


Пятая международная научная конференция PlantGen2019

## Эндофитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивость картофеля к вирусам

Г.Ф. Бурханова , А.В. Сорокань, Е.А. Черепанова, Е.Р. Сарварова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

 e-mail: guzel\_mur@mail.ru

Вирусные заболевания ежегодно вызывают существенные потери урожая и заметно снижают качество продукции, в том числе важнейшей сельскохозяйственной культуры – картофеля. Антивирусных препаратов для растениеводства, которые были бы безопасны для человека и животных, не существует, и в этих условиях перспективным методом защиты растений является использование биопрепаратов на основе эндофитных микроорганизмов, продуцирующих РНКазы. В работе проанализирована способность ряда эндофитных штаммов *Bacillus* spp. продуцировать РНКазы и влиять на пораженность растений вирусом М, широко распространенным в средней полосе России, и урожайность раннеспелого сорта картофеля Удача в полевых условиях. Обнаружено, что обработка штаммами бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* снижала степень инфицированности растений вирусом М с 60 % в контроле до 18–30 % на участках, обработанных микроорганизмами. Аналогичным образом снизился индекс развития вирусной инфекции: с 14 % в контроле до 1–7 % у инокулированных растений. Кроме того, бактерии с высокой РНКазной активностью вызывали прибавку урожая картофеля до 40 %. Предполагается, что изученные бактерии способны не только повышать рост и урожайность картофеля, но и, благодаря своей РНКазной активности, подавлять распространение вируса М. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов, связанных с индукцией эндофитными бактериями защитных реакций растений в ответ на вирусные инфекции, приведет к лучшему пониманию фитоиммунитета растений. Более того, эндофитные штаммы *Bacillus* spp. с высокой РНКазной активностью могут стать основой для биопрепаратов комплексной защиты растений.


Ключевые слова: бактерии; РНКазы; вирусы; картофель.

**Для цитирования:** Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. Эндофитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивость картофеля к вирусам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):873-878. DOI 10.18699/VJ19.561

## Endophytic *Bacillus* bacteria with RNase activity in the resistance of potato plants to viruses

G.F. Burkhanova , A.V. Sorokan, E.A. Cherepanova, E.R. Sarvarova, R.M. Khairullin, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

 e-mail: guzel\_mur@mail.ru

Viral diseases annually cause significant crop losses and significantly reduce the quality of products, including potatoes, some of the most important crops. Currently, viruses cannot be controlled with chemical pesticides, since known antiviral compounds are teratogenic and hazardous to people's health. Biocontrol agents based on endophytic microorganisms may be an alternative to them. Many strains of *Bacillus* produce ribonucleases (RNases). Our laboratory possesses a collection of bacteria that produce various metabolites and have RNase activity. The results showed that the inoculation of potato with *B. subtilis* 26D and *B. thuringiensis* increased the grain yield by 32–43 %. In addition, the treatment of potato plants with *Bacillus* spp. significantly reduced the infection of potato plants with virus M. The prevalence of the disease in potato plants was significantly reduced from 60 % in the control to 18 % (*B. subtilis* 26D) and 25–33 % (*B. thuringiensis*) in the inoculated plants. Similarly, the infection index decreased from 14 in the control to 1 in the inoculated plants. The further study of molecular mechanisms related to bacterial induction of plant defense reactions in response to viral infections will lead to a better understanding of stress resistance problems. The endophytic microorganisms studied in this report may become the basis for the creation of biological agents for plant protection.

Key words: ribonuclease; phytopathogenic RNA-viruses; *Solanum tuberosum*.

