

На правах рукописи

Сарварова Елена Рафисовна

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

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа - 2021

Работа выполнена в лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Уфа

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Хайруллин Рамиль Магзинурович**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, заведующая лабораторией сигнальной регуляции ФГБНУ «Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии» **Долгих Елена Анатольевна,**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии техногенных экосистем «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиала ФГБУН ПФИЦ УрО РАН **Назаров Алексей Владимирович**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук (664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317).

Защита диссертации состоится _____ 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7 (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан " ____ " _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

Механизмы взаимоотношений эндофитов с растениями во многом остаются неизвестными. До сих пор нет четкой определенности в вопросе о путях проникновения таких бактерий в растительные ткани. Одни авторы считают, что эти микроорганизмы проникают в растения преимущественно из-за механических повреждений тканей (Hardoim et al., 2008; Kumar et al., 2020), но в этом случае к эндофитам можно отнести любую бактерию, способную колонизировать таким образом макроорганизм. Другие авторы придерживаются мнения о специфичности взаимодействия эндофитов и растений на уровне их геномов (Pentimone et al., 2018; Zachow et al., 2010). Известно, что механические повреждения способствуют также проникновению фитопатогенных вирусов в растения. В связи с этим представляют практический интерес вопросы о том, могут ли эндофиты способствовать проявлению устойчивости растений к вирусным инфекциям, и как растительные метаболиты, появляющиеся при механических повреждениях тканей, могут влиять на рост и размножение эндофитов.

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

Задачи исследования.

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы расширяют представления о свойствах эндофитных бактерий. Новые данные позволяют обосновать имеющиеся в научной литературе предположения о кооперации эндофитных микроорганизмов для обеспечения проникновения их в растительные ткани без механических повреждений. Результаты исследования влияния оксикоричных кислот на подвижность бактериальных колоний могут положить начало новому направлению в изучении механизма движения клеток эндофитов внутри растительных органов и тканей, а также формированию биопленок в ризосфере.

Полученные данные могут служить теоретической основой для разработки новых биопрепаратов на основе эндофитных бактерий в комбинации с оксикоричными кислотами для повышения эффективности колонизации растений полезными эндофитными микроорганизмами.

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

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эндофитная бактерия *Bacillus subtilis* 26Д при совместной инокуляции с неэндофитом *Lactobacillus plantarum* 3L способствует проникновению лактобацилл в растения картофеля без механических повреждений растительных тканей.

2. Оксикоричные кислоты – феруловая и кумаровая играют роль в распространении бактериальных клеток по поверхности агаризованных сред.

3. Исследованные штаммы бактерий способны уменьшать распространение вирусной инфекции у растений картофеля.

4. Эндофитную бактерию *Bacillus subtilis* 26Д можно использовать в качестве вектора, придающего растениям устойчивость к вредным насекомым.

Степень достоверности, апробация работы и публикации. Степень достоверности подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведённых экспериментов, а также наличием контрольных вариантов. Материалы диссертации были представлены на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2014), Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2014), международной Пущинской школе – конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2015), конференции с международным участием «Эколого-генетические основы современных агротехнологий» (Пушкин, 2016), Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016), научной конференции и школе молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 2017), международной научной конференции PLAMIC (Уфа, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы и методы в защите растений» (Екатеринбург, 2018), международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика»

(Севастополь, 2019), международной научной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (Новосибирск, 2019).

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, из них 7 статей - индексируемые в базах Web of Science или Scopus. Результаты работы были представлены на 10 конференциях в виде тезисов, стендовых и устных докладов. Создан патент РФ на изобретение.

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

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

Личный вклад автора состоял в выделении изолятов из растительных тканей планировании и проведении экспериментов. Автор провел критический анализ полученных данных и их интерпретацию, участвовал в подготовке результатов работы к публикации и их представлении на научных конференциях. Секвенирование выделенных изолятов производили по заказу в компании «Евроген» (Москва). Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Молекулярно-генетическая часть исследований выполнена совместно с к.б.н., н.с. Благовой Д.К. и к.б.н., н.с. Бурхановой Г.Ф., активность РНКаз бактерий в жидкой среде оценена совместно с к.б.н., н.с. Черепановой Е.А., оценка инсектицидной активности совместно с д.б.н., в.н.с. Беньковской Г.В., полевые эксперименты проведены совместно с к.б.н., н.с. Сорокань А.В. и другими соавторами публикаций, за что автор выражает всем соавторам благодарность.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили штаммы бактерий из коллекции ИБГ УФИЦ РАН: *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ 128), *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689), *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066), *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-5351) и другие. Выделение изолятов из растительных тканей проводили по методу, описанному Благовой (2014). Культуры бактерий выращивали на твердых агаризованных средах LB (Bertani, 1951), или картофельно-глюкозном агаре (HiMedia, Россия), или полусинтетической среде (Недорезков, 2002). В качестве жидкой питательной среды использовали указанные выше среды, исключая агарозу. Окрашивание по Граму осуществляли по классической методике. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства оценивали по определителю Берджи (1997). Оценку эндодитности проводили с использованием стерильных микрорастений картофеля. Для оценки распространения колонии бактерий скольжением по агаризованной поверхности использовали методику, описанную в работе (Bridier, 2011). Антагонистическую активность бактерий по отношению к фитопатогенам оценивали методом двойной культуры (Whipps, 1987). Оценку наличия вирусной инфекции в растениях картофеля проводили с использованием набора для иммунохроматографии (ФИЦ Биотехнологии, Россия). Способность бактерий к деструкции феруловой кислоты анализировали по методу, предложенному (Degrassi, 1995). Бактериальную активность РНКаз на твердой питательной среде оценивали по формированию зоны гало вокруг бактериальной колонии на среде с дрожжевой РНК (Hole, 2004), в жидкой культуре - по методу, описанному Маргулис (2012). Выделение высокомолекулярной бактериальной ДНК проводили по Graham (1978) с модификациями. Выделение плазмидной ДНК, подготовку компетентных клеток, их трансформацию плазмидной ДНК, а также электрофорез фрагментов ДНК проводили по лабораторному руководству Sambrook с соавт. (1989). ПЦР проводили с использованием стандартных наборов для амплификации ДНК (Синтол, Россия). В экспериментах по клонированию генов применялись штаммы компетентных клеток *E. coli* – NEB10. Для получения экспрессионных конструкций использовалась плазида широкого круга хозяев pDG1662. Родовую принадлежность изолятов идентифицировали с использованием специфичных праймеров. Видовую принадлежность определяли секвенированием 16s рРНК. Статистическую обработку проводили с использованием программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение эндофитных бактерий из растений разных видов, оценка влияния механических повреждений и межмикробных взаимоотношений эндофитных бактерий в растительных тканях

