активность изолированных липопептидов *B. subtilis* 10-4 (LP104) и *B. subtilis* 26Д (LP26D) (после экстракции *n*-бутанолом) против фитопатогенов *F. oxysporum* (F.o) (А) *Ph. infestans* (Ph) (Б)

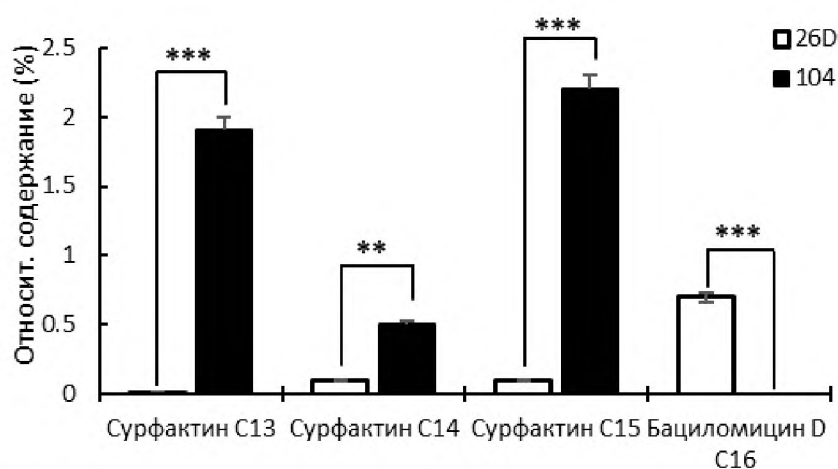


Рисунок S6. Относительное содержание липопептидов, продуцируемых *B. subtilis* 10-4 (104) и *B. subtilis* 26Д (26D), выделенных с использованием среды MOLP. Клетки штаммов 10-4 и 26Д культивировали на среде MOLP на орбитальном шейкере (130 об/мин, 36 °С, 6 суток), центрифугированием осаждали

клетки (5000 об/мин, 60 мин). Липопептиды экстрагировали *n*-бутанолом, органическую фазу выпаривали на ротаторном испарителе, остаток лиофилизировали, растворяли в 10% метаноле и проводили анализ. * указывают на значительную разницу между средними на уровне вероятности $p < 0,05$ (Lastochkina et al. 2021b)

