

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.93, 635.21, 57.047

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-2-159-168>

Поступила в редакцию 02.02.2021

Received 02.02.2021

А. Н. Гриц¹, Е. Н. Карасева¹, Т. Б. Макарова¹, Е. И. Рыбинская¹, А. Л. Ольшаникова¹,
Т. Г. Янчевская¹, Е. В. Вязов², Т. Г. Курьянчик², С. М. Савина², Н. В. Шалыго²

¹Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА С ИНДУКТОРАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОГЕНАМ НА ИНФИЦИРОВАНИЕ X-ВИРУСОМ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

Аннотация. Изучены содержание активных форм кислорода, активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты – аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы, уровень экспрессии гена маркера гиперчувствительного ответа (*HSR*), содержание частиц X-вируса в рассаде картофеля сорта Уладар, выращенной на ионообменном субстрате в присутствии комплексного препарата, содержащего хитозан, препарат на основе бактерии *Bacillus subtilis* и салициловую кислоту, при заражении X-вирусом. Показано накопление активных форм кислорода, возрастание активности аскорбатпероксидазы, понижение уровня экспрессии гена *HSR* и более низкое содержание частиц X-вируса в растениях картофеля в таких условиях. Зарегистрировано также увеличение количества мини-клубней и сухого вещества в них при выращивании зараженных X-вирусом растений картофеля на ионообменном субстрате в присутствии комплексного препарата.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., картофель, гиперчувствительный ответ, X-вирус картофеля, защитная система, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза, активные формы кислорода, хитозан, *Bacillus subtilis*

Для цитирования: Действие комплексного препарата с индукторами устойчивости к патогенам на инфицирование X-вирусом растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) / А. Н. Гриц [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 2. – С. 159–168. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-2-159-168>

Aleksandr N. Grits¹, Elena N. Karasiova¹, Tatsiana B. Makarova¹, Katsiarina I. Rybinskaya¹, Anna L. Olshankova¹,
Tamara G. Yanchevskaya¹, Yauhen V. Viazau², Tatsiana G. Kuryanchyk², Svetlana M. Savina², Nikolai V. Shalygo²

¹V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF A COMPLEX PREPARATION WITH INDUCERS OF RESISTANCE TO PATHOGENS ON THE INFECTION OF THE POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) PLANTS WITH VIRUS X

Abstract. The content of reactive oxygen species, the activity of key antioxidant enzymes – ascorbate peroxidase and glutathione reductase, the level of expression of the hypersensitive response marker gene (*HSR*) as well as potato virus X particles content in cv. Uladar seedlings grown on an ion-exchange substrate in the presence of a complex preparation containing chitosan, *Bacillus subtilis* bacteria-based preparation and salicylic acid, when infected potato virus X. Accumulation of the reactive oxygen species, increase in ascorbate peroxidase activity, a lower level of *HSR* gene expression and a lower content of virus X particles in potato plants under such conditions are shown. An increase in both the number of potato minitubers and dry matter content in them was also registered when plants were grown on an ion-exchange substrate in the presence of a complex preparation.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., potato, hypersensitive response, potato virus X, defense system, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, reactive oxygen species, chitosan, *Bacillus subtilis*

For citation: Grits A. N., Karasiova E. N., Makarova T. B., Rybinskaya K. I., Olshankova A. L., Yanchevskaya T. G., Viazau Ya. V., Kuryanchyk T. G., Savina S. M., Shalygo N. V. Effect of a complex preparation with inducers of resistance to pathogens on the infection of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plants with virus X. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 2, pp. 159–168 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-2-159-168>

Введение. Эффективные средства защиты на основе индукторов устойчивости и биогенных элиситоров, применяемые в настоящее время при выращивании картофеля, немногочисленны и направлены в основном на защиту от грибковых и бактериальных инфекций. Препараты для защиты растений картофеля от вирусного инфицирования до сих пор не созданы, что вызывает

необходимость совершенствования существующих и разработки новых способов биологической защиты картофеля на стадии первичного семеноводства. Одним из таких способов защиты является применение комплексных препаратов, в состав которых входят непатогенные штаммы микроорганизмов, их метаболиты-элиситоры и экологически безопасные индукторы, совместное действие которых приводит к формированию неспецифического иммунитета в культуре картофеля в условиях как *in vitro*, так и *ex vitro*. Для картофеля хорошо зарекомендовала себя разработанная нами ранее технология с использованием минеральных субстратов, позволяющая не только повысить урожайность, но и снизить пестицидную нагрузку на растения [1, 2].