Всего было выделено 266 бактериальных изолятов, после оценки которых RAPD-анализом было отобрано 110 штаммов (табл. 1). Затем, используя стерильные микрорастения картофеля и инокулируя их без механических повреждений клетками бактерий, анализируя через 14 дней визуально здоровые растения было установлено, что 90% штаммов являются эндофитными, т.е. способны проникать в растительные ткани без их поранения и не вызывать симптомы болезни. Некоторые из таких новых эндофитных штаммов использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 1 – Количество выделенных изолятов, отличавшихся по RAPD-анализу

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

Чаще всего из растительных тканей выделялись представители рода *Bacillus*. Псевдомонады изолировались с меньшей частотой в сравнении с бациллами. Выделены и идентифицированы также редко встречающиеся виды *Pantoea sp.*, *Variovorax sp.* *Microbacterium testaceum*.

Чаще всего из листьев выделялись эндофиты растений яровой пшеницы (частота выделения из образцов - 77%) и капусты (60%). Из листьев укропа и петрушки, а также редиса, салата, огурца, эндофиты выделялись реже (средняя частота выделения 18%). Эндофиты были выделены лишь из 2 образцов плодов огурца или сливы, из тканей чистотела не удалось выделить бактерии (табл. 2).

Таблица 2 – Частота выделения эндофитов из тканей различных видов растений

Плоды	Всего образцов, ед.	Выделено изолятов эндофитов, ед.	Частота выделения, %
Яблоко (плоды)	40	24	60
Огурец (плоды)	20	2	10
Слива (плоды)	22	2	9
Чистотел (черешок листа)	12	0	0

Известно, что огурец, слива и чистотел при поранении тканей выделяют экссудат, закупоривающий раны. Полученные данные подтверждают наше предположение о том, что в тканях растений, выделяющих такие вещества, должно встречаться меньше эндофитов в сравнении с другими видами растений.

Наибольшим разнообразием штаммов характеризовались эндофиты, выделенные из растений сливы, моркови, огурца и салата. Разнообразие штаммов в тканях огурца, сливы и салата можно объяснить особенностью этих растений закупоривать образующиеся раны, что способствует минимальной вероятности проникновения бактерий в ткани, меньшему количеству выделяемых изолятов, что повышает вероятность встретить разные штаммы и/или виды бактерий среди числа эндофитов. Высокое разнообразие штаммов из корнеплодов моркови объясняется, вероятно, высокой вероятностью повреждения тканей в почве и, таким образом, большей вероятностью попутного проникновения «не эндофитных» бактерий.

Для оценки влияния механических повреждений на проникновение бактерий в растительные ткани было поставлено несколько опытов. В одном из экспериментов редис выращивали в открытом и закрытом (в лабораторных условиях) грунтах на одинаковом образце почвы. Установлено, что в листьях редиса, выращенного в открытом грунте, количество эндофитов в 1 г ткани было в 24 раза больше, чем в листьях редиса, растущего в лабораторных условиях. Этот факт мы связываем с повреждением растительных тканей насекомыми и проникновением различных микроорганизмов в местах поранений. В другом эксперименте анализировали плотность популяции бактерий в тканях молодых и стареющих листьев укропа. Было выявлено, что в молодых растениях КОЕ бактерий в 75 раз меньше, чем в зрелых.

Возможность проникновения бактерий в растения через раны и движения по сосудам оценивали в эксперименте со срезанными листьями петрушки примерно одинакового возраста и размера. В стаканы с нестерильной водопроводной водой помещали отрезки листьев петрушки (табл. 3). Через 24 ч удаляли часть черешка листа, которая находилась в воде, далее черешок делили на три части, из которых выделяли бактерии. Показано четкое распределение

популяции клеток по длине черешка – наибольшая плотность наблюдалась в нижней части и наименьшая в верхней.