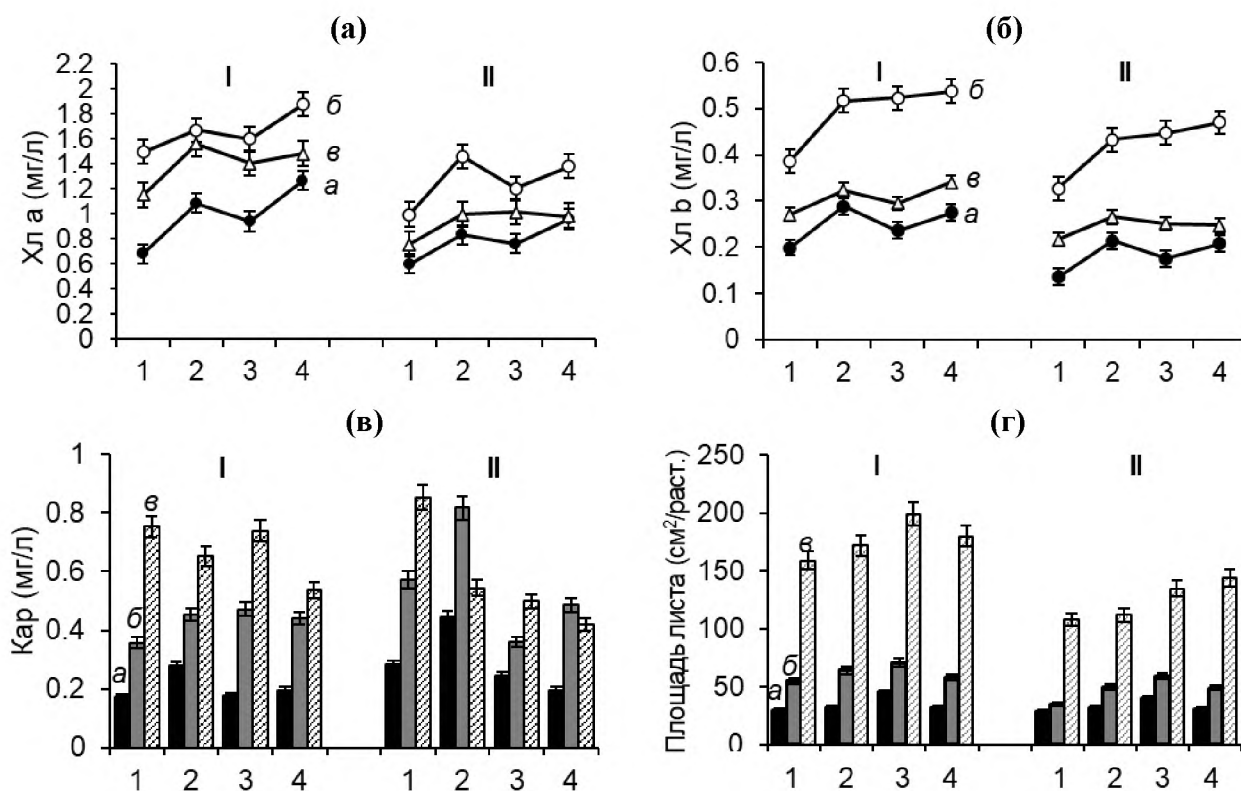


Рисунок S7. Содержание хлорофилл а (а), хлорофилл б (б), каротиноиды (в) и площадь листовой пластинки (г) у здоровых (I) и инфицированных *A. alternata* (II) растений сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. сорта Кампай при использовании биопрепаратов: 1 – контроль, 2 – фитоспорин-М, 3 – витаплан, 4 – *B. subtilis* 10-4; а – первая обработка, б – вторая обработка, в – уборка урожая (ООО «Чишмы агроинвест», Республика Башкортостан, 2013 г.)

