

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.93, 635.21, 57.047

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-135-143>

Поступила в редакцию 10.10.2019

Received 10.10.2019

Е. В. Вязов<sup>1</sup>, Т. Г. Каляга<sup>1</sup>, Е. А. Филипчик<sup>1</sup>, О. Ю. Сафонова<sup>1</sup>, А. Н. Гритс<sup>2</sup>,  
Е. Н. Карасева<sup>2</sup>, Т. Б. Макарова<sup>2</sup>, А. Л. Ольшаникова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь

### ВЛИЯНИЕ ЭЛИСИТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЗАЩИТНОЙ СИСТЕМЫ РАССАДЫ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.), ЗАРАЖЕННОЙ X-ВИРУСОМ

**Аннотация.** Изучены содержание активных форм кислорода, активность фенольной пероксидазы и уровни экспрессии генов, кодирующих отдельные защитные белки в рассаде картофеля, выращенной на субстрате с добавлением препарата на основе *B. subtilis* и зараженной X-вирусом. Установлены уровень накопления активных форм кислорода и индукция компонентов защитной системы в листьях картофеля в присутствии данного препарата при заражении. Выявлено меньшее количество вирусного материала в опытных пробах рассады картофеля по сравнению с не обработанным *B. subtilis* контролем.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*, картофель, PR-белки, индуцированная устойчивость, X-вирус картофеля, элиситоры, защитная система, активные формы кислорода

**Для цитирования:** Влияние элиситоров бактериального происхождения на функционирование защитной системы рассады картофеля (*Solanum Tuberosum* L.), зараженной X-вирусом / Е. В. Вязов [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 135–143. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-135-143>

Yauhen V. Viazau<sup>1</sup>, Tatsiana G. Kaliha<sup>1</sup>, Elena A. Filipchik<sup>1</sup>, Olga Y. Safonova<sup>1</sup>, Aleksandr N. Grits<sup>2</sup>,  
Elena N. Karasiova<sup>2</sup>, Tatsiana B. Makarova<sup>2</sup>, Anna L. Olshaniukova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

### THE EFFECT OF ELICITORS OF BACTERIAL ORIGIN ON THE FUNCTIONING OF THE PROTECTIVE SYSTEM OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) SEEDLINGS INFECTED WITH X-VIRUS

**Abstract.** The reactive oxygen species content, the activity of phenolic peroxidase, and the expression levels of genes encoding certain defense proteins were studied in potato seedlings grown on a substrate with the addition of a preparation based on *B. subtilis* and infected with potato virus X. The accumulation of reactive oxygen species and the induction of the defense system components in potato leaves treated with this preparation and infected are shown. Less viral material was detected in experimental samples of potato seedlings compared with control untreated with *B. subtilis*.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, potato, PR proteins, induced resistance, potato virus X, elicitors, defense system, reactive oxygen species

**For citation:** Viazau Y. V., Kaliha T. G., Filipchik E. A., Safonova O. Y., Grits A. N., Karasiova E. N., Makarova T. B., Olshaniukova A. L. The effect of elicitors of bacterial origin on the functioning of the protective system of potato (*Solanum tuberosum* L.) seedlings infected with X-virus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 135–143 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-135-143>

**Введение.** В условиях Беларуси картофель традиционно размножают клубнем (вегетирующим побегом), который зачастую накапливает вирусную и бактериальную инфекции. Для создания безвирусной рассады картофеля используют технологические методы микрочлонирувания регенерантов апикальной меристемы. В целях защиты последних от инфекции применяют индукторы устойчивости, стимулирующие иммунную систему растительного организма [1–3]. В настоящее время используют различные соединения, в частности салициловую кислоту, жасмоновую кислоту, хитозан, α-токоферол, а также микробиологические препараты – так называемые элиситоры (например, на основе бактерий рода *Bacillus*), вызывающие формирование

системной устойчивости растений к широкому спектру патогенов. При этом, в зависимости от используемого индуктора, может формироваться как системная приобретенная устойчивость (systemic acquired resistance), вызываемая в естественных условиях патогенами и насекомыми, так и индуцированная системная устойчивость (induced systemic resistance), вызываемая обычно бактериями и грибами, обитающими в ризосфере [4–6]. Так, например, салициловая кислота участвует в формировании устойчивости первого типа посредством индукции накопления PR-белков, фитоалексинов, реакции гиперчувствительности, генерации активных форм кислорода (АФК) и лигнификации клеточной стенки, а жасмоновая кислота – в формировании устойчивости второго типа, связанной с накоплением жасмонатов и активацией широкого спектра защитных реакций. Взаимодействие растения с патогенами во многом определяется сочетанием механизмов обеих форм системной устойчивости.