Таблица 3 – Плотность популяции бактерий в черешках срезанных листьях петрушки (КОЕ/г)

Часть черешка листа	КОЕ бактерий, кл. /г
Верхняя	30±2
Средняя	340±30
Нижняя	6000±520

В научной литературе имеются сообщения о том, что совместная инокуляция растений определенным видом или штаммом бактерий может облегчать проникновение другого вида или штамма бактерий в растительные ткани. Например, Wells и Butterfield (2011) приводят результаты эксперимента, в котором нанесение на ткани моркови, картофеля или перца бактерий *Pseudomonas viridiflava* совместно с бактериями *Salmonella typhimurium* или бактерий *Erwinia carotovora* с *S. typhimurium* приводило к трехкратному увеличению численности сальмонеллы тканях растений в сравнении с моноинокуляцией тканей только сальмонеллой

Для выявления способности эндофита облегчать проникновение других видов бактерий в растительные ткани был проведен эксперимент, в котором стерильные микрорастения картофеля инокулировали 10 мкл смеси клеток суточных культур бактерий, указанных в табл. 4 в количестве, 1 млн. клеток/лист. В варианте использования неэндофитного штамма листья одних микрорастений повреждали стерильным пинцетом, других – не повреждали. Выявлено, что без повреждений неэндофитный штамм не обнаруживался в тканях стерильных растений, тогда как при нанесении эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д без повреждений бактерии обнаруживались в растительных тканях после поверхностной стерилизации (табл. 4). Так был выявлен интересный факт, подтверждающий данные цитируемых выше авторов о том, что одни виды (штаммы) бактерий могут способствовать проникновению в растительные ткани микроорганизмов других видов.

Таблица 4 – Влияние совместной с лактобациллами инокуляции микрорастений картофеля эндофитным штаммом *B. subtilis* 26Д на проникновение бактерий в растительные ткани

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

Исходя из полученных нами результатов, а также на основе анализа имевшейся в нашем распоряжении научной литературы о способности одних бактерий облегчать проникновение других неэндофитов в растительные ткани мы уточнили определение термина «эндофитные бактерии»: эндофитные бактерии – бактерии, способные жить внутри растений, не нанося им вреда, проникая во внутренние растительные ткани без повреждений, вызванных воздействием других факторов, и без помощи других микроорганизмов.

В связи с полученными результатами возник вопрос о том, как может меняться популяция клеток эндофитных бактерий, чей рост и размножения подавляется другими эндофитами. Для ответа из коллекции выделенных эндофитов были выбраны бактерии, колонии которых хорошо отличались при росте на агаровых средах (табл. 5).

Таблица 5 – Антагонизм некоторых штаммов бацилл по отношению к различным эндофитам (зона подавления роста, мм)

№	Тест-объекты	Бактерии - антагонисты	
		26Д	49РН
	<i>B. subtilis</i> 26Д		3±0,36
2	<i>B. subtilis</i> 49РН	-	
9	<i>Variovorax sp.</i> Ч'4	-	9±0,61
12	<i>Pantoea sp.</i> М23	-	6±0,7

* - антагонизм не проявляется

В эксперимент включали эндофитные штаммы *B. subtilis*, отличающиеся степенью проявления антагонизма по отношению к новым эндофитам *Variovorax sp.* Ч'4 и *Pantoea sp.* М23: антагонистичный по отношению к ним штамм *B. subtilis* 49РН и не антагонистичный - *B. subtilis* 26Д. На основания стеблей стерильных микрорастений картофеля, не касаясь агара, на расстоянии 5-10 мм от его поверхности микрокаплями наносили по 10^5 клеток бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 49РН. Через 7 дней в одном из вариантов выше места нанесения бацилл наносили микрокапли, содержащие 10^5 клеток *Variovorax sp.* Ч4 и *Pantoea sp.* М23. Через 7 дней вырезали черенки стеблей выше на 2 см от места нанесения микрокапель и ниже на 2 см от вершины растений. В асептических условиях определяли массу черенков, поверхностно стерилизовали и растирали в чашках Петри в аликвоте физраствора. Затем делали серию десятикратных разведений и высевали на поверхность агаризованной питательной среды LB. При инокуляции растений бактериями *B. subtilis* штамма 26Д, не проявляющего антагонизм к указанным эндофитам, и штамма 49РН, подавляющего рост их колоний *in vitro*, количество клеток *Pantoea sp.* М23 в тканях стебля картофеля остается, примерно, равным (табл. 6). В отличие от этого, неожиданно, при предобработке растений бактериями *B. subtilis* штамма 26Д количество клеток *Variovorax sp.* Ч'4 было в 12 раз меньше, чем при обработке растений клетками антагонистичного *in vitro* штамма 49РН.

Одновременно обнаружено уменьшение плотности популяции клеток самого антагониста в сравнении с моноинокуляцией только этими бациллами. В отличие от этого, при инокуляции растений эндофитом *B. subtilis* 26Д наблюдается увеличение количества его клеток в тканях картофеля в сравнении с моноинокуляцией клетками только самого штамма 26Д. Таким образом, нами показано, что антагонистический характер одного из эндофитных штаммов бактерий *in vitro* по отношению к другому, *in vivo* может не только не проявляться аналогичным образом, но и приводить к уменьшению численности клеток самого антагониста.