**For citation:** Burkhanova G.F., Sorokan A.V., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Khairullin R.M., Maksimov I.V. Endophytic *Bacillus* bacteria with RNase activity in the resistance of potato plants to viruses. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):873-878. DOI 10.18699/VJ19.561 (in Russian)

### Введение

Существенные потери урожая (до 30 %) и заметное снижение качества продукции одной из важнейших продовольственных культур в мире, картофеля (*Solanum tubero-*

*sum*), связаны с вирусами. Известно более 40 видов вирусов, которые заражают картофель, многократно уменьшая продуктивность и ухудшая товарные свойства клубней, что описывается термином «вырождение сорта»

(Makarova et al., 2017). В числе главных магистральных путей борьбы с вирусной инфекцией остается селекция на вирусостойчивость. Однако источников генов иммунитета к важным вирусам с доминантным моногенным типом наследования не так много (Nicaise, 2017). Методически более эффективными в этих условиях оказались технологии редактирования геномов с использованием систем CRISPR/Cas9 (Romay, Bragard, 2017) и трансгеноза, когда в геном хозяйственно ценного сорта путем генетической трансформации вводятся определенные гены (Prins et al., 2008), например, кодирующие синтез потенциально антивирусных белков (интерферона, рибонуклеаз), белков, токсичных для насекомых (Сгу и Vip из бактерии *B. thuringiensis*, ингибиторы протеиназ), или белков самого вируса (Сташевски, Ильинская, 2009; Chung et al., 2013).

Несмотря на достаточный объем практических разработок препаратов для защиты растений от болезней на основе ризосферных и эндофитных штаммов бактерий, в научной литературе мало сведений о проявлении ими антивирусной активности, их влиянии на распространение и накопление вирусов в растительных тканях. Бицидная активность бактерий рода *Bacillus*, придаваемая им специфическими инсектицидными белками (белки Сгу и Vip из *B. thuringiensis*), бактериоцинами и липопептидами (Rodríguez et al., 2018), предполагает, что они способны опосредованно защищать растения от вирусов, воздействуя на их переносчиков, к которым относятся бактерии (фитопатогенные), простейшие, грибы, нематоды и насекомые-фитофаги. Соответственно, использование биопрепаратов-фунгицидов и инсектицидов на основе бактерий для борьбы с фитопатогенами и вредителями должно помочь и в снижении уровня размножения вирусов в растениях. Важно отметить, что в настоящее время наиболее перспективным считается поиск эндофитных микроорганизмов, которые, обитая во внутренних тканях растений, менее подвержены влиянию окружающей среды и в большей степени интегрированы в метаболизм растений, чем микроорганизмы ризо- и филлосферы.

Многие виды рода *Bacillus* проявляют свойства эндофитности (Burkhanova et al., 2017) и продуцируют ферменты с рибонуклеазной активностью (Ulyanova et al., 2016; Pinskaya et al., 2018). Так, 73 % выделенных из растений семейства Cucurbitaceae изолятов *Bacillus* продуцировали нуклеазы (Khalaf, Raizada, 2018). Синтез секретлируемых ферментов, включая РНКазы, которые участвуют в мобилизации фосфатов из органических соединений, является одним из способов адаптации бактерий к изменяющимся условиям обитания. В низких концентрациях они стимулируют рост и устойчивость растений и микроорганизмов к стрессам, а в высоких – обладают противовирусной активностью, разрушая вирусные РНК. Микробные РНКазы – это потенциальные терапевтические агенты, предложенные для терапии вирусных заболеваний человека (Mahmud et al., 2017). В связи с этим выявление биологических свойств эндофитных бактерий *Bacillus* spp. актуально для создания биопрепаратов с комплексной (антивирусной, иммунизирующей и рост-стимулирующей) активностью для экологически безопасной защиты растений картофеля от болезней и вредителей.

Целью данной работы была оценка РНКазной активности ряда штаммов эндофитных бактерий из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики (ИБГ) УФИЦ (<http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc>) и их влияния на устойчивость картофеля раннеспелого сорта Удача к фитопатогенным вирусам (вирусу картофеля М) в полевых условиях и урожайность.

## Материалы и методы

При проведении экспериментов использованы штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (B-5689), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (B-5351), любезно предоставленные для исследований ООО НВП «Башинком». Изоляты *B. subtilis* Stl-7, *B. subtilis* Stk-18, *B. subtilis* Stk-22 выделены из поверхностно стерилизованных тканей листьев картофеля различных сортов, произрастающих на территории Иглинского района Республики Башкортостан. Все штаммы бактерий идентифицированы на основании секвенирования нуклеотидной последовательности 16S РНК. Бактерии культивировали на среде LB в термостате ES-20 (Biosan, Латвия) при 25–27 °С. В экспериментах по оценке эндофитности и влияния бактерий на антивирусную активность и урожайность картофеля использовали суточные культуры.