Салициловая кислота, жасмоновая кислота, хитозан,  $\alpha$ -токоферол и препараты на основе бактерий рода *Bacillus* благодаря их способности активировать механизмы индукции неспецифической защиты могут, в частности, быть использованы как индукторы вирусоустойчивости растений картофеля, защищающие их от возможного заражения вирусными патогенами на длительное время. Одним из наиболее распространенных таких патогенов является X-вирус картофеля (ХВК) [7].

Эффективность функционирования защитной иммунной системы растительных организмов можно изучать с помощью молекулярно-биологических подходов. Одним из таких подходов является анализ уровней экспрессии генов, кодирующих специфические защитные белки (в том числе PR-белки). Так, показано, что высокие уровни экспрессии генов, кодирующих  $\beta$ -1,3-глюканазу, хитиназу, тауматин-подобный белок и ингибитор протеиназ, связаны с большей устойчивостью растений пшеницы к патогенам [8].

Помимо уровней экспрессии генов защитных белков значимыми показателями функционирования защитной системы растения являются активность фенольной пероксидазы (ФПО), участвующей в лигнификации клеточной стенки [9], а также содержание фенольных соединений и АФК, играющих важную роль в формировании ответной реакции растительного организма на внедрение патогена.

Цель настоящей работы – анализ содержания активных форм кислорода и водорастворимых фенольных соединений, активности фенольной пероксидазы и уровней экспрессии генов, кодирующих маркер гиперчувствительного ответа,  $\beta$ -1,3-глюканазу, хитиназу, тауматин-подобный белок и ингибитор протеиназ, а также определение степени инфицирования вирусом листьев рассады картофеля при его заражении X-вирусом в присутствии элиситоров бактериального происхождения.

**Объекты и методы исследования.** В качестве объекта исследования использовали рассаду картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Уладар, которую выращивали под светодиодными источниками света при совместном использовании ламп Светозар и ДНаТ 400 (дуговые натриевые трубчатые лампы) на ионообменном субстрате «Триона» (разработан в Институте экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси), содержащем элиситоры микробного происхождения (препарат «Карфил» на основе бактериального штамма *Bacillus subtilis* 47). Помимо этого субстрат включал цеолит, катионит Purolite C-100, анионит Tulsion A2ХМП и перлит в соотношении 14:1:5:20. Заражение ХВК проводили путем микроинъекции в верхушечную часть 20-дневных растений, одновременно натирая листья клеточным соком растений-доноров ХВК при помощи мелкозернистой наждачной бумаги [10]. Навески четвертого листа растения брали для исследования в день заражения, а также через 1 и 2 недели после него.

Общий уровень АФК в экстрактах растений картофеля определяли с помощью зонда – 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата, который в присутствии АФК окисляется до флуоресцирующего продукта дихлорфлуоресцеина [11]. Содержание пероксида водорода оценивали с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии  $H_2O_2$ , катализируемая пероксидазой хрена [12].

Для определения активности ФПО использовали методику, описанную в работе [13]. Кинетику реакции регистрировали в течение 8–10 мин при длине волны поглощения 436 нм. О скорости

реакции судили по наклону кривой кинетики. Активность ФПО рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции  $25,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Содержание водорастворимых фенольных соединений оценивали спектрофотометрическим методом и рассчитывали в относительных единицах [14]. Содержание общего белка определяли по методу Бредфорда [15].

Для оценки уровней экспрессии генов, кодирующих PR-белки, из листьев картофеля выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzol<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Германия). Количество выделенной РНК определяли по поглощению света при 260 нм на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США). Степень чистоты полученных образцов оценивали по соотношению  $A_{260}$  к  $A_{280}$  (данный показатель должен быть больше 1,7) [16]. Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез кДНК осуществляли с помощью ProtoScript II Reverse Transcriptase (BioLabs, США) в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США). Полученную кДНК хранили в морозильной камере при  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  [16]. Для подбора ген-специфичных олигонуклеотидных праймеров, специфичных к генам защитных белков, использовали последовательности мРНК выбранных генов, найденных в базе данных “Nucleotide” NCBI. Праймеры синтезировали в лаборатории ДНК-праймеров Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Праймеры для генов *Chit*, *Glu*, *Tlp*, *Prlnh*, *HSR* подбирали самостоятельно, а для гена-нормализатора *EF*, кодирующего фактор элонгации  $1\alpha$ , взяли из работы [17]. Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР-анализа в реальном времени (ПЦР-РВ). Реакционная смесь (10 мкл) содержала: 1 мкл кДНК; 10 пмоль каждого праймера; 4 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green («СИНТОЛ», Россия) и воду. ПЦР-РВ проводили с использованием термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим реакционным модулем CFX96 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: предварительная денатурация – при  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 мин; плавление – при  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 с; отжиг – при  $55\text{--}60 \text{ }^\circ\text{C}$  45 с. Количество циклов амплификации – 40–50. Для обработки полученных результатов использовали программу Bio-Rad CFX Maestro.

