Ответные реакции растений картофеля при обработке смесями бактерий *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами в условиях водного дефицита и вирусного заражения

© Ж. Н. Калацкая^{1*}, Е. Л. Недведь¹, Н. В. Балюк¹, К. М. Герасимович¹, Е. И. Рыбинская¹, И. А. Овчинников¹, Н. А. Копылова¹, Л. Г. Яруллина², Н. А. Ламан¹

¹Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072 г. Минск, улица Академическая, 27.

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

*Email: kalatskayaj@mail.ru

Обработка смесями *Bacillus subtilis* 47 с МеЖ или с СК+МеЖ, зараженных Y-вирусом растений картофеля и выращиваемых в условиях водного дефицита, способствует активному росту растений в сравнении с инфицированными и снижению вирусной нагрузки на 16% и 12% соответственно. При этом выявлено увеличение содержания пролина и общей пероксидазной активности в листьях растений. Применение *B. subtilis* отдельно или с СК не вызвало положительного эффекта по снижению инфицирования или сохранению роста растений в условиях недостаточного влагообеспечения.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., *Bacillus subtilis* 47, салициловая кислота (СК), метилжасмонат (МеЖ), Y вирус картофеля, пролин, пероксидаза

Картофель занимает одно из лидирующих мест в мировом валовом производстве. По официальным данным FAOSTAT мировой урожай данной культуры в 2019 году составил свыше 370 млн метрических тонн, а общая посевная площадь, отводимая под картофель, насчитывала 17,34 млн гектаров [1]. Повсеместно наблюдаемые ухудшения влагообеспечения почвы, связанные с уменьшением и неравномерностью выпадения осадков в сочетании с повышенным температурным режимом, являются существенным лимитирующим фактором роста и развития растений картофеля и формирования урожая клубней [2,3]. Кроме того, ослабленные растения более уязвимы для различных фитопатогенов. Так, например, широко распространённый Y вирус картофеля, может вызывать снижение урожайности культуры более чем на 50% [4].

Одним из решений экологически безопасного повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды и вирусным заболеваниям является применение бактерий рода *Bacillus*, способных индуцировать устойчивость к широкому кругу стрессоров [5-9]. Защитный спектр бактерий рода *Bacillus* можно значительно расширить, комбинируя их с сигнальными молекулами, например, с жасмоновой или салициловой кислотами. Однако научные публикации содержат противоречивые сведения о взаимодействии этих молекул и их сигнальных путей при комплексном действии неблагоприятных факторов различной природы [5, 8-10].

Целью работы являлось изучение ответных реакций растений картофеля к совместному действию дефицита почвенной влаги и заражению Y-вирусом при обработке растений смесями бактерий *Bacillus subtilis* с салициловой кислотой и/или метилжасмонатом.

Опыты проведены в контролируемых лабораторных условиях на микроклонально размноженных растениях картофеля белорусской селекции сорта Бриз. Адаптацию растений-регенерантов осуществляли на почвогрунте на основе верхового торфа с добавлением элементов питания в виде минеральных солей. Адаптированные растения обрабатывали путем опрыскивания листовой поверхности различными вариантами смесей бактерий *Bacillus subtilis* 47 (биопрепарат Карфил, производство Институт микробиологии НАН Беларуси) в концентрации 1×10^7 КОЕ с метиловым эфиром жасмоновой кислоты (МеЖ) – 1×10^{-7} моль/л и/или салициловой кислотой (СК) – 1×10^{-6} моль/л). Заражение Y- вирусом картофеля (YBK) проводили путём натирания клеточным соком доноров листьев растений картофеля при помощи мелкозернистой наждачной бумаги через 3 суток после обработки. Моделирование условий почвенной засухи начинали через неделю после обработки растений и продолжали в течение 2-х недель до появления симптомов повреждений на листьях. Влажность почвогрунта в опытном варианте (40-45% от полной влагоёмкости (ПВ)) достигалась снижением полива растений. Степень заражения картофеля Y- вирусом определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкции [11]. Пробы отбирали через 14 дней после инфицирования. Содержание пролина определяли по методу Bates с соавт. [12], общую активность растворимой пероксидазы по Бояркину [13], используя в качестве хромогенного субстрата бензидин. Анализ состава и содержания веществ фенольной природы проводили методом ВЭЖХ (в настоящей статье данные не приводятся в связи с неполной идентификацией индивидуальных соединений). Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами, на диаграммах указаны средние значения с отклонениями, указывающими величину стандартной ошибки средней арифметической.