К числу природных индукторов устойчивости относится группа соединений растительного происхождения, на которые растения реагируют как на сигналы о присутствии в них патогенов. Это фрагменты пектина, кутина, целлюлозы, хитина и других полимеров, высвобождаемых при действии гидролитических ферментов (целлюлаз, кутиназ, хитиназ) патогенов или самого растения [3, 4]. В частности, на основе неспецифических элиситоров микроорганизмов – гиалуроновой кислоты, хитина, хитозана – созданы эффективные препараты, нашедшие практическое применение в защите растений от патогенов [5].

Среди противовирусных препаратов наиболее перспективными для практического применения в семеноводстве картофеля могут быть соединения – индукторы вирусоустойчивости растений, которые действуют на возбудителей через усиление в растениях природных реакций болезнестойчивости, защищающих их на длительное время от возможного заражения вирусами и другими патогенами, в том числе при размножении рассады картофеля для последующего получения мини-клубней [6].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния созданного нами комплексного препарата, содержащего в качестве компонентов хитозан (β -(1-4)-2-амино-2-дезоксид-Д-гликополисахарид) – полианионный биополимер, культуральную жидкость *Bacillus subtilis* 47 и биорегулятор салициловую кислоту, на содержание частиц X-вируса картофеля и урожайность мини-клубней сорта Уладар при выращивании картофеля на искусственном ионообменном субстрате.

Особое внимание было уделено изучению влияния этого препарата на окислительный статус растений и на показатели защитной системы, такие как активность аскорбатпероксидазы (АПР), участвующей в детоксикации пероксида водорода, активность глутатионредуктазы (ГР) – фермента, пополняющего в клетках растений уровень восстановленного глутатиона, и уровень экспрессии гена *HSR*, кодирующего маркер гиперчувствительного ответа растения, в ходе которого происходит запрограммированная гибель клеток вокруг очага поражения, что затрудняет дальнейшее распространение патогена.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлась рассада картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Уладар, которую выращивали под лампами ДНаТ 400 на ионообменном субстрате Триона-М, в который вносили экологически безопасные добавки из салициловой кислоты, биопестицида Карфил (производства ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси») на основе штамма *Bacillus subtilis* 47 и системного элиситора хитозана. Субстрат Триона-М, разработанный в Институте экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, включал цеолит, перлит, катионит Purolite C-100, анионит Tulsion A2ХМП в соотношении 14:1:5:20. Дополнительно в опытных вариантах в субстрат вносили индукторы устойчивости: *Bacillus subtilis* 47 (Карфил) в концентрации 10 мл/л субстрата (с исходной концентрацией $2,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл препарата Карфил), салициловую кислоту (10^{-5} М); хитозан в концентрации 1 г/л (0,1 %) либо 5 г/л (0,5 %) [7]. Совокупность указанных добавок в субстрат условно обозначена нами как «комплексный препарат».

В опытах использовали биотехнический комплекс БТК-1 (рис. 1) с посадочной площадью 2 м², который заполняли многокомпонентным ионообменным субстратом. Высота субстратного слоя на модуле БТК-1 составляла 4 см. Объем субстрата на модуль – 60 л, объем субстрата – 0,5 л, или 250 г на растение, рН субстрата – 6,4.

При определении активности защитной системы использовали специальные квадратные емкости (21×21×10 см), в которых высота субстратного слоя также составляла 4 см, объем субстрата – 0,2 л, или 150 г на растение.