Фитовирусы картофеля определяли с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкции [18]. Пробы отбирали через 20 дней после инфицирования.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программы Excel 2010 (Microsoft, США) и SigmaPlot 12.5 (SYSTAT Software). Рассчитывали среднее арифметическое значений отдельных повторностей, стандартную ошибку среднего и достоверность отличий между средними величинами [19]. Все описанные эксперименты проводили в трехкратной биологической повторности.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе исследования проведен анализ содержания АФК и активности защитной системы рассады картофеля при внесении биопестицида «Карфил» на основе штамма *Bacillus subtilis* 47 в качестве индуктора устойчивости в состав корнеобитаемой среды ионообменного субстрата № 2 со следующими концентрациями этого препарата: 0, 10, 50 и 100 мл/л раствора (варианты «Контроль», «*B. sub.* 10р», «*B. sub.* 50р», «*B. sub.* 100р») соответственно, где р означает промилле, мл/л). Препарат «Карфил» в данном случае выступал в качестве индуктора защитной системы растения благодаря присутствию в его составе элиситоров бактериального происхождения.

В исходных пробах, до заражения рассады вирусами, наибольшее общее содержание АФК было отмечено в вариантах «*B. sub.* 50р» и «*B. sub.* 100р» (рис. 1, а), где оно было выше контроля примерно в 2 раза. Данный эффект мог быть вызван индуцирующим действием самого препарата, а также его элиситорными компонентами, которые, не являясь патогенами для растения, стимулировали его естественные защитные механизмы. Напротив, содержание пероксида водорода в исходных пробах было более высоким в контроле и при низкой концентрации препарата (вариант «*B. sub.* 10р») (рис. 1, б).

Через 1 неделю после заражения ХВК содержание АФК в контроле возросло в 1,5 раза по сравнению с исходным значением, что отражает сам процесс инфицирования ХВК, при этом в варианте «*B. sub.* 10р» количество АФК оставалось без изменения по отношению к контролю, а в вариантах «*B. sub.* 50р» и «*B. sub.* 100р» уровень АФК снижался в среднем в 1,4 раза. Подобная

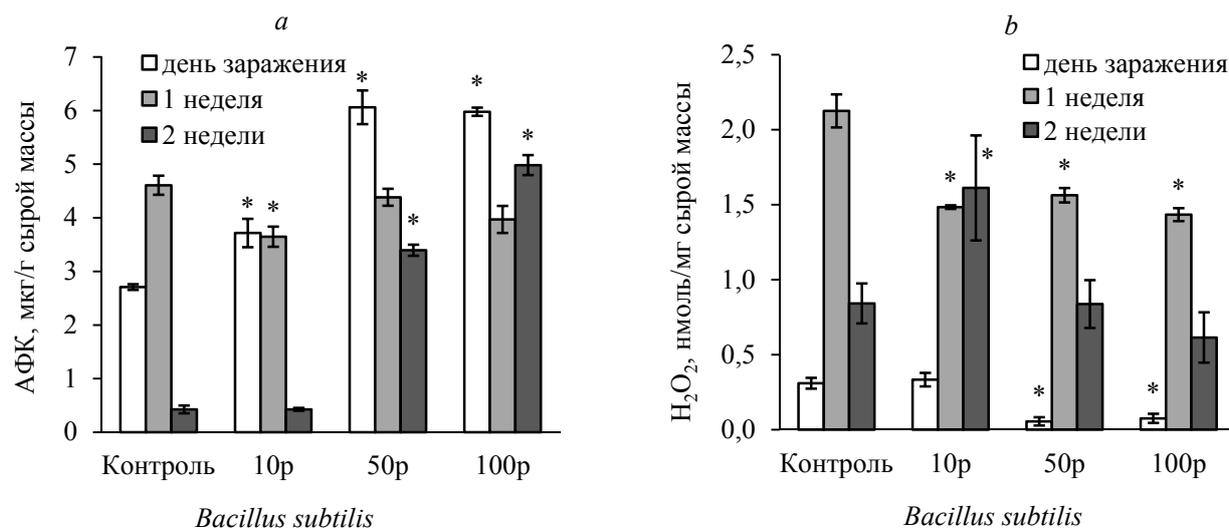


Рис. 1. Общее содержание АФК (a) и содержание  $H_2O_2$  (b) в листьях рассады картофеля, выращенной на субстрате, содержащем препарат на основе *Bacillus subtilis*. Здесь и далее \* – статистически значимые отличия от контроля ( $p \leq 0,05$ )