В условиях водного дефицита обработка растений *B. subtilis* не способствовала уменьшению заражения листьев картофеля, однако при использовании смесей бактерий с МеЖ и МеЖ+СК выявлено снижение уровня инфицирования на 16% и 12% соответственно (Рис. 1).

Рис. 1. Оптическая плотность в ИФА зараженных Y-вирусом листьев растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, выращиваемых в условиях водного дефицита

Инфицирование вызвало торможение роста побегов и снижение их длины по сравнению с контролем на 23,2%. Применение *B. subtilis* в смеси с МеЖ способствовало сохранению роста, а смесь *B. subtilis* с МеЖ + СК ускоряла рост, длина побегов увеличилась на 14,3% по сравнению с контрольными растениями, выращиваемыми при водном дефиците (Рис. 2).

Рис. 2. Высота растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, зараженных Y-вирусом и выращиваемых в условиях водного дефицита

Заражение растений Y-вирусом на фоне водного дефицита привело к снижению содержания пролина. Максимальное накопление пролина на 89% по отношению к здоровым растениям и практически в 3 раза по отношению к инфицированным отмечено в варианте обработки смесью *B.subtilis* + СК. Опрыскивание комплексом *B.subtilis* с СК и МеЖ способствовало увеличению пролина на 39% по отношению к здоровым растениям и в 2,2 раза к инфицированным. При обработках *B.subtilis* и *B.subtilis* + МеЖ содержание пролина оставалось на уровне незараженных растений (Рис. 3).

Рис. 3. Содержание пролина в листьях растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, зараженных Y-вирусом и выращиваемых в условиях водного дефицита

Заражение Y-вирусом вызвало увеличение общей пероксидазной активности практически в 2 раза в листьях контрольных растений, а применение смесей *B.subtilis* + МеЖ и *B.subtilis* с СК и МеЖ способствовало увеличению активности по сравнению с инфицированным контролем на 27,3 и 36,1% соответственно (Рис. 4).

Рис. 4. Общая пероксидазная активность в листьях растений картофеля при обработке *Bacillus subtilis* с иммуномодуляторами, зараженных Y-вирусом и выращиваемых в условиях водного дефицита

При водном дефиците и заражении Y-вирусом общее содержание фенольных соединений в вариантах опыта оставалось практически одинаковым, однако применение *B. subtilis* и смеси *B. subtilis* с СК вызвали значительные изменения в накоплении отдельных индивидуальных соединений. Так, выявлено увеличение содержания хлорогеновой, кофейной, феруловой, салициловой кислот и рутина.

Таким образом установлено, что обработка смесями *B.subtilis* + МеЖ и *B.subtilis* с СК + МеЖ, зараженных Y-вирусом растений картофеля и выращиваемых в условиях водного дефицита, способствует активному росту в сравнении с инфицированными растениями и снижению вирусной нагрузки на 16% и 12% соответственно. При этом выявлено увеличение содержания пролина и общей пероксидазной активности в листьях растений. Известно положительное влияние жасмонатов в формировании устойчивости к неблагоприятным факторам различной природы (действие засухи и грибной инфекции) [14]. Применение *B.subtilis* отдельно или в смеси с СК не вызвало положительного эффекта по снижению степени инфицирования или сохранению роста растений в условиях недостаточного влагообеспечения, однако в данных вариантах зарегистрировано значительное изменение содержания накопления индивидуальных фенольных соединений, высокое содержание эндогенной салициловой кислоты, а в варианте *B.subtilis*+СК отмечено также максимальное накопление пролина. Известно, что салициловая кислота, участвует в регуляции метаболизма азота, пролина, синтеза глицин-бетаина, антиоксидантной системы защиты и водного потенциала в условиях стресса [15]. Полученные результаты свидетельствуют, что ответные реакции растений картофеля, инфицированного Y- вирусом картофеля и выращиваемого в условиях водного дефицита, скорее всего, достигнуты действием сигнальных молекул – салициловой кислоты и метилжасмоната, а биологическая эффективность штамма *B. subtilis* 47 оказалась невысокой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б20Р-154.

