Lipopeptide producing endophytic bacteria of the genus *Bacillus* regulate wheat resistance to cereal aphids

Veselova S.V., Alekseev V.Yu., Rumyantsev S.D., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Kasimova A.R., Maksimov I.V.
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
E-mail: veselova75@rambler.ru

Key message. We have shown the direct and indirect effect of lipopeptide-producing endophytic bacteria of the genus *Bacillus* on the viability of greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. and the induction of systemic resistance in wheat plants.

Keywords: *Bacillus* spp., lipopeptides, *Schizaphis graminum*, insecticidal activity, induced systemic resistance

The most important condition for obtaining high yields is the integrated protection of crops from pests. In recent times, interest in biocontrol agents based on endophytic bacteria that stimulate plant growth and inhibit development of pests on plants due to various mechanisms, including the production of lipopeptides and the regulation of the pro-/antioxidant system of plants has increased. The aim of the work was to identify mechanisms of formation protective reactions of wheat plants under the influence of lipopeptide-producing endophytic bacteria of the genus *Bacillus* to greenbug aphid *S. graminum* Rond. Three strains of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* 26D, *B. subtilis* 11BM, *B. thuringiensis* B-6066 from the ARRIAM collection, and two *B. subtilis* isolates Tas-1 and Tas-8.2 isolated from the internal tissues of wheat plants were selected during the studies. The set of modern methods was used in the work: PCR, real-time PCR, high performance liquid chromatography (HPLC), spectrophotometric methods for determining redox-state of wheat plants. The method for checking insecticidal activity of bacterial strains against aphids has been adapted. The *sfp* gene encoding surfactin synthetase was found in the genomes of *B. subtilis* 26D, Tas-1, and Tas-8.2 strains, the *ituA* gene encoding iturin synthetase was detected in the *B. subtilis* 11BM genome. The *ituA* gene and *fenD* gene encoding fengicin synthetase were found in the *B. thuringiensis* B-6066 genome. The production of surfactin and iturin in *B. subtilis* 26D and 11BM strains respectively was confirmed by HPLC. All bacterial strains and their metabolites showed insecticidal activity against *S. graminum* under direct effect. With indirect (through the plant) effect on greenbug aphid bacterial strains synthesizing surfactin and fengicin, but not iturin, had the greatest effect on the viability of greenbug aphid and increased the tolerance of wheat plants, and also induced systemic resistance, which was manifested in the accumulation of ROS, increased peroxidase activity and the accumulation of genes transcripts encoding protective proteins are markers of salicylate and jasmonate signaling pathways (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9). This work was supported by State Project no. 0246-2018-0035 and the RFBR project no. 17-29-08014.

Липопептид продуцирующие эндофитные бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к злаковой тле

Веселова С.В., Алексеев В.Ю., Румянцев С.Д., Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Касимова А.Р., Максимов И.В.
Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

Аннотация. Показано прямое и опосредованное влияние липопептид-продуцирующих эндофитных бактерий рода *Bacillus* на жизнеспособность злаковой тли *Schizaphis graminum* Rond. и индукцию системной устойчивости в растениях пшеницы.

Ключевые слова: *Bacillus* spp., липопептиды, *Schizaphis graminum*, инсектицидная активность, системная индуцированная устойчивость

Важнейшим условием получения высоких урожаев является интегрированная защита посевов от вредителей. В последнее время возрос интерес к биологическим препаратам на основе эндофитных стимулирующих рост растений бактерий, сдерживающих развитие вредителей на растениях за счет различных механизмов, том числе за счет продукции липопептидов и регуляции работы про-/антиоксидантной системы растений. Целью работы было выявление механизмов формирования защитных реакций растений пшеницы под влиянием липопептид-продуцирующих эндофитных бактерий рода *Bacillus* к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. В ходе исследований было отобрано три штамма эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11BM, *B. thuringiensis* B-6066 из коллекции ВКПМ и два изолята *B. subtilis* Tas-1 и Tas-8.2, выделенные из внутренних тканей растений пшеницы. В работе использован комплекс современных методов: ОТ-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ВЭЖХ, спектрофотометрические методы определения концентрации активных форм кислорода (АФК) и активности про-/антиоксидантных ферментов, выделение и очистка метаболитов из среды культивирования микроорганизмов; адаптирован метод проверки инсектицидности бактериальных штаммов по отношению к тлям. В геномах штаммов *B. subtilis* 26Д, Tas-1 и Tas-8.2 обнаружен ген *sfp*, кодирующий сурфактин-синтетазу, в геноме *B. subtilis* 11BM выявлен ген *ituA*, кодирующий итурин-синтетазу. В геноме *B. thuringiensis* B-6066 обнаружены ген *ituA* и ген *fenD*, кодирующий фенгичин-синтетазу. Методом ВЭЖХ подтверждена продукция сурфактина и итурина штаммами *B. subtilis* 26Д и 11BM, соответственно. Все бактериальные штаммы и их метаболиты проявляли инсектицидную активность по отношению к *S. graminum* при прямом воздействии. При опосредованном через растение воздействии штаммы синтезирующие сурфактин и фенгичин, но не итурин оказывали наибольший эффект на жизнеспособность злаковой тли и выносливость растений пшеницы, также индуцировали системную устойчивость, что проявлялось в накоплении АФК, повышении активности пероксидаз и накоплении транскриптов генов, кодирующих защитные белки маркеры салицилат- и жасмонат-сигнальных путей (PR-1, PR-2, PR-3, PR-6, PR-9).

Работа выполнена в рамках госзадания № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ № 17-29-08014.