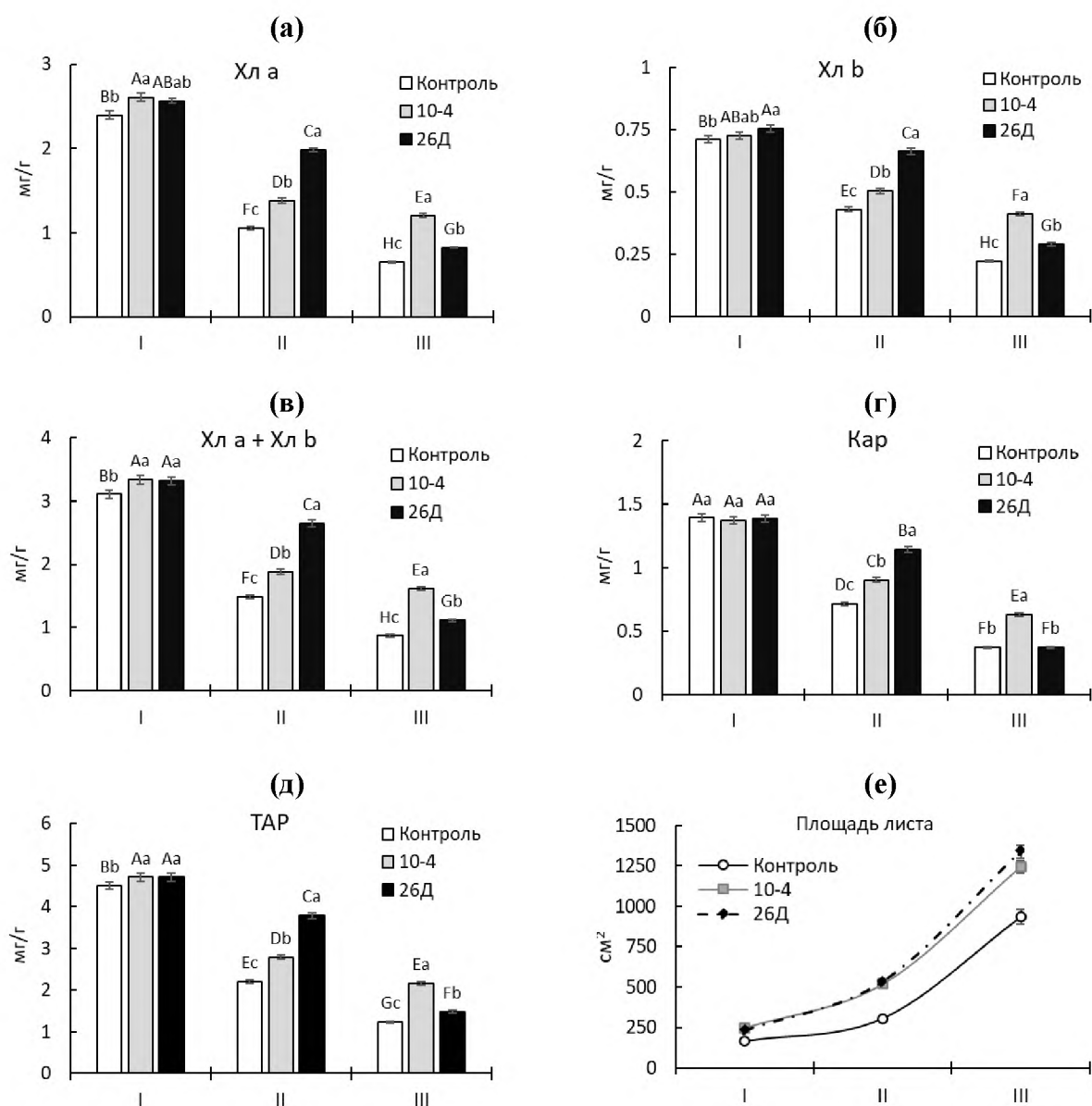


Рисунок S8. Влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на динамику содержания фотосинтетических пигментов Хл а (а), Хл б (б), Хл а + Хл б (в), Кар (г), общее количество пигментов (ТАР) (д) и площади листьев (е) картофеля в вегетационных экспериментах в контролируемых условиях

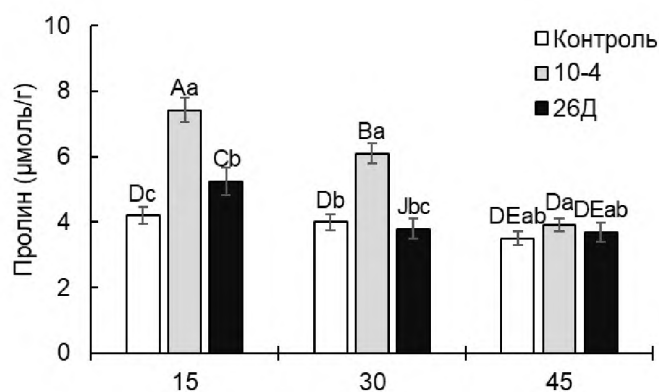


Рисунок S9. Влияние предпосевной инокуляции *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на концентрацию пролина в листьях картофеля. I – 15-сут растения (стадия развития листьев); II – 30-сут растения (стадия бутонизации); III – 45-сут растения (стадия цветения)

Таблица S1 – Влияние предпосевной инокуляции семенных миниклубней *B. subtilis* 10-4 и 26Д на биометрические параметры и урожайность картофеля в контролируемых условиях

Вариант	Высота растения (см)	Количество клубней (шт/растение)	Масса клубней (г/растение)	Масса наземной части (г/растение)	Масса столонов (г/растение)	Урожай клубней (г/м ²)
Контроль	42,3 ± 1,5 ^a	2,8 ± 0,8 ^b	59,8 ± 3,7 ^c	55,8 ± 12,4 ^a	3,2 ± 1,2 ^b	1196 ± 55 ^b
10-4	41,8 ± 1,2 ^a	3,8 ± 1,2 ^a	71,9 ± 4,4 ^b	55,2 ± 17,2 ^a	3,9 ± 0,8 ^a	1438 ± 66 ^a
26Д	41,5 ± 0,9 ^a	4,0 ± 1,1 ^a	76,3 ± 4,2 ^a	52,3 ± 10,7 ^{ab}	3,7 ± 0,6 ^a	1526 ± 63 ^a