Fig. 1. Total ROS content (a) and  $H_2O_2$  content (b) in potato seedlings grown on substrate containing preparation based on *Bacillus subtilis*. Here and elsewhere, \* – statistically significant difference from control ( $p \leq 0.05$ )

сложная динамика изменения уровня АФК при заражении ХВК на фоне действия препарата «Карфил» в вариантах «*B. sub.* 50p» и «*B. sub.* 100p» обусловлена, по-видимому, общим стрессо-протекторным действием препарата, которое в значительной степени компенсирует эффект повышения АФК при инфицировании ХВК.

Спустя 2 недели после заражения растений вирусом в контроле и в варианте «*B. sub.* 10p» резко уменьшалось количество АФК (в среднем в 7,3 раза), в варианте «*B. sub.* 50p» снижение уровня АФК составляло 35 %, а в варианте «*B. sub.* 100p», напротив, оно возрастало на 24 % относительно показателей, зарегистрированных через 1 неделю после заражения вирусом соответственно. Вероятно, такая динамика изменения уровня АФК в инфицированных растениях обусловлена временными процессами взаимодействия элиситорных компонентов препарата, а также развитием с течением времени процесса заражения. Учитывая значимость АФК как сигнальных молекул, можно предположить, что вариант «*B. sub.* 100p» является наиболее перспективным с точки зрения формирования индуцированной устойчивости к ХВК в рассаде картофеля.

Возвращаясь к анализу содержания  $H_2O_2$ , следует отметить эффект резкого возрастания количества  $H_2O_2$  спустя 1 неделю после заражения в контрольной рассаде. Содержание пероксида водорода увеличивалось также и в опытных вариантах, но в меньшей степени. Вместе с тем стоит подчеркнуть, что через 2 недели после заражения наблюдалось снижение содержания  $H_2O_2$  в вариантах «*B. sub.* 50p» и «*B. sub.* 100p».

Таким образом, элиситорные компоненты микробиологического препарата на основе *B. subtilis* в целом при добавлении их в качестве компонента корнеобитаемой среды приводили к заметному возрастанию уровня АФК, особенно в вариантах «*B. sub.* 50p» и «*B. sub.* 100p». Более низкие по сравнению с контролем уровни  $H_2O_2$  в указанных вариантах позволяют предположить активацию систем детоксикации пероксида водорода, в частности аскорбат-глутатионового цикла [20], в рамках формирования индуцированной устойчивости рассады картофеля под действием элиситоров бактериального происхождения.

В ходе изучения компонентов защитной системы обнаружено, что в исходных пробах активность ФПО в вариантах с использованием препарата была ниже контроля практически в 2 раза (рис. 2, a). Вместе с тем через 1 неделю после заражения ХВК активность ФПО в контроле снижалась в 1,7 раза, а в вариантах «*B. sub.* 10p», «*B. sub.* 50p» и «*B. sub.* 100p», напротив, увеличивалась в 1,6; 1,6 и 2,2 раза соответственно по сравнению с исходными значениями. Спустя 2 недели после заражения в контрольных растениях активность ФПО продолжала уменьшаться. Активность