Количественную оценку внеклеточной активности РНКаз в среде культивирования бактерий определяли согласно методике (Hole et al., 2004). Для этого штаммы выращивали на среде LB с добавлением дрожжевой РНК (6 г/л) (Sigma, США) при 30 °С. Через 48 ч культивирования чашки Петри с выращенными на поверхности питательной среды колониями бактерий заливали 3 мл 1 М хлорной кислоты и выдерживали в течение 5 мин для осаждения РНК. При отсутствии РНКаз среда культивирования становилась молочно-белой, а при наличии фермента вокруг бактериальной колонии формировалось прозрачное гало. Внеклеточную РНКазную активность оценивали, измеряя расстояние от края колонии до соответствующей линии. Количественную оценку внеклеточной РНКазной активности проводили в культуральном фильтрате с использованием спектрофотометра UNICO 2800 (США) при длине волны 260 нм по методике (Маргулис и др., 2012). Скорость ферментативной реакции оценивали по тангенсу угла наклона прямолинейного восходящего участка кривой зависимости светопоглощения от времени и выражали в увеличении поглощения за 1 мин на 1 мг белка.

Для определения эндофитности бактерий использовали пробирочные стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача, культивируемые в течение 25 сут при 16-часовой освещенности 12–16 тыс. люкс (лампы Osram L 36W/77, Германия) в климатоканнере КС200 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) на агаризованной среде Мурасиге–Скуга. Растения картофеля инокулировали экспериментальными штаммами микроорганизмов согласно методике, представленной в работе (Maksimov et al., 2015). Оценивали эндофитность путем определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в поверхностно стерилизованных тканях растений через 7 дней после инокуляции. Для этого навески по-

верхностно-стерилизованного растительного материала гомогенизировали в стерильных ступках. Затем их аликвоты распределяли по поверхности картофельно-глюкозного агара до полного высыхания. Чашки Петри инкубировали при температуре 28 °С в термостате ТС-1/20 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ) в течение 24 ч. Подсчет КОЕ бактерий производили во втором и третьем разведении, их количество пересчитывали на 1 г сырой массы растений.

Полевые исследования выполнялись на опытных полях Уфимского федерального исследовательского центра (Бирская опытная станция, 55°24'27" с. ш., 55°36'39" в. д.). Подготовка почвы и технология выращивания картофеля общепринятые для региона. Растения изучаемого ранне-спелого сорта Удача, культивируемого на указанной территории, высажены в трех повторностях, по 30 растений в каждой. В эксперименте использованы три варианта обработки двухнедельных всходов картофеля суспензией бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* В-5689, *B. thuringiensis* В-5351 в отдельности (100 мл/растение, 10<sup>6</sup> клеток/мл), а также контрольная обработка – опрыскивание водой. Опрыскивание повторяли после цветения таким же образом. На наличие вирусов растения оценивали с использованием иммуно-хроматографических наборов для экспрессного определения вирусов Х, Y, S, М и вируса скручивания листьев картофеля (ВСКЛК) по методике фирмы ООО «АгроДиагностика» (Москва). Фенологические наблюдения и диагностику вирусов осуществляли визуально до цветения растений, согласно (Методика..., 1995). Данные по урожайности обработаны методом дисперсионного анализа по Б.А. Доспехову (1985). Эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Статистический анализ выполнен с использованием стандартных математических методов в компьютерной программе Microsoft Excel.