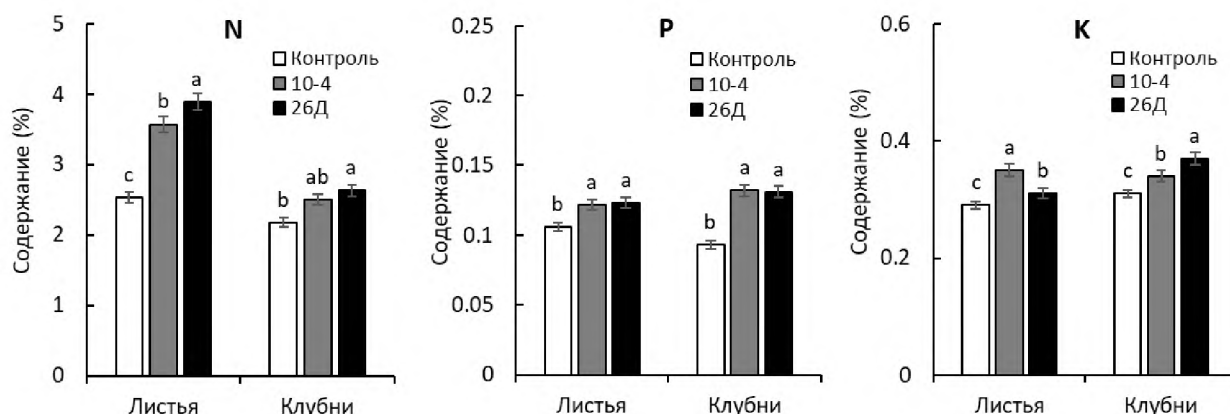


Рисунок S10. Влияние предпосевной обработки семенных миниклубней *B. subtilis* 10-4 и 26Д на содержание (%) макроэлементов азота (N), фосфора (P) и калия (K) в листьях и клубнях картофеля через 65 дней выращивания в сосудах в контролируемых условиях

Таблица S2 – Влияние предпосевной обработки семенных миниклубней *B. subtilis* 10-4 и 26Д на содержание (мг/кг сухого веса) макроэлементов в листьях и клубнях картофеля через 65 дней выращивания в сосудах в контролируемых условиях

Вариант	Mn (мг/кг)		Cu (мг/кг)		Zn (мг/кг)		Fe (мг/кг)		Co (мг/кг)	
	Листья	Клубни	Листья	Клубни	Листья	Клубни	Листья	Клубни	Листья	Клубни
Контроль	4,32 ^b	4,32 ^a	1,65 ^b	1,59 ^c	15,55 ^c	15,97 ^a	0,45 ^a	0,48 ^c	0,0183 ^a	0,0201 ^a
10-4	4,53 ^a	4,33 ^a	1,87 ^a	1,80 ^a	18,35 ^a	15,16 ^a	0,40 ^b	0,53 ^a	0,0186 ^a	0,0196 ^{ab}
26Д	4,24 ^c	4,13 ^b	1,68 ^b	1,70 ^b	16,54 ^b	15,78 ^a	0,46 ^a	0,50 ^b	0,0159 ^b	0,0181 ^b

Таблица S3 – Изменение содержания общего сухого вещества, крахмала, редуцирующих сахаров, витамина С и антоцианов в клубнях картофеля, выращенных из колонизированных эндофитными *B. subtilis* 10-4 и 26Д растений в сосудах в контролируемых условиях

Вариант	Сухое вещество (%)	Крахмал (%)	Редуцирующие сахара (%)	Витамин С (мг %)	Антоцианы (мг %)
Контроль	21,8 ± 0,9 ^a	16,1 ± 0,7 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	14,3 ± 0,9 ^c	3,00 ± 0,07 ^b
10-4	21,3 ± 0,7 ^a	15,5 ± 0,4 ^a	0,17 ± 0,01 ^b	15,3 ± 0,5 ^b	3,36 ± 0,03 ^a
26Д	21,5 ± 0,6 ^a	15,7 ± 0,6 ^a	0,16 ± 0,02 ^b	16,6 ± 0,7 ^a	3,32 ± 0,08 ^a