Рис. 1. Регенеранты растений картофеля сорта Уладар, выращиваемые на субстрате Триона-М с добавлением комплексного препарата: слева – двухнедельные регенеранты растений картофеля сорта Уладар; справа – растения в возрасте 40 сут на стадии начала бутонизации

Fig. 1. Regenerants of Uladar potato plants grown on a Triona-M substrate with the addition of the complex preparation: on the left – two-week old regenerants of Uladar potato plants; on the right – 40-day old plants at the beginning of the budding stage

Во всех опытах выравненные по размеру ($7 \pm 0,5$ см) и массе ($0,65 \pm 0,04$ г) черенки меристемных растений одновременно высаживали на установку БТК-1 (120 шт. на модуль) и в квадратные емкости в количестве 9 шт. Опыт проводили в трехкратной повторности.

Источник света – натриевые лампы высокого давления с зеркальными отражателями (ДНаЗ-400) для освещения модулей (посадочной площадью 2 м^2) и без отражателей (ДНаТ-400) для освещения модулей с квадратными емкостями ($21 \times 21 \times 10$ см), излучающие в желто-оранжевой области спектра ($\lambda = 560\text{--}610$ нм) с максимумом излучения $\lambda_{\text{max}} = 594\text{--}600$ нм и высоким КПД (28–30 %) по ФАР. Режим вегетации – фотопериод день/ночь (16/8 ч), влажность субстрата – 60–70 %. Полив растений на ионообменных субстратах осуществляли дистиллированной (на стадии рассады) или отстоявшейся водопроводной водой (на стадии клубнеобразования). Чтобы снизить испарение влаги черенки сверху прикрывали прозрачными крышками. Для исключения влияния интенсивности световых потоков емкости с растениями периодически меняли местами.

В качестве контроля выступали растения, выращиваемые в тех же условиях на субстрате Триона, но без добавления комплексного препарата.

Заражение X-вирусом картофеля (ХВК) проводили путем микроинъекции в верхушечную часть 30-дневных растений с одновременным натиранием растений картофеля клеточным соком ХВК-доноров при помощи мелкозернистой наждачной бумаги. Для иммуноферментного анализа (ИФА) отбирали пробы листьев 4-го листового яруса на 30-е сутки (непосредственно перед инфицированием) и на 20-е сутки (50 сут с начала посадки растений в субстрат) после заражения ХВК. Урожайность анализировали через 3 мес. после полного завершения вегетационного периода. Пробы листьев растений для изучения содержания АФК, активности антиоксидантных ферментов – АПР и ГР, а также экспрессии гена маркера гиперчувствительного ответа (*HSR*) отбирали на 20-е сутки (за 10 сут до заражения) и на стадии бутонизации на 50-е сутки (спустя 20 сут после заражения ХВК) [8–10].

Общее содержание АФК в экстрактах растений картофеля определяли, регистрируя с помощью зонда (2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата, способного окисляться в присутствии АФК до флуоресцирующего продукта дихлорфлуоресцеина) флуоресценцию дихлорфлуоресцеина ($\lambda_{\text{воз}} = 496$ нм, $\lambda_{\text{набл}} = 524$ нм) [11].

Активность АПР определяли, используя реакцию восстановления аскорбата пероксидом водорода. Кинетику потребления аскорбата регистрировали в течение 20 с при 290 нм на спектрофотометре Uvikon 931. Активность фермента рассчитывали по коэффициенту экстинкции $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [12]. Общую активность ГР определяли по методу, описанному в работе [13]. Активность ГР рассчитывали, применяя коэффициент экстинкции $\epsilon = 6,22 \text{ мкМ}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [8]. Содержание общего белка определяли по методу Бредфорда [14].