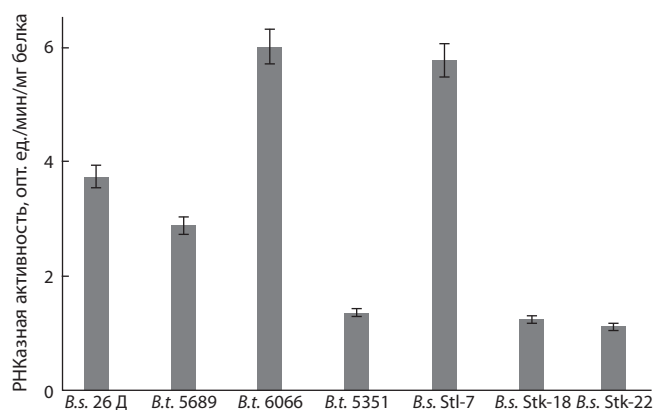
## Результаты

Скрининг коллекционных штаммов и изолятов бактерий из лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН показал наличие у них РНКазной активности. РНКазная активность была оценена методом измерения ширины развития гало и спектрофотометрически (табл. 1, см. рисунок). Между штаммами и изолятами, взятыми на анализ, наблюдались определенные различия в изменении ширины гало (см. табл. 1). С одной стороны, все использованные в эксперименте штаммы бактерий рода *Bacillus* обладали РНКазной активностью, при этом максимально высокая активность отмечена у изолята *B. subtilis* Stl-7, а минимальная – у штамма *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351. Вместе с тем выделенные из кишечника колорадского жука изоляты, такие как *Enterobacter* spp., идентифицированные ранее с использованием специфических праймеров, не имели внеклеточных РНКаз при тех же условиях выращивания (см. табл. 1).

Наибольшая активность РНКаз наблюдалась у бактерий штаммов *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-6066, *B. subtilis* Stl-7, *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689, что подтверждает применимость метода гало для скрининговых исследований (см. рисунок). Действительно, в работе (Hole et al., 2004) показана прямая корреляция между диаметром гало вокруг бактериальной колонии и

**Таблица 1.** РНКазная активность коллекционных штаммов и изолятов

Штаммы, изоляты	Гало, мм
<i>B. subtilis</i> 26Д	4.5
<i>B. subtilis</i> Stl-7	6.5
<i>B. subtilis</i> Stk-18	3.0
<i>B. subtilis</i> Stk-22	4.5
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> В-6066	4.0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> В-5689	5.0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> В-5351	2.0
<i>Enterobacter</i> sp. BeP	0
<i>Enterobacter</i> sp. m10	0
<i>Enterobacter</i> sp. m9	0



РНКазная активность штаммов *Bacillus* spp. в культуральном фильтрате.

концентрацией РНКазы, а также временем анализа. Следовательно, мы подтвердили, что по размеру гало можно судить об активности РНКаз, синтезируемых различными штаммами бактерий.

Штаммы *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351 и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689 были оценены на эндофитность (табл. 2). Бактерии *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351 обнаруживались в тканях растений картофеля в количестве порядка 10<sup>5</sup> КОЕ/г сырой массы. Бактерий штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689 в тканях растений было меньше, их количество составило не более 10<sup>3</sup> КОЕ/г сырой массы. Таким образом, проанализированные штаммы *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-5351 обладали большей способностью колонизировать внутренние ткани растений в сравнении со штаммом *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689.

Вероятно, применение бактерий, обладающих, с одной стороны, высокой РНКазной активностью, а с другой – способностью эффективно колонизировать ткани растений, может способствовать снижению степени развития вирусов на посадках картофеля. Для доказательства этого предположения штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д,



**Таблица 2.** Оценка содержания КОЕ бактерий рода *Bacillus* во внутренних тканях растений картофеля и их влияние на пораженность картофеля сорта Удача вирусом М и его урожайность

Показатель	Контроль (H <sub>2</sub> O)	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. thuringiensis</i>	
			var. <i>thuringiensis</i> B-5689	var. <i>kurstaki</i> B-5351
КОЕ/г сырой массы	0	5 · 10 <sup>5</sup>	5 · 10 <sup>3</sup>	1 · 10 <sup>5</sup>
Растения, пораженные вирусом М, %	60	18	33	25
Среднее развитие вируса М, % пораженных листьев на растение	14	1	1	7
Урожайность, ц/га	182.45 ± 12.38	241.91 ± 22.67	261.03 ± 23.59	205.58 ± 15.60
Прибавка, % от контроля	–	32	43	12

*B. thuringiensis* var. *kurstaki* B-5351 и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* B-5689 были испытаны в полевых условиях на посадках картофеля сорта Удача.