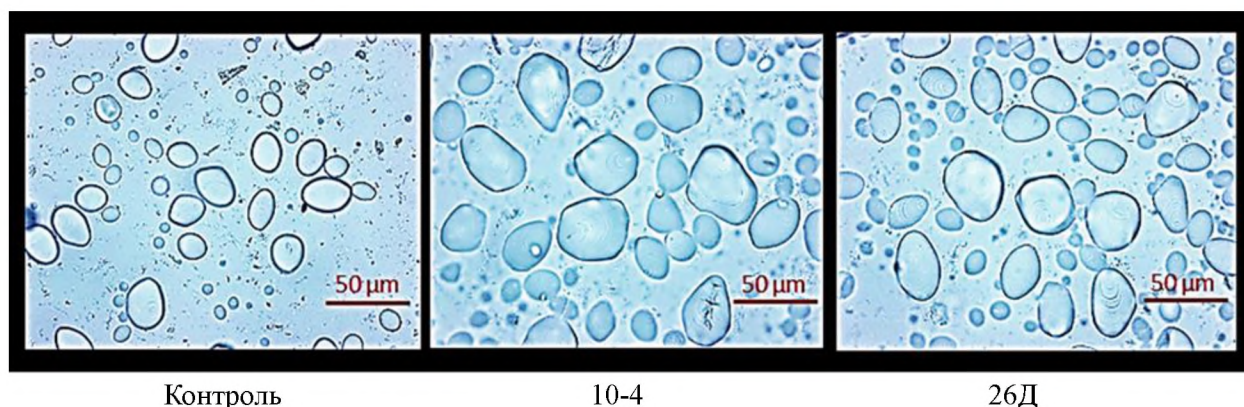


Рисунок S11. Влияние обработки семенных миникубней эндофитными штаммами *B. subtilis* 10-4 и 26Д на размер крахмальных зерен в уборных клубнях картофеля

Таблица S4 – Влияние *B. subtilis* 10-4 и 26Д на всхожесть семян и рост растений фасоли (8-сут) в присутствии разных концентраций NaCl (0, 0,5, 1,0, 2,0%)

Вариант	Всхожесть семян (%)	Длина корней (см)	Длина побегов (см)	Кол-во боковых корней/гл. корень
0% NaCl (Норма)				
Контроль	39 ± 0,49	2,26 ± 0,10	0,60 ± 0,03	10,38 ± 0,23
10-4	54 ± 0,43*	2,82 ± 0,29*	0,75 ± 0,02*	8,67 ± 0,24
26Д	80 ± 0,10**	2,13 ± 0,21	0,74 ± 0,05*	9,17 ± 0,27
0,5%NaCl				
Контроль	26 ± 0,17	1,28 ± 0,02	0,51 ± 0,03	12,53 ± 0,16
10-4	30 ± 0,42*	1,41 ± 0,005*	0,6 ± 0,04	6,3 ± 0,13**
26Д	34 ± 0,28**	2,04 ± 0,05**	0,73 ± 0,02	9,38 ± 0,2*
1%NaCl				
Контроль	11 ± 0,23	0,72 ± 0,09	0,34 ± 0,01	6,2 ± 0,3
10-4	19 ± 0,31**	1,12 ± 0,12*	0,45 ± 0,02*	4,5 ± 0,09*
26Д	18 ± 0,25**	1,24 ± 0,03**	0,42 ± 0,1*	5,3 ± 0,12*
2%NaCl				
Контроль	9 ± 0,12	0,42 ± 0,05	0,1 ± 0,01	1,9 ± 0,07
10-4	15 ± 0,62**	0,8 ± 0,05**	0,35 ± 0,02**	3,34 ± 0,25***
26Д	14 ± 0,28**	0,84 ± 0,04**	0,15 ± 0,006*	2,76 ± 0,04**

* указывают на существенную разницу (p<0,05)