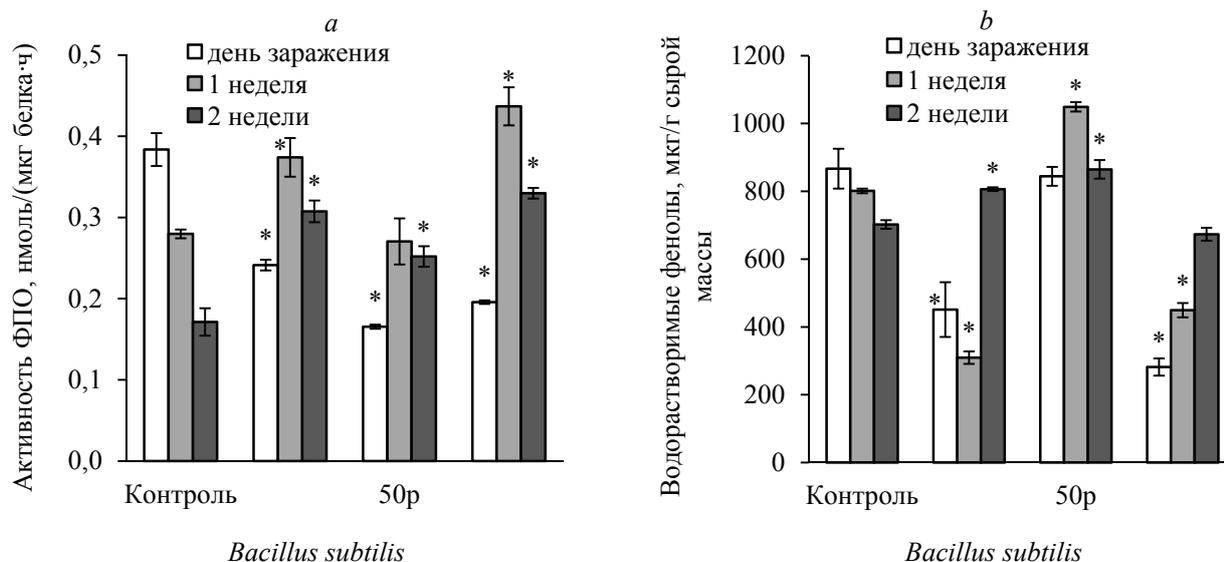


Рис. 2. Активность ФПО (a) и содержание водорастворимых фенолов (b) в листьях рассады картофеля, выращенной на субстрате, содержащем препарат на основе *Bacillus subtilis*

Fig. 2. Phenolic peroxidase activity (a) and water-soluble phenolics content (b) in potato seedlings grown on substrate containing preparation based on *Bacillus subtilis*

фермента в рассаде, выращенной в присутствии элиситоров, была также ниже через 2 недели после заражения, чем через 1 неделю. Тем не менее активность фенольной пероксидазы в такой рассаде оставалась выше исходных значений, а также превышала контроль. Таким образом, добавление элиситоров положительно влияло на активность ФПО в условиях заражения ХВК.

Как правило, в растительных клетках между активностью ФПО и количеством водорастворимых фенольных соединений существует обратная корреляция, а именно: чем выше активность фермента, тем ниже уровень фенолов, так как указанные соединения потребляются в ходе работы фермента. Эта закономерность однозначно не выявлена для рассады картофеля, зараженной вирусом (рис. 2, b), что в принципе объяснимо. Так, известно, что водорастворимые фенольные соединения не только являются субстратом ФПО, но и выполняют функцию тушителей свободных радикалов в растительной клетке.

Для дальнейшего изучения активности защитной системы рассады картофеля была проанализирована экспрессия 5 генов, кодирующих специфические защитные белки. Так, в зараженных и незараженных растениях контрольного и опытных вариантов определяли экспрессию гена – маркера гиперчувствительного ответа (*HSR*), отвечающего за быстрый ответ клетки на проникновение патогена; гена *Chit*, кодирующего хитиназу, гидролизующую хитин грибов; гена *TLP*, кодирующего тауматин-подобный белок, лизирующий грибные споры; гена, кодирующего эффективный ингибитор протеиназ (*PrInh*), и гена  $\beta$ -1,3-глюканазы (*Glu*), расщепляющей глюканы грибов. В результате анализа для исходных проб была выявлена следующая закономерность: по мере увеличения добавляемого количества препарата повышалась экспрессия большинства изучаемых генов (*HSR*, *Chit*, *TLP* и *Glu*) по сравнению с контролем. Особенно резко она возрастала в варианте «*B. sub.* 100р» (табл. 1).

В целом, по уровню экспрессии гены можно расположить в следующем порядке: *TLP* > *Chit* > *Glu* > *HSR* > *PrInh*. Согласно полученным данным, спустя 1 неделю после заражения растений ХВК в контроле и в варианте «*B. sub.* 10р» экспрессия генов *HSR*, *TLP*, *Chit* и *Glu* оставалась на исходном уровне, в то время как в вариантах «*B. sub.* 50р» и «*B. sub.* 100р», напротив, она резко снижалась относительно исходного уровня. Через 2 недели в зараженной вирусом рассаде только в варианте «*B. sub.* 100р» экспрессия генов претерпела значительное увеличение по сравнению со значениями, полученными через 1 неделю после заражения.