Предварительная оценка растений картофеля сорта Удача на наличие вирусов Х, Y, S и М и вируса скручивания листьев картофеля с использованием иммуно-хроматографических наборов фирмы ООО «Агродиагностика» показала высокий уровень инфицированности вирусом М (см. табл. 2). В полевых условиях на контрольных делянках почти 60 % растений картофеля сорта Удача были заражены вирусом М. Оценка степени развития болезни показала до 14 % визуально проявляемых симптомов.

В тех же условиях обработка растений картофеля экспериментальными штаммами бактерий заметно снижала как степень поражения, так и проявление вирусной инфекции. Наименьшее количество растений с симптомами вирусного заболевания наблюдалось на делянках, обработанных *B. subtilis* 26Д. Обработка картофеля штаммом бактерии *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* B-5689 (с низкой эндофитностью и высокой РНКазной активностью) двукратно снижала число растений с симптомами. Пораженность листьев на одном растении не превышала 1 %. Применение штамма бактерии *B. thuringiensis* var. *kurstaki* B-5351 (с низкой РНКазной активностью и высокой эндофитностью) препятствовало распространению вирусов. Однако пораженность растений в данном варианте была выше, чем при обработке штаммами с высокой активностью внеклеточного фермента. Вероятно, в последнем случае распространение инфекции было связано с инсектицидным эффектом *B. thuringiensis* var. *kurstaki* B-5351 (Сорокань и др., 2018).

Важно, что обработка бактериями *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* B-5689 значительно увеличивала урожайность картофеля, что могло быть обусловлено как их противовирусной активностью, так и рост-стимулирующим эффектом. При использовании *B. thuringiensis* var. *kurstaki* B-5351 прибавка урожая была менее значительной и составила 12 % от контроля.

## Обсуждение

Известно, что многие бактерии, в особенности из рода *Bacillus*, обладают широким спектром ферментов с РНКазной активностью, а также нуклеаз и других белков, отвечающих за РНК-интерференцию (Aguilar-Pulido et al., 2016). Например, бактерии *B. amyloliquefaciens*, *B. in-*

*termedius* и *B. licheniformis* могут вырабатывать внеклеточные рибонуклеазы, названные барназами, биназами и балифазами соответственно (Ulyanova et al., 2011, 2016). Установлено, что *B. cereus* ZH14 продуцирует новый тип противовирусной рибонуклеазы, которая секретируется в среду и активна против вируса табачной мозаики (Zhou, Niu, 2009). Представители рода *Bacillus*, к которому принадлежат чаще всего используемые в защите растений штаммы *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, также секретируют ферменты, проявляющие антивирусные и антираковые свойства (Ulyanova et al., 2011). Было показано, что введение гена бактериальной РНКазы в геном растений кукурузы (Zhang et al., 2001) и ячменя (Cao et al., 2013) подавляло развитие вирусной инфекции. Вероятно, с этим связана непосредственная способность РНКаз из *Pseudomonas putida* A3 разрушать частицы вируса табачной мозаики (BTM) в течение 30 мин в соке из инфицированных листьев табака (Guo et al., 2011; Yang et al., 2012). Согласно нашим данным, штаммы с высокой РНКазной активностью *in vitro* существенно снижали интенсивность развития симптомов вируса М на растениях картофеля сорта Удача в полевых условиях в сравнении со штаммами с низкой РНКазной активностью.

Многочисленное уменьшение степени поражения растений свеклы вирусом некротического пожелтения жилок (BNYVV) выявлено после их обработки бактерией *B. amylolequifaciens*, что коррелировало с уменьшением численности гриба *Polymyxa betae* и экспрессией растительных генов защитных белков (PR-8, NPR-1) (Desoignes et al., 2013). Обнаружено, что изолят *B. subtilis* BS3A25 и его культуральный фильтрат сдерживают развитие вируса мозаики огурца на томатах посредством угнетения переносчика этого заболевания – бахчевой тли *Aphis gossypii* (Sudhakar et al., 2011).