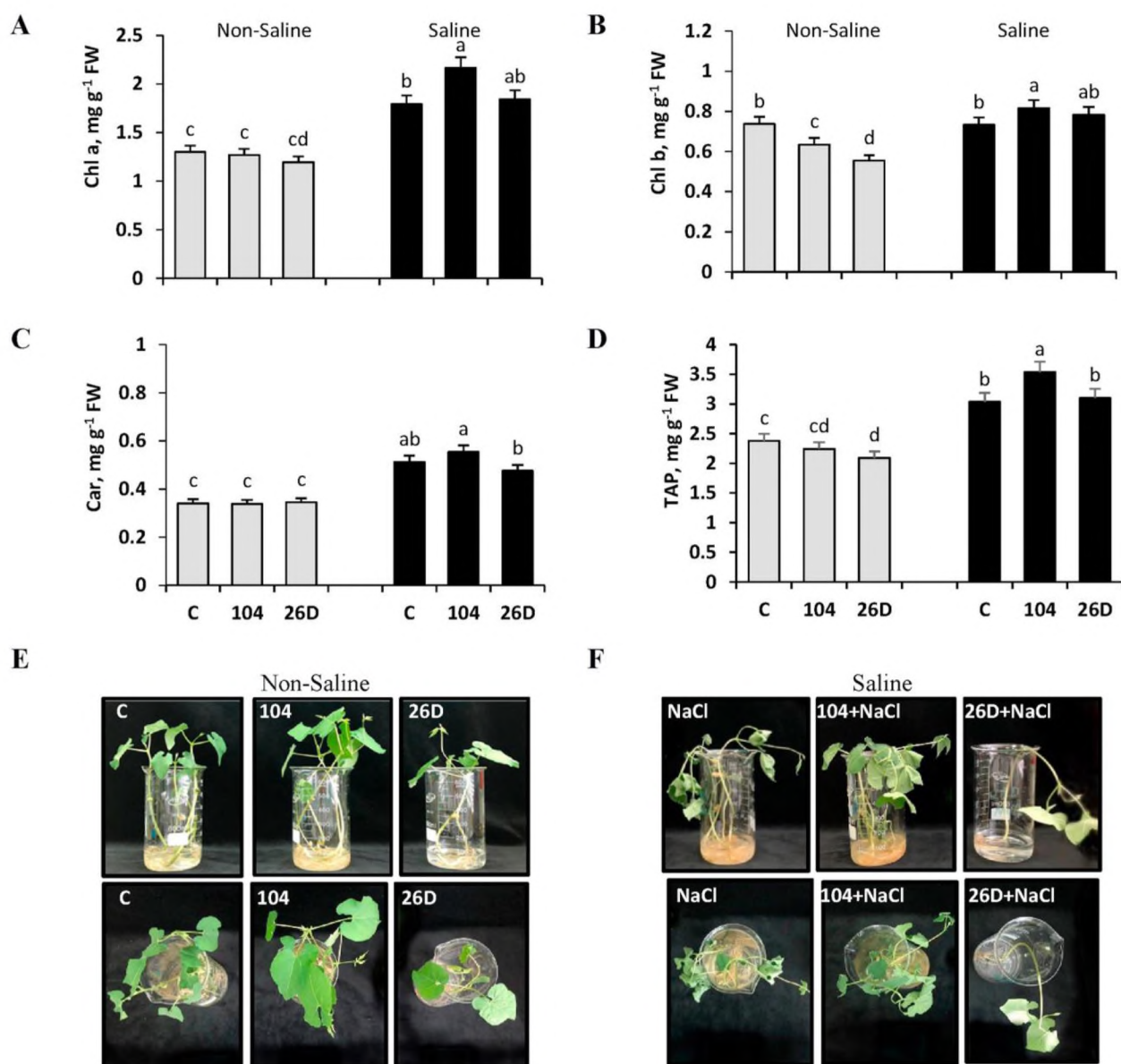


Рисунок S12. Влияние инокуляции семян эндофитными бактериями *B. subtilis* (10-4 и 26Д) на содержание Хл а (**а**), Хл b (**б**), Кар (**в**) и сумму пигментов (ТАР) (**г**) в листьях растений фасоли *Phaseolus vulgaris* L. в нормальных (Non-Saline) условиях и при засолении (2%NaCl) (через 14 дней после посева). Внешний вид 14-сут растений в норме (Non-Saline) (**д**) и засолении (Saline) (**е**)