При изучении экспрессии гена *PrInh* имели место некоторые характерные особенности (табл. 1). В частности, изначально уровень экспрессии данного гена возрастал относительно контроля по мере увеличения концентрации *Bacillus subtilis* до 50р, но при его концентрации 100р уровень экспрессии снижался и приближался к контролю. Тем не менее, через 2 недели после заражения уровень экспрессии *PrInh* в варианте «*B. sub.* 100р» резко возрастал и превышал исходное значение практически в 2 раза. Подобные колебания в экспрессии данного гена, вероятно, объясняются цикличностью во времени разворачивания защитных механизмов растения при вирусном инфицировании.

Таблица 1. Экспрессия генов, кодирующих защитные белки, в листьях рассады картофеля, выращенной на субстрате, содержащем препарат на основе *Bacillus subtilis*

Table 1. Expression of defense protein genes in the leaves of potato seedlings grown on substrate containing preparation based on *Bacillus subtilis*

Ген/время с момента заражения		Нормализованная экспрессия, %			
		Контроль	<i>B. sub.</i> 10р	<i>B. sub.</i> 50р	<i>B. sub.</i> 100р
<i>TLP</i>	День заражения	1,00 ± 0,01	0,58 ± 0,25	4,32 ± 1,50	14,23 ± 1,36*
	1 неделя	1,53 ± 0,25	1,42 ± 0,34	0,83 ± 0,40*	1,07 ± 0,60
	2 недели	0,1 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,48 ± 0,03	2,65 ± 0,55*
<i>Chit</i>	День заражения	1,00 ± 0,14	0,24 ± 0,04*	1,19 ± 0,08	7,85 ± 0,65*
	1 неделя	0,68 ± 0,10	0,15 ± 0,05*	0,64 ± 0,02	1,49 ± 0,30*
	2 недели	0,01 ± 0,00	0,44 ± 0,04*	1,84 ± 0,01*	2,36 ± 0,16*
<i>HSR</i>	День заражения	1,00 ± 0,04	0,96 ± 0,04	1,69 ± 0,27*	3,48 ± 0,86*
	1 неделя	1,00 ± 0,32	0,99 ± 0,12*	0,89 ± 0,43*	1,19 ± 0,49*
	2 недели	1,07 ± 0,12	0,29 ± 0,02	0,87 ± 0,04*	2,65 ± 0,01*
<i>Glu</i>	День заражения	1,00 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,34 ± 0,09*	6,04 ± 0,67*
	1 неделя	0,21 ± 0,08	0,18 ± 0,00	0,12 ± 0,07	1,49 ± 0,55*
	2 недели	2,45 ± 0,15	0,89 ± 0,02*	1,84 ± 0,28*	1,01 ± 0,07*
<i>PrInh</i>	День заражения	1,00 ± 0,16	1,83 ± 0,00*	2,48 ± 0,37*	1,39 ± 0,10*
	1 неделя	0,86 ± 0,02	1,42 ± 0,43	0,74 ± 0,23	0,02 ± 0,02*
	2 недели	0,73 ± 0,02	0,01 ± 0,00*	0,03 ± 0,00*	2,65 ± 0,28*

Примечание. Контроль – без добавления *Bacillus subtilis*.

Для оценки степени вирусного инфицирования в листьях рассады картофеля нами был проведен ИФА с пробами следующих вариантов: «контроль» без заражения, «контроль» с заражением ХВК и «*B. sub.* 100р», также с заражением ХВК. Пробы отбирались через 20 дней после инфицирования. Показано, что после заражения ХВК как в контроле, так и в варианте «*B. sub.* 100р» регистрируется увеличение ОП<sub>492</sub> (табл. 2), что говорит об успешном заражении. В то же время пробы рассады картофеля, выращенной на субстрате с добавлением 100 мл/л препарата на основе *B. subtilis*, характеризовались почти вдвое меньшим значением ОП<sub>492</sub>, чем контроль (с заражением). По-видимому, это свидетельствует о более эффективной работе защитной системы, индуцированной препаратом, в частности ее компонентов, участвующих в элиминации проникшего патогена.