Поскольку большинство фитовирусов в качестве инфекционного начала содержат РНК, интерес представляет создание биопрепаратов на основе ризосферных и эндофитных бактерий с высокой РНКазной активностью или же грубого препарата самой РНКазы для защиты растений от вирусной инфекции (Sharipova et al., 2015), а также создание генно-модифицированных растений с внедренным в них геном нуклеаз (Trifonova et al., 2018). Известно, что некоторые ферменты-нуклеазы обладают противовирусной активностью, и высокая устойчивость к патогенам наблюдается в трансгенных растениях карто-

феля, экспрессирующих, например, бактериальную нуклеазу *Serratia marcescens* (Trifonova et al., 2018).

Использованные в нашей работе штаммы проявляли также инсектицидный эффект против колорадского жука (Сорокань и др., 2018) и злаковой тли (Veselova et al., 2019), которая служит переносчиком вирусных заболеваний и на долю которой приходится до 20 % из всех видов тлей, поражающих картофель (Екатеринская и др., 2016). Обнаружено, что сами бактериальные барназы, помимо способности формировать защиту от вирусной инфекции, могут участвовать в защите растений от других болезней, например табака от фитофтороза, что доказано на трансгенных растениях, продуцирующих барназу (Natsoulis, Voeke, 1991). По данным Х.Х. Али с соавторами (2010), возбудитель фитофтороза сохраняет и распространяет с помощью своих зооспор вирус картофеля X. Ранее нами было показано, что *B. subtilis* 26Д эффективно снижает пораженность растений грибом *Phytophthora infestans* (Maksimov et al., 2015), что также может способствовать снижению распространенности вирусов. Важно отметить, что для эффективного подавления вирусных заболеваний необходимо постоянное присутствие противовирусных соединений непосредственно в тканях растений, что делает эндофитные микроорганизмы, продуцирующие РНКазы, перспективными агентами биоконтроля вирусов. Эти данные хорошо согласуются с одним из подходов в защите растений от вирусной инфекции путем использования эндофитных бактерий *Bacillus* spp., «усиленных» РНКазой, в качестве основы противовирусных препаратов для защиты растений. Однако данных о применении такого подхода при создании биопрепаратов с комплексом защитных свойств в научных публикациях не встречается.

## Заключение

Исходя из полученных нами данных, можно сказать, что использование биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* снижает естественный вирусный инфекционный фон, который зависит от эндофитности штаммов и способности бактерий продуцировать внеклеточные РНКазы. Соответственно, защита растений при помощи эндофитных бактерий рода *Bacillus*, продуцентов РНКаз, может играть важную роль в предотвращении распространения фитовирусной инфекции, что позволяет приступить к разработке биопрепаратов с комплексной (антивирусной, инсектицидной, фунгицидной, бактерицидной, иммунизирующей и рост-стимулирующей) активностью для экологически безопасной защиты растений от болезней и вредителей.

## Список литературы / References

Али Х.Х., Келдыш М.А., Помазков Ю.И. Новый переносчик вируса X картофеля – гриб *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Вестник РУДН. Сер.: Агрономия и животноводство. 2010;3:18-23. [Ali X.X., Keldish M.A., Pomazkov U.I. New vector of the potato virus X – *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzby Narodov. Seriya: Agronomiya i Zhivotnovodstvo = Bulletin of the RUDN University. Ser.: Agronomy and Livestock. 2010; 3:18-23. (in Russian)]  
Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М., 1985.  
[Dospheov B.A. Methodology of Field Experience. Moscow, 1985. (in Russian)]