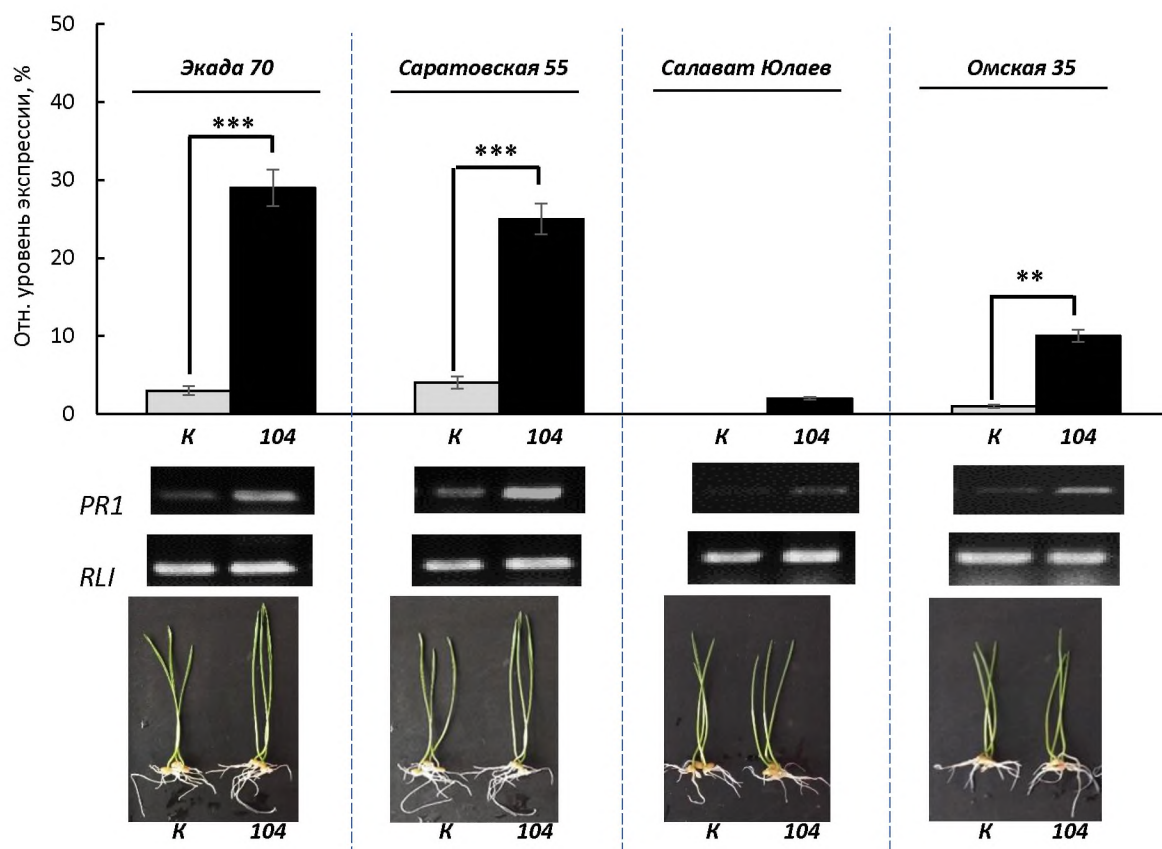


Рисунок S7. Влияние *B. subtilis* 10-4 (104) на уровень транскрипционной активности гена *PR-1* в 3-сут проростках яровой пшеницы сортов Экада70, Саратовская55 (степной волжский экотип) и Салават Юлаев, Омская35 (лесостепной западносибирский экотип). На рисунке приведены значения трех повторений $\pm$ SEM. * указывают на значительную разницу между средними на уровне вероятности $p < 0,05$. Время после инокуляции *B. subtilis* 10-4 – 3 суток.

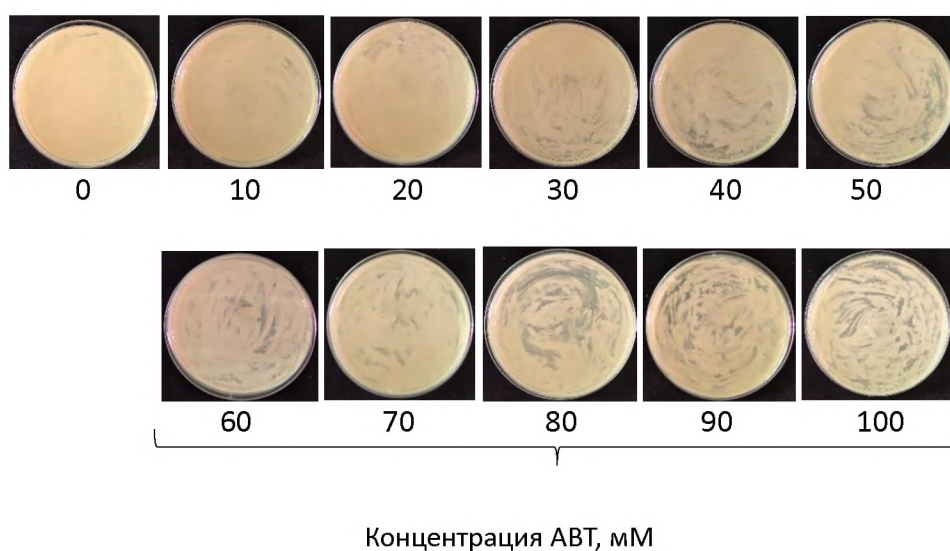


Рисунок S8. Влияние ингибитора биосинтеза СК 1-аминобензотриазола (АВТ) в диапазоне концентраций (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 мМ) на рост бактерий *B. subtilis* 10-4 в чашках Петри с питательной средой (PDA)