Таблица 6 – Влияние совместной инокуляции эндофитами микрорастений картофеля на количество клеток бактерий внутри стеблей (КОЕ/г)

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

Примечание

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

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

Хорошо известно, что при механических повреждениях растений на месте ран формируется защитный физико-химический барьер в виде полимера лигнина. Одним из основных мономеров лигнина является оксикоричная феруловая кислота. В синтезе лигнина принимает участие также кумаровая кислота. Вместе с тем, лигнин является характерным компонентом клеточных стенок растений, формирующихся в процессе онтогенеза. В научной литературе

имеются сведения об ингибировании размножения некоторых видов бактерий оксикоричными кислотами. Если проникновение неэндофитов может происходить при поранении растений возникает вопрос о том, как эти соединения могут влиять на распространение эндофитных бактерий. До наших исследований в известной нам научно-технической литературе такие сведения отсутствовали. В связи с этим исследовали влияние феруловой кислоты (ФК), кумаровой, а также сириновой кислот в концентрациях, близких к характерным для содержания в ризосфере растений, на рост колоний на плотных средах и размножение в жидких, двух эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ. В экспериментах использовали два порядка концентрации кислот – 10 и 100 мкг/л, а в некоторых экспериментах и заведомо большую – порядка 100-1000 мкг/л. На плотных агаризованных средах (1,5% агара) колонии бактерий *B. subtilis* 26Д лучше росли в размерах на богатой питательной среде LB, и ожидаемо хуже на обедненной белками минерализованной среде ПСС (рис. 1а). В присутствии ФК рост колоний бактерий подавлялся на всех изученных средах, достоверно при концентрации ФК 100 мкг/л, наличие которой приводило к минимальному размеру колоний.

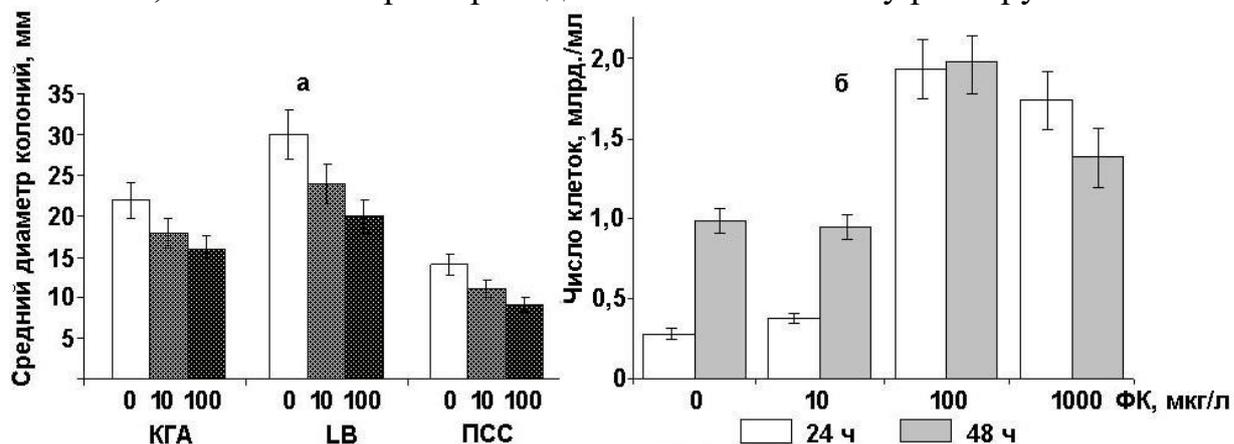


Рисунок 1 – Влияние феруловой кислоты на рост колоний *B. subtilis* 26Д на плотных средах (а) и на размножение клеток (б) в жидкой среде LB.

При культивировании микроорганизмов в жидкой питательной среде выявлен обратный эффект действия ФК на размножение бактерий (рис. 1б). Например, при концентрации ФК 100 мкг/л к 48 ч роста культуры наблюдалось шестикратное увеличение плотности клеток в сравнении с контрольной средой.

Аналогичный эффект наблюдался при внесении кумаровой кислоты в среды роста бактерий. Наличие в агаризованной среде фенольной сириновой кислоты также приводило к торможению роста колоний бактерий. В жидкой среде стимуляция размножения клеток на 24 ч наблюдалась при внесении в среду этого соединения с концентрацией в 100 раз больше, чем феруловой или кумаровой. Аналогичный характер указанных соединений наблюдался также в случае действия их в среде на другой штамм бациллы – *B. subtilis* 11ВМ.

Для исследования возможности распространения бактерий по поверхности твердой среды по типу скольжения и, одновременно, распространению, возможно, благодаря хемотаксису, использовали

полутвердую среду LB (0,7% агара) с градиентом ФК. Выявлено, что на такой среде, содержащей ФК, размеры колоний бактерий многократно увеличивались (таб. 7).