Таблица 2. Данные ИФА с антителами для ХВК в пробах зараженных и незараженных растений картофеля

Table 2. Data of ELISA with antibodies for potato virus X in infected and uninfected potato plants samples

Вариант	Контроль без заражения	Контроль с заражением	<i>B. sub.</i> 100р зараженный
ОП <sub>492</sub>	0,12	0,46	0,27

**Заклучение.** Полученные результаты показывают, что использование микробиологического препарата на основе *B. subtilis* в условиях заражения ХВК в целом приводит к увеличению содержания АФК, активности ФПО и уровней экспрессии генов, кодирующих отдельные защитные белки (хитиназу,  $\beta$ -1,3-глюканазу, тауматин-подобный белок), а также гена – маркера гиперчувствительного ответа. Кроме того, это позволяет снизить содержание ХВК в листьях рассады картофеля при заражении вирусом. Таким образом, препарат на основе *B. subtilis* в концентрации 50 и 100 мл/л в субстрате вызывает индукцию защитной системы рассады картофеля и формирование устойчивости к ХВК.

**Благодарности.** Работа финансирована в рамках Государственной программы Республики Беларусь «Научные технологии и техника» (мероприятие 34, 2016–2020 гг.).

**Acknowledgements.** This work was supported by the State Program of the Republic of Belarus “Science-intensive technologies and equipment”, grant 34 (2016–2020).

### Список использованных источников

1. Янчевская, Т. Г. Оптимизация минерального питания растений / Т. Г. Янчевская. – Минск : Беларус. навука, 2014. – 456 с.
2. Янчевская, Т. Г. Физиолого-биохимическая оптимизация минерального питания растений / Т. Г. Янчевская. – LAP LAMBERT Academic Publishing, 2018. – 547 с.
3. Stimulation of cellular mechanisms of potato antiviral resistance by the action of a preparation based on *Bacillus subtilis* bacteria / T. G. Yanchevskaya [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. – 2018. – Vol. 54, N 3. – P. 324–330. <https://doi.org/10.1134/S0003683818030158>
4. Поликсенова, В. Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) / В. Д. Поликсенова // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2009. – № 1. – С. 48–60.
5. Choudhary, D. K. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action / D. K. Choudhary, A. Prakash, B. N. Johri // Indian J. Microbiol. – 2007. – Vol. 47, N 4. – P. 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
6. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants / F. J. Romera [et al.] // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – Art. 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>
7. Salazar, L. F. Potato viruses and their control / L. F. Salazar. – Lima, Peru : Intern. Potato Center (CIP), 1996. – 214 p.
8. PR-белки как маркеры устойчивости озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к листовым патогенам / Е. В. Вязов [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 286–291.
9. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.) / В.-R. Lee [et al.] // J. Exp. Botany. – Vol. 58, N 6. – P. 1271–1279. <https://doi.org/10.1093/jxb/er1280>
10. Инокуляция, накопление и идентификация вируса PVY картофеля в тест-растениях *Nicotiana tabacum* / В. Т. Хасанов [и др.] // Вестн. КАТУ им. С. Сейфуллина. – 2012. – № 4 (75). – С. 31–36.
11. Crow, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species / J. P. Crow // Nitric Oxide. – 1997. – Vol. 1, N 2. – P. 145–157. <https://doi.org/10.1006/niox.1996.0113>
12. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative / J. G. Mohanty [et al.] // J. Immunol. Methods. – 1997. – Vol. 202, N 2. – P. 133–141. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(96\)00244-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(96)00244-X)
13. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress / T. Gechev [et al.] // J. Plant Physiol. – 2003. – Vol. 160, N 5. – P. 509–515. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00753>
14. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях / М. Н. Запрометов. – М. : Наука, 1993. – 272 с.
15. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
16. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: метод. указания / И. Н. Доманская [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2011. – 31 с.
17. Пасалари, Х. Экспрессия генов защитного ответа в листьях трансгенного картофеля после обработки глифосатом / Х. Пасалари, А. Н. Евтушенков // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2016. – № 1. – С. 31–35.
18. Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля / Рос. с.-х. акад. НПО по картофелеводству. – М. : Коренево, 2011. – 8 с.
19. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика: учеб. пособие / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск : Выш. шк., 1973. – 318 с.
20. Asada, K. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks / K. Asada // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2000. – Vol. 355, N 1402. – P. 1419–1431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0703>