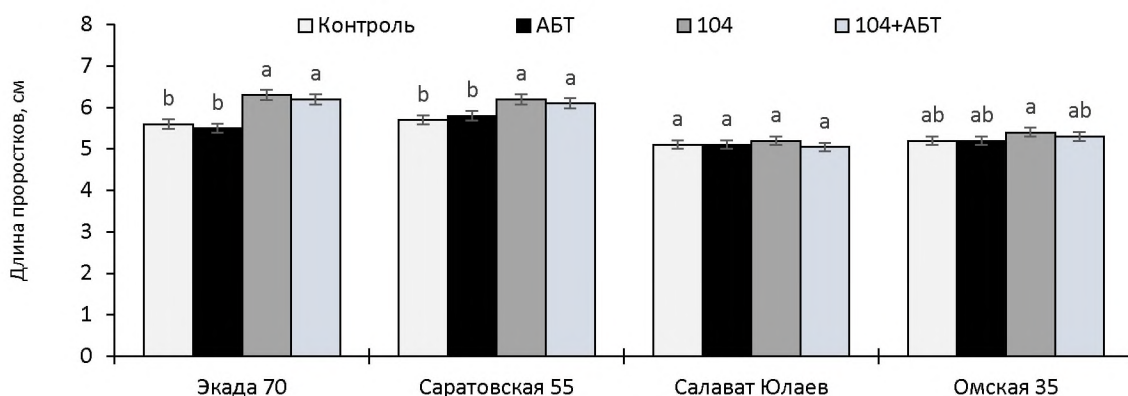


Рисунок S9. Влияние 1-аминобензотриазола (АБТ) (100 мМ) (при предпосевном замачивании) на рост 3-сут проростков пшеницы степного волжского (сорта Экада70, Саратовская55) и лесостепного западносибирского (сорта Салават Юлаев, Омская35) экотипов в нормальных условиях произрастания. В рисунке приведены значения трех повторений $\pm$ SEM (n=30, 3 повтора). Разные буквы указывают на значительную разницу между средними на уровне вероятности $p < 0,05$

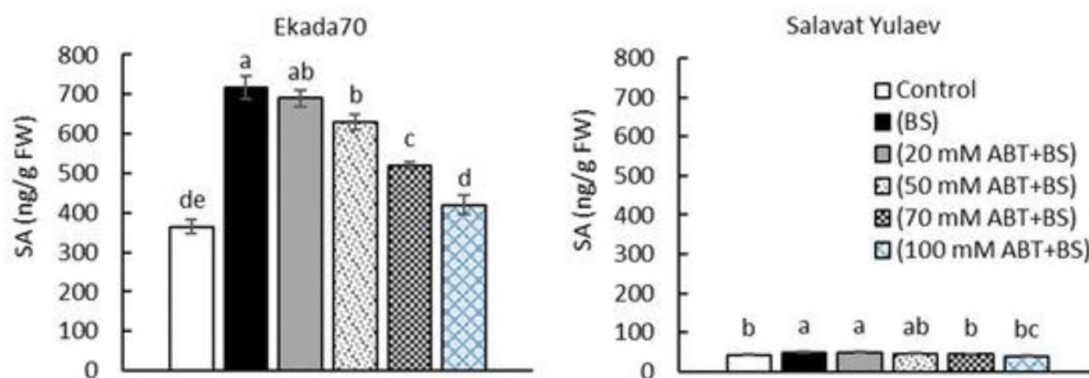


Рисунок S10. Влияние 1-аминобензотриазола (АБТ) (ингибитора биосинтеза салициловой кислоты (СК)) на содержание эндогенной СК в проростках пшеницы, инокулированных *B. subtilis* 10-4 (BS) (3-сут проростки)