Таблица 7 – Размеры колоний бактерий (мм) на агаризованной (0,7%) среде LB

Концентрация кумаровой кислоты, мкг/л	Штаммы <i>B. subtilis</i>	
	11ВМ	26Д
Контроль	132	72
10	598	506
100	756	899

При этом не выявлен преимущественный рост колоний в сторону увеличения концентрации ФК – колонии формировались правильной круглой формы. На среде LB без ФК клетки формировали типичные для штамма *B. subtilis* 26Д сухие, морщинистые колонии с четко очерченными фестончатыми краями. На среде с ФК колонии «расплывались», края были нечеткими, лучистыми, были, примерно, от полутора до двух раз больше в диаметре в сравнении с колонией на контрольной среде без ФК.

В связи с тем, что в жидких средах наблюдали активацию размножения бактерий *B. subtilis* 26Д мы провели анализ наличия в геноме этого микроорганизма гена фермента декарбоксилазы фенольных кислота (Phenolic Acid Decarboxylase, PAD). С использованием ПЦР установлено наличие в геноме бактерии *B. subtilis* 26Д последовательности нуклеотидов, аналогичных гену PAD. На основании этих данных была проведена оценка способности бактерий разрушать молекулу ФК. Для этого оценивали изменение спектра поглощения ФК в среде с живыми и инактивированными клетками. Спектры поглощения растворов ФК с живыми клетками бактерий в начале реакции (линия 1), а также в суспензии инактивированных клеток бацилл после инкубации (линия 2) совпадали (рис. 2).

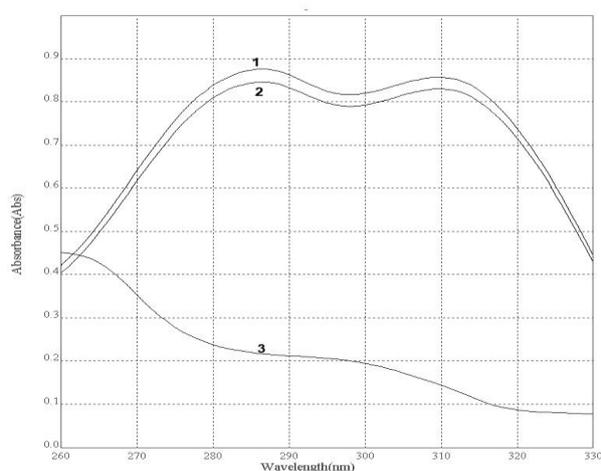


Рисунок 2 – Изменение спектра поглощения ФК в среде с клетками *B. subtilis* 26Д. 1 – спектр поглощения раствора ФК в среде с живыми клетками в начале реакции; 2 – спектр поглощения ФК после инкубации 120 мин в среде с инактивированными клетками; 3 – спектр поглощения раствора ФК через 120 мин инкубации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

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

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

Активность РНКаз и способность эндофитов защищать растения картофеля от вирусных инфекций

Механические повреждения растений «открывают ворота» не только микроорганизмам, но и вирусным частицам. В научной литературе пока недостаточно сведений о влиянии инокуляции растений эндофитными штаммами бактерий на распространение вирусной инфекции. Известно, что вирусы, поражающие растения, относятся к РНК-вирусам. Наличие РНК-аз у эндофитных штаммов бактерий может способствовать противостоянию растений в сообществе с такими микроорганизмами вирусам. До наших работ системных исследований наличия РНКазной активности у эндофитных штаммов бактерий мы не встречали в литературе, в связи с чем была поставлена задача оценки наличия и сравнительного уровня активности экзoРНКаз в культурах эндофитов.

Мы провели анализ активность РНКаз у 175 эндофитных штаммов бактерий, выделенных из разных видов растений, а также из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. Все штаммы бактерий, отнесенных нами к роду *Bacillus*, продуцировали ферменты, способные разрушать РНК на твердых средах. У бактерий *Pseudomonas* sp. такая активность проявлялась у 85% образцов, у *Enterobacter* sp. – у 64%. 32 неидентифицированных штамма также были способны секретировать РНКазы в окружающую среду. Зона вокруг колонии бактерии, в которой разрушалась дрожжевая РНК (зона гало), была больше у всех представителей рода *Bacillus* – в среднем 5,71 мм. Размер зоны гало у представителей *Pseudomonas* и *Enterobacter* был, примерно, одинаковый и составлял 1,84 и 1,74 мм, соответственно. Анализ способности эндофитов к деструкции РНК показал, что высокая активность этого фермента характерна для представителей рода *Bacillus*, тогда как многие представители *Enterobacter* не проявляют такой активности в постановке экспериментов на твердых агаризованных средах.

Анализ связи между активностью РНКаз в твердой среде и в жидкой культуре (табл. 8) выявил слабую положительную корреляции между этими показателями (коэффициент корреляции $r=0,50$).

Таблица 8 – Активность РНКаз в твердой среде и в жидкой культуре

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

Среди штаммов, проявляющих высокую активность РНКаз на твердых средах в виде зон гало встречались также штаммы, характеризующиеся одновременно и высокой антагонистической активностью к фитопатогенным грибам.