## References

1. Yanchevskaya T. G. *Optimisation of mineral nutrition of plants*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2014. 456 p. (in Russian).
2. Yanchevskaya T. G. *Physiological and biochemical optimisation of mineral nutrition of plants*. S. 1., LAP LAMBERT Academic Publishing, 2018. 547 p. (in Russian).
3. Yanchevskaya T. G., Grits A. N., Kolomiets E. I., Romanovskaya T. V., Yarullina L. G., Ibragimov R. I., Tsvetkov V. O. Stimulation of cellular mechanisms of potato antiviral resistance by the action of a preparation based on *Bacillus subtilis* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, vol. 54, no. 3, pp. 324–330. <https://doi.org/10.1134/S0003683818030158>
4. Poliksenova V. D. Induced resistance of plants to pathogens and abiotic stress factors (on the example of tomato). *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya* [Bulletin of the Belarusian State University. Series 2, Chemistry. Biology. Geography], 2009, no. 1, pp. 48–60 (in Russian).
5. Choudhary D. K., Prakash A., Johri B. N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 2007, vol. 47, no. 4, pp. 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
6. Romera F. J., García M. J., Lucena C., Martínez-Medina A., Aparicio M. A., Ramos J., Alcántara E., Angulo M., Pérez-Vicente R. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10, art. 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>
7. Salazar L. F. *Potato viruses and their control*. Lima, Peru, Intern. Potato Center (CIP), 1996. 214 p.
8. Vyazov E. V., Radyuk M. S., Filipchik E. A., Shalygo N. V. PR-proteins as markers of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance to leaf pathogens. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 286–291 (in Russian).
9. Lee B. R., Kim K. Y., Jung W. J., Avicé J. C., Ourry A., Kim T. H. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, vol. 58, no. 6, pp. 1271–1279. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl280>
10. Khasanov V. T., Muranets A. P., Orazbaeva G. K., Bukaev A. A. Inoculation, accumulation and identification of potato PVY virus in *Nicotiana tabacum* test plants. *Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo universiteta im. S. Seifullina = Bulletin of Science of the Kazakh Agro Technical University named after S. Seifullina*, 2012, no. 4 (75), pp. 31–36 (in Russian).
11. Crow J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*, 1997, vol. 1, no. 2, pp. 145–157. <https://doi.org/10.1006/niox.1996.0113>
12. Mohanty J. G., Jaffe J. S., Schulman E. S., Raible D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*, 1997, vol. 202, no. 2, pp. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
13. Gechev T., Willekens H., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W., Toneva V., Minkov I. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology*, 2003, vol. 160, no. 5, pp. 509–515. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00753>
14. Zaprometov M. N. *Phenolic compounds: distribution, metabolism and functions in plants*. Moscow, Nauka Publ., 1993. 272 p. (in Russian).
15. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
16. Domanskaya I. N., Radyuk M. S., Budakova E. A., Samovich T. V., Spivak E. A., Shalygo N. V. *DNA typing technology for genes of barley resistance to drought: guidelines*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2011. 31 p. (in Russian).
17. Pasalari H., Evtushenkov A. N. PR-genes expression in the lives of transgenic potato plants after glyphosate treatment. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya* [Bulletin of the Belarusian State University. Series 2, Chemistry. Biology. Geography], 2016, no. 1, pp. 31–35 (in Russian).
18. *Instructions for use of the enzyme-linked immunosorbent assay kit for the determination of potato viruses*. Moscow, Korenevo Publ., 2011. 8 p. (in Russian).
19. Rokitskii P. F. *Biological statistics. 3rd ed.* Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 318 p. (in Russian).
20. Asada K. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2000, vol. 355, no. 1402, pp. 1419–1431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0703>

## Информация об авторах

Вязов Евгений Викторович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [viazau@yahoo.com](mailto:viazau@yahoo.com)

Калыга Татьяна Геннадьевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [t\\_kalyaga@mail.ru](mailto:t_kalyaga@mail.ru)

## Information about the authors

Yauhen V. Viazau – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [viazau@yahoo.com](mailto:viazau@yahoo.com)

Tatsiana G. Kaliaga – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [t\\_kalyaga@mail.ru](mailto:t_kalyaga@mail.ru)

*Филипчик Елена Александровна* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lenafil050494@mail.ru

*Сафонова Ольга Юрьевна* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga.safonova.1995@mail.ru

*Гриц Александр Николаевич* – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexander196431@yahoo.com

*Карасева Елена Николаевна* – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ledymc\_net@mail.ru

*Макарова Татьяна Борисовна* – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: t62makarova@mail.ru

*Ольшаникова Анна Леонидовна* – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: annaolshanikova@mail.ru

*Elena A. Filipchik* – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lenafil050494@mail.ru

*Olga Y. Safonova* – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga.safonova.1995@mail.ru

*Aleksandr N. Grits* – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexander196431@yahoo.com

*Elena N. Karasiova* – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ledymc\_net@mail.ru

*Tatsiana B. Makarova* – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: t62makarova@mail.ru

*Anna L. Olshanikova* – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: annaolshanikova@mail.ru