Екатеринская Е.М., Тайков В.В., Карпова О.В. Особенности лета крылатых тлей на посадках оздоровленного картофеля, выращиваемого в Костанайском НИИСХ. Защита картофеля. 2016; 1:3-5.  
[Ekaterinskaya E.M., Taykov V.V., Karpova O.V. Features of the flight of winged aphids on plantings of virus-free potato grown at the Kostanay Research Institute of Agriculture. Zashhita Kartofelya = Potato Protection. 2016;1:3-5. (in Russian)]  
Маргулис А.Б., Сиадат О.В., Никитина Е.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Гомосеринлактон как регулятор индуцибельных и конститутивных ферментов микроорганизмов. Вестн. Казан. технол. ун-та. 2012;15(17):173-176.  
[Margulis A.B., Ciadat O.V., Nikitina E.V., Kolpakov A.I., Il'inskaja O.N. Homoserine lactone as a regulator of inducible and constitutive enzymes of microorganisms. Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo Universita = Bulletin of the Kazan National Research Technological University. 2012;15(17):173-176. (in Russian)]  
Методика исследований по защите картофеля от болезней, вредителей, сорняков и иммунитету. М.: ВНИИКХ, 1995.  
[Methodology of Studies on Potato Protection from Diseases, Pests, and Weeds and on Potato Immunity. Moscow: VNIKH Publ., 1995. (in Russian)]  
Сорокань А.В., Бенковская Г.В., Благова Д.К., Максимова Т.И., Максимов И.В. Реакция защитной системы и изменения в составе кишечных симбионтов колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* под влиянием эндофитных бактерий рода *Bacillus*. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2018;54(4):264-270.  
[Sorokan A.V., Benkovskaja G.V., Blagova D.K., Maksimova T.I., Maksimov I.V. Defense responses and changes in symbiotic gut microflora in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* under the effect of endophytic bacteria from the genus *Bacillus*. Zhurnal Evolyutsionnoy Biokhimii i Fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2018;54(4):264-270. (in Russian)]  
Сташевски З., Ильинская О.Н. Вирусостойчивость трансгенных растений картофеля *Solanum tuberosum* L., несущих *PVY<sup>NTN</sup>-CP* ген белка оболочки Y вируса картофеля. Экол. генетика. 2009; 7(4):41-50.  
[Stasevski Z., Ilinskaja O.N. *PVY<sup>NTN</sup>-CP* coat protein gene mediated virus resistance of transgenic potato plants. Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics (St. Petersburg). 2009;7(4):41-50. (in Russian)]  
Aguiar-Pulido V., Huang W., Suarez-Ulloa V., Cickovski T., Mathee K., Narasimhan G. Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. Evol. Bioinform. 2016; 12(S1):5-16. DOI 10.4137/EBO.S36436.  
Burkhanova G.F., Veselova S.V., Sorokan A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk. Appl. Biochem. Microbiol. 2017;53(3):346-352. DOI 10.1134/S0003683817030048.  
Cao X., Lu Y., Di D., Zhang Z., Liu H., Tian L., Zhang A., Zhang Y., Shi L., Guo B., Xu J., Duan X., Wang X., Han C., Miao H., Yu J., Li D. Enhanced virus resistance in transgenic maize expressing a dsRNA-specific endoribonuclease gene from *E. coli*. PLoS One. 2013;8(4):e60829. DOI 10.1371/journal.pone.0060829.  
Chung B.N., Yoon J.Y., Palukaitis P. Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y. Virus Genes. 2013;47:86-92. DOI 10.1007/s11262-013-0904-4.  
Desoignes N., Schramme F., Ongena M., Legrève A. Systemic resistance induced by *Bacillus* lipopeptides in *Beta vulgaris* reduces infection by the rhizomania disease vector *Polymyxa betae*. Mol. Plant Pathol. 2013;14(4):416-421. DOI 10.1111/mpp.12008.  
Guo M., Chen Y., Du Y., Dong Y., Guo W., Zhai S., Zhang H., Dong S., Zhang Z., Wang Y., Wang P., Zheng X. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. PLoS Pathog. 2011;7(2):e1001302. DOI 10.1371/journal.ppat.1001302.