Совместно с сотрудниками лаборатории ИБГ УФИЦ РАН, а также Татарского НИИСХ КНЦ РАН, указанных в наших публикациях, установлено, что обработка растений картофеля препаратом, содержащим клетки *B. subtilis* 26Д - основу биофунгицида Фитоспорин-М, привела к уменьшению поражения растений вирусом М, а при обработке смесью штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. ssp. thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и *B. thuringiensis ssp. kurstaki* (ВКПМ В-6066), статистически достоверно уменьшилось распространение УВК и СВК на 57% и 44%, соответственно по сравнению с контролем. Подавление вирусной инфекции у картофеля при использовании препарата, содержащего три штамма бактерий, из которых два вида относятся к инсектотоксичным, могло проявиться благодаря как подавлению распространённости насекомых - переносчиков вирусов и уменьшению ими повреждения, так и наличию РНКаз. Выявлено, что оба штамма *B. thuringiensis* продуцировали РНКазы, наибольшей активностью характеризовался штамм ВКПМ-6066, наименьшей - ВКПМ-5351. Сходным образом обработка растений картофеля уменьшала степень распространения вирусов в условиях БНИИСХ УФИЦ РАН. Так, если на контрольных делянках было поражено 60% растений, то при обработке препаратом бактерий *B. subtilis* 26Д выявлено 18% больных растений, бактериями *B. thuringiensis* В-5689 - 33%.

В других экспериментах (получены совместно с соавторами статьи Sorokan et al, 2020) было выявлено, что обработка растений картофеля препаратами бактерий с более высокой активностью РНКаз в сравнении с другими штаммами эффективнее защищали растения от вирусов. Наименьший процент инфицированных растений был выявлен при обработке картофеля бактериями *Bacillus sp.* TS2, STL7, *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* ВКПМ 6066. Достоверно высокий коэффициент корреляции между титром клеток бактерий в тканях растений картофеля и распространённостью вирусов выявлен при

инфицировании вирусом S ($r=-0,865972$) и вирусом Y ($r=-0.76322$, через 17 дней и $r=-0,5734$ через 29 дней после обработки растений бактериями).

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

В нашей работе одним из основных объектов исследований был эндофитный штамм *B. subtilis* 26Д – основа коммерческого биофунгицида Фитоспорин-М, применяющегося в России на посевах сельскохозяйственных культур на протяжении нескольких десятилетий. Известно, что эта бактерия характеризуется антагонистической активностью к фитопатогенным грибам, и, как показано нами, способностью продуцировать РНКазы. Так как штамм является эндофитным, т.е. проникает в растения без механических повреждений, и безопасным согласно паспорту, возникло предположение о возможности трансформации его геном, кодирующим синтез инсектотоксичного белка, например, семейства Cry с целью получения штамма, проявляющего комплекс хозяйственно-полезных свойств. На этом основании нами была предпринята попытка трансформации этого штамма путем введения в геном бактерии указанного выше инсектотоксичного гена совместно с к.б.н. Благовой Д.К.

Для трансформации *B. subtilis* была использована интегративная плаزمида pDG1662 (рис.3).

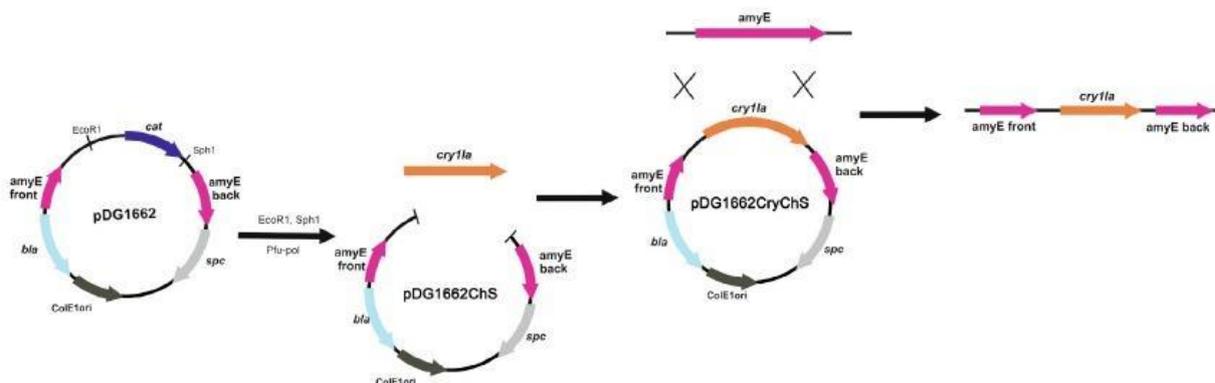


Рисунок 3 – Схема клонирования гена Cry1Aa.

В трансформации были получены линии с частотой 200 КОЕ/мкг плазмидной ДНК. Для проверки экспрессии данного гена в рекомбинантном штамме использовалась ОТ-ПЦР (рис. 4).

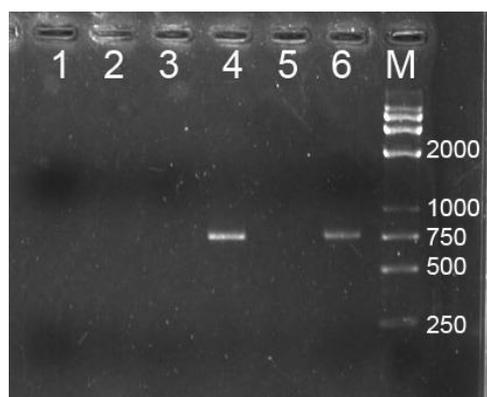


Рисунок 4 – Результат ОТ-ПЦР рекомбинантного штамма *B. subtilis* 26ДCry. Дорожки: 1 - РНК *B. subtilis* 26Д; 2 - к-ДНК *B. subtilis* 26Д; 3 - РНК *B. thuringiensis* ВПКМ-5351; 4 - к-ДНК *B. thuringiensis* ВПКМ-5351; 5 - РНК *B. subtilis* 26ДCry; 6 - к-ДНК *B. subtilis* 26ДCry; M – маркер молекулярной массы (Sibenzim).