Литература

1. Statistic // FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Режим доступа: <https://www.statista.com/statistics/382174/global-potato-production>. – Дата доступа: 10.01.2021.
2. Пузанский Р. К. Метаболомика – современный подход при изучении адаптации растений картофеля к биотическому и абиотическому стрессу (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, № 1. С. 15-28.
3. Hamooh B. T., Sattar F. A., Wellman G., Mousa M. A. A. Metabolomic and biochemical analysis of two potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars exposed to in vitro osmotic and salt stresses // Plants. 2021. Vol. 10(1). P. 98.
4. Макарова С. С., Макаров В. В., Тальянский М. Э., Калинина Н. О. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. №1. С. 62-73.
5. Lastochkina O. B. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biotic Strategy to Cope with Abiotic Stresses in Wheat / O.B. Lastochkina [et al.] // Wheat Production in Changing Environments. 2019. P.579-614.
6. Коломиец Э. И., Сверчкова Н. В., Мандрик-Литвинкович М. Н. Экологически безопасные биотехнологии для сельского хозяйства // Наука и инновации. 2019. № 3 (193). С. 4–9.
7. Гриц А. Н. Действие комплексного препарата с индукторами устойчивости к патогенам на инфицирование X-вирусом растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) / А. Н. Гриц [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. 2021. Т. 66, № 2. С. 159–168.
8. Бурханова Г. Ф. Эндوفитные бактерии *Bacillus* spp. с РНКазной активностью и устойчивость картофеля к вирусам / Г.Ф. Бурханова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23, №7. С. 873-878
9. Сорокань А. В., Бурханова Г. Ф., Алексеев В. Ю., Максимов И. В. Влияние совместной обработки эндوفитным штаммом бактерий *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислотой на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 109–130.
10. Максимов И. В. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про-/антиоксидантной системы в растениях картофеля при фитофторозе / И.В. Максимов [и др.] // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 2. С. 243–251.
11. Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля / Рос. с.-х. акад. НПО по картофелеводству. – М.:Коренево, 2016. – 8с.
12. Bates L. S., Waldren R. P., Teare J. D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies// Plant and Soil.1973. – V. 39, № 1. – P. 205–207.
13. Ермаков А. И., Арасимович В.В., Яраш Н. П. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, Ленинград, 1987. 400 с.

14. Луговая А. А. Влияние жасмоновой кислоты на продуктивность растений ячменя и их устойчивость к засухе и грибным инфекциям // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Сер. Біологія. 2015. Вип. 3 (36). С. 54-61.

15. Miura K., Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.*, 2014, 5: 4.

Responses of potato plants treated mixtures *Bacillus subtilis* and immunomodulators in water deficiency conditions and viral infection

J. N. Kalatskaja^{1*}, H. L. Nedved¹, N. V. Baliuk¹, K. M. Herasimovich¹, E. I. Rybinskaya¹, I. A. Ovchinnikov¹, N. A. Kopylova¹, L. G. Yarullina², N. A. Laman¹

¹*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus*

17 Akademicheskaya Street, 220072 Minsk, Republic of Belarus.

²*Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences*

71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: kalatskayaj@mail.ru*

Treatment with *Bacillus subtilis* 47 mixtures with MeJ or with MeJ+SA of potato plants infected with the Y-virus and grown under water deficiency conditions, promotes active plant growth in comparison with infected plants and reduces the viral load by 16% and 12%, respectively. At the same time, an increase in the proline content and the total peroxidase activity in the leaves of plants was revealed. The applied of *B. subtilis* alone or with SA did not cause a positive effect on reducing infection or preserving plant growth at water deficiency conditions.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., *Bacillus subtilis* 47, salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJ), Y potato virus, proline, peroxidase