- Hole R.C., Singhal R.S., Melo J.S., D'Souza S.F. A rapid plate screening technique for extracellular ribonuclease producing strains. *BARC Newsletter*. 2004;249:91-97.
- Ilinskaya O., Ulyanova V., Lisevich I., Dudkina E., Zakharchenko N., Kusova A., Faizullin D., Zuev Y. The native monomer of *Bacillus pumilus* ribonuclease does not exist extracellularly. *BioMed Res. International*. 2018;4837623. DOI 10.1155/2018/4837623.
- Khalaf E.M., Raizada M.N. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Front. Microbiol.* 2018;9:42. DOI 10.3389/fmicb.2018.00042.
- Mahmud S.R., Müller C., Romanova Y., Mostafa A., Ulyanova V., Pleschka S., Ilinskaya O. Ribonuclease from *Bacillus* acts as an antiviral agent against negative- and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses. *BioMed Res. International*. 2017; 5279065. DOI 10.1155/2017/5279065.
- Makarova S.S., Makarov V.V., Taliansky M.E., Kalinina N.O. Virus resistance in potato: current state and prospects. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(8):845-857. DOI 10.1134/S2079059717050148.
- Maksimov I.V., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Sarvarova E.R., Khairullin R.M. Plant growth-promoting bacteria in regulation of plant resistance to stress factors. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015;62(6):715-726. DOI 10.1134/S1021443715060114.
- Natsoulis G., Boeke J.D. New antiviral strategy using capsid-nuclease fusion proteins. *Nature*. 1991;352:632-635.
- Nicaise V. Boosting innate immunity to sustainably control diseases in crops. *Curr. Opin. Virol.* 2017;26:112-119. DOI 10.1016/j.coviro.2017.07.030.
- Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M. Strategies for anti-viral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.* 2008;9(1):73-83. DOI 10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x.
- Rodríguez M., Marín A., Torres M., Béjar V., Campos M., Sampedro I. Aphicidal Activity of Surfactants Produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front. Microbiol.* 2018;9:3114. DOI 10.3389/fmicb.2018.03114.
- Romay G., Bragard C. Antiviral defenses in plants through genome editing. *Front. Microbiol.* 2017;8:47. DOI 10.3389/fmicb.2017.00047.
- Sharipova M., Rockstroh A., Balaban N., Mardanova A., Toymen-tseva A., Tikhonova A., Vologin S., Stashevsky Z. Antiviral effect of ribonuclease from *Bacillus pumilus* against phytopathogenic RNA-viruses. *Agric. Sci.* 2015;6:1357-1366. DOI 10.4236/as.2015.611130.
- Sudhakar N., Thajuddin N., Murugesana K. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection of tomato in the field against cucumber mosaic virus and its vector *Aphis gossypii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 2011;21(3):367-386. DOI 10.1080/09583157.2011.552969.
- Trifonova E.A., Ibragimova S.M., Volkova O.A., Shumny V.K., Kochetov A.V. Ribonuclease activity as a new prospective disease resistance marker in potato. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):987-991. DOI 10.18699/VJ18.441.
- Ulyanova V., Mahmud R.Sh., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two *Bacillus* strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2016;62:181-188. DOI 10.2323/jgam.2016.02.005.
- Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates. *FEBS J.* 2011;278(19):3633-3643. DOI 10.1111/j.1742-4658.2011.08294.
- Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rummyantseva S.D., Blagova D.K., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019;55:46-52. DOI 10.1134/S0003683819010186.
- Yang J., Guo C., Zhai X., Shen L., Qian Y., Wang F. Inactivation of Tobacco mosaic virus in soil by *Pseudomonas putida* A3-m strain to prevent virus mosaic disease. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012;6:6300-6307. DOI 10.5897/AJMR12.1123.
- Zhang L., French R., Langenberg W.G., Mitra A. Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. *Transgenic Res.* 2001; 10(1):13-19.
- Zhou W.W., Niu T.G. Purification and some properties of an extracellular ribonuclease with antiviral activity against tobacco mosaic virus from *Bacillus cereus*. *Biotechnol. Lett.* 2009;1:101-105. DOI 10.1007/s10529-008-9831-1.

#### ORCID ID

G.F. Burkhanova [orcid.org/0000-0003-2346-3502](https://orcid.org/0000-0003-2346-3502)  
A.V. Sorokan [orcid.org/0000-0002-0443-7547](https://orcid.org/0000-0002-0443-7547)  
E.A. Cherepanova [orcid.org/0000-0002-9976-0944](https://orcid.org/0000-0002-9976-0944)  
E.R. Sarvarova [orcid.org/0000-0002-0599-7618](https://orcid.org/0000-0002-0599-7618)  
R.M. Khairullin [orcid.org/0000-0001-86130786](https://orcid.org/0000-0001-86130786)  
I.V. Maksimov [orcid.org/0000-0002-5707-3265](https://orcid.org/0000-0002-5707-3265)

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках совместного международного гранта РФФИ и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии, № 19-46-02004.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.06.2019. После доработки 26.08.2019. Принята к публикации 26.08.2019.