Как видно на рис. 4, рекомбинантный штамм 26DCry содержал кДНК, аналогичную по размерам ДНК, кодирующую белок Cry у штамма *B. thuringiensis* ВПКМ-5351. Способность заселять ткани растений у рекомбинантного штамма осталась такая же, как и у дикого штамма *B. subtilis* 26Д. Количество КОЕ/г *B. subtilis* 26Д в растениях картофеля, составило $4 \times 10^5 \pm 2 \times 10^2$, а *B. subtilis* 26DCry - $5,2 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^2$.

Наличие генов устойчивости к антибиотикам, которые не присутствуют в естественных условиях в природных штаммах *B. thuringiensis*, но требуются для отбора рекомбинантов, считается проблемой с точки зрения экологической безопасности трансформированных штаммов. В связи с этим в дальнейших экспериментах ген *cat*, который определяет устойчивость трансформированных линий к хлорамфениколу, был удален перед трансформацией с использованием эндонуклеаз EcoR1 и SphI. Таким образом, селективным свойством трансформированных бактерий является только утрата способности гидролизировать крахмал.

Трансформированные линии выявляли на среде LB, содержащей 1% крахмала после воздействия паров йода (рис. 5).

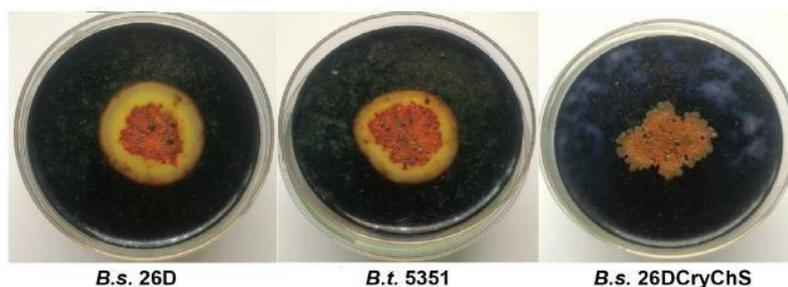


Рисунок 5 – Колонии бактерий *Bacillus* на среде LB, содержащей 1% крахмала, под действием паров йода.

Колонии исходного штамма *B. subtilis* 26Д (амилаза+) проявляли светлые ореолы на среде. Активности амилазы и светлого ореола вокруг колоний рекомбинантных линий не наблюдалось.

Рекомбинантные линии *B. subtilis* 26DCryChS не отличались по культурально-морфологическим признакам от исходного штамма *B. subtilis* 26Д. Плотность популяции клеток этой линии во внутренних тканях листьев картофеля составляла $5,1 \times 10^5$ КОЕ/г, что не меньше количества штамма *B. subtilis* 26Д (4×10^5 КОЕ/г). И штамм *B. subtilis* 26Д, и линия *B. subtilis* 26DCryChS обладали фунгистатическими свойствами по отношению к фитопатогену *S. nodorum*. Донор штамма Btcrylla – штамм *B. thuringiensis* B-5351 не подавлял рост *S. nodorum*. Антагонистическая активность *in vitro* против фитопатогена *Ph. infestans*, вызывающего фитофтороз картофеля, была на 20% больше, чем у исходного штамма *B. subtilis* 26Д. Обработка семян пшеницы бактериями штамма 26DCryChS стимулировала рост проростков; сохранилась также фосфатмобилизирующая активность клеток.

Новым свойством для модифицированного потомства бактерии *B. subtilis* 26DCryChS является высокая инсектицидная активность, существенно (примерно, в 2 раза) превышающая таковую по сравнению с исходным штаммом *B. subtilis* 26Д, сопоставимая, для сравнения, по значению с инсектицидными свойствами *B. thuringiensis* В-5351 по смертности тлей (61% и 58%, соответственно, табл. 21, данные получены совместно с соавторами статьи Maksimov, 2020) и превышающая значения у штамма *B. thuringiensis* В-5351 по смертности личинок колорадского жука в тесте с предварительной обработкой целых растений препаратами (26% и 62%, соответственно, данные получены совместно с соавторами статьи Sorokan, 2020). По данным научно-технической и патентной литературы модифицированный штамм ранее не был известен, что, в совокупности, позволило депонировать его в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ВНИИСХМ РАН под номером РСАМ04928 и далее запатентовать.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Благова, Д.К. Выделение и характеристика бактериальных эндофитов моркови (*Daucus carota L. var. sativus*) / Д.К. Благова, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – Т. 174. – № 13 – С. 10-12.
2. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И.В. Максимов, С.В. Веселова, Т.В. Нужная, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 6. – С. 763-775. (WoS/Scopus).
3. Максимов, И.В., Эндофитные бактерии как агенты для биопестицидов нового поколения (обзор) / И.В. Максимов, Т.И. Максимова, Е.Р. Сарварова, Д.К. Благова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. –Т. 54. –№ 2. – С. 134-148. (WoS/Scopus).
4. Бурханова, Г.Ф., Эндофитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивость картофеля к вирусам / А.В. Сорокань, Е.А. Черепанова, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. – Т. 23. – № 7. – С. 873-878. (WoS/Scopus).
5. Хайруллин, Р.М. К механизмам противовирусной активности бактерии *Bacillus* на растениях картофеля / Р.М. Хайруллин, Г.Ф. Бурханова, А.В. Сорокань, Е.Р. Сарварова, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, С.Г. Вологин, Ф.Ф. Замалиева, И.В. Максимов // Теоретическая и прикладная экология. – 2019. – № 4. – С. 130-135. (WoS/Scopus).
6. Maksimov, I.V. Recombinant *Bacillus subtilis* 26DCryChS line with gene Btcry1Ia encoding CryIIa toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. and greenbug *Schizaphis graminum* Rond / I.V. Maksimov, D.K. Blagova, S.V. Veselova, A.V. Sorokan, G.F. Burkhanova, E.A. Cherepanova, E.R. Sarvarova, S.D. Rummyantsev, R.M. Khayrullin // Biological Control. – 2020. – V. 144. – P. 14. (WoS/Scopus).
7. Sorokan, A.V., Endophytic *Bacillus* spp. as a Prospective Biological Tool for Control of Viral Diseases and Non-vector *Leptinotarsa decemlineata* Say. in *Solanum tuberosum* L. / A.V. Sorokan, E.A. Cherepanova, G.F. Burkhanova, S.V. Veselova, S.D. Rummyantsev, I. Mardanshin, E.R. Sarvarova, R.M. Khayrullin, I.V. Maksimov // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 11. – Art. 569457. (WoS/Scopus).
8. Сарварова, Е.Р. Феруловая кислота активизирует размножение и подвижность клеток эндофитного штамма бактерий *Bacillus subtilis* 26Д / Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов // Прикладная биохимия и микробиология – 2021. – № 4. – С. 388-393. (WoS/Scopus).

Публикации в других журналах и сборниках

9. Сарварова, Е.Р. Эндофитные бактерии в тканях зеленных культур / Е.Р. Сарварова, Д.К. Благова, Р.М. Хайруллин // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014», Москва. – 2014. – Т. 1. – С. 19-20.

10. Сарварова, Е.Р. Эндوفитные бактерии укропа и петрушки и перспективы их использования в растениеводстве / Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин // Материалы Международной Пущинской школы – конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пущино. – 2015. С. 198.

11. Благова, Д.К. Ростостимулирующие эндوفиты сельскохозяйственных растений / Д.К. Благова, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин // Материалы VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», Саратов. – 2016. – С. 83.

12. Хайруллин, Р.М. К термину «эндوفитные бактерии» / Р.М. Хайруллин, Е.Р. Сарварова // Вестник защиты растений. 2016. – №3. – С. 175-176.

13. Сарварова, Е.Р. Симбиоз растений с эндوفитными бактериями / Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин // Материалы научной конференции и школы молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», Судак. – 2017. – С. 62.

14. Благова, Д.К. Новый штамм *Bacillus subtilis* 26ДCryChS с инсектицидной и фунгистатичной активностью / Д.К. Благова, Т.И. Максимова, Е.Р. Сарварова, С.В. Веселова, И.В. Максимов // Материалы международной научной конференции «PLAMIC», Уфа. – 2018. – С. 105.

15. Сарварова, Е.Р. Влияние оксикоричных кислот на рост колоний и размножение клеток эндوفитных представителей *Bacillus subtilis* / Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин // Материалы международной научной конференции «PLAMIC», Уфа. – 2018. – С. 224.

16. Сарварова, Е.Р. Выделение эндوفитов из диких и культурных видов пшеницы / Е.Р. Сарварова, Д.К. Благова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы и методы в защите растений», Екатеринбург. – 2018. – С. 66-68.

17. Сарварова, Е.Р. Оценка рибонуклеазной активности коллекции эндوفитных микроорганизмов / Е.Р. Сарварова, Е.А. Черепанова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов // Материалы VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», Севастополь. – 2019. – С. 329-330.

18. Burkhanova, G.F. *Bacillus* bacteria in the resistance of potato plants to viruses / G.F. Burkhanova, A.V. Sorokan, E.R. Sarvarova, Z.M. Iskandarova, I.V. Maksimov // Материалы международной научной конференции «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology» Новосибирск. – 2019. –С. 53.

19. Такаева, И.Н. Эндوفитные бактерии и их рибонуклеазная активность / И.Н. Такаева, Е.А. Черепанова, Е.Р. Сарварова, И.В. Максимов // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. – 2020. – Т. 55. – № 2. – С. 54-59.

Патент

Максимов И.В., Благова Д.К., Сарварова Е.Р., Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Румянцев С.Д., Хайруллин Р.М. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* с комплексной биологической активностью. Патент № 2733132 от 27.06.2019.

Сарварова Елена Рафисовна

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

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Подписано в печать

Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 1

Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный

Отпечатано в