Для определения уровня экспрессии гена маркера гиперчувствительного ответа *HSR* из листьев картофеля выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzol G™ (AppliChem, Германия). Количество выделенной РНК определяли по поглощению при 260 нм на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США). Степень чистоты полученных образцов оценивали по соотношению A_{260}/A_{280} (данный показатель должен быть больше 1,7) [15]. Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез кДНК проводили с помощью ProtoScript II Reverse Transcriptase (BioLabs, США) в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США). Полученную кДНК хранили в морозильной камере при $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ [15]. При подборе 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. Дизайн праймеров для гена *HSR* осуществляли самостоятельно (нуклеотидная последовательность этих праймеров опубликована нами в работе [10]). Нуклеотидная последовательность для праймеров гена-нормализатора *EF* (кодирует фактор элонгации 1α), используемого при количественных расчетах уровня экспрессии изучаемых генов, была взята из работы [16]. 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×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 – $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 мин; плавление – $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 с; отжиг – $55\text{--}60 \text{ }^\circ\text{C}$, 45 с. Количество циклов амплификации – 40–50. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Bio-Rad CFX Maestro. Уровень экспрессии генов определяли в единицах относительно экспрессии гена-нормализатора *EF*.

ИФА для определения содержания частиц ХВК проводили самостоятельно согласно протоколу фирмы – производителя наборов ИФА [17], а также в лаборатории иммунодиагностики РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству».

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программы Excel 2010 (Microsoft, США) и SigmaPlot 12.5 (SYSTAT Software).

Результаты и их обсуждение. В листьях контрольных растений картофеля, выращенных только на субстрате, не инфицированных или инфицированных ХВК (варианты «Триона» и «Триона ХВК»), а также в листьях опытных растений, выращенных на субстрате с добавлением комплексного препарата, не зараженных или зараженных ХВК (варианты «Триона + добавки», «Триона + добавки ХВК»), на стадии бутанизации определяли общее содержание АФК (рис. 2), активность АПР и ГР (рис. 3), а также уровень экспрессии гена *HSR* (рис. 4). Установлено достоверное повышение (на 25 %) количества АФК только в листьях картофеля в опытном варианте «Триона + добавки ХВК» по сравнению с контролем «Триона ХВК» (см. рис. 2).

Анализ активности АПР и ГР (рис. 3) показал, что в вариантах с применением комплексного препарата активность АПР была выше как в зараженных, так и в незараженных растениях. При этом отличия между опытными вариантами были незначительными. По активности ГР наблюдалась схожая закономерность.

С помощью метода ПЦР-РВ были получены данные об уровне экспрессии гена *HSR*, кодирующего белок-маркер гиперчувствительного ответа.

Выявлено повышение уровня экспрессии гена *HSR* (в 3 раза) в листьях контрольных растений, выращенных в субстрате без добавления комплексного препарата и зараженных ХВК по сравнению с таковым у неинфицированных в таких условиях растений, и незначительное

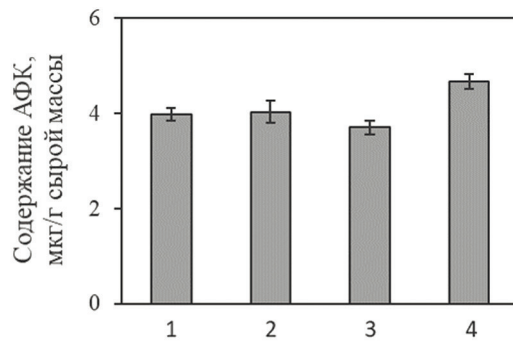


Рис. 2. Общий уровень АФК в листьях растений картофеля на стадии бутонизации. Здесь и на рис. 3, 4: 1 – растения, выращенные на субстрате Триона-М; 2 – растения, выращенные на субстрате Триона-М с добавлением 10 мл/л субстрата препарата на основе *Bacillus subtilis*, 10^{-5} М салициловой кислоты и 1 г/л хитозана; 3 – растения, зараженные X-вирусом картофеля; 4 – растения, выращенные на субстрате Триона-М с добавлением 10 мл/л субстрата препарата на основе *Bacillus subtilis*, 10^{-5} М салициловой кислоты и 1 г/л хитозана и зараженные X-вирусом картофеля; * – достоверные отличия от контроля ($p \leq 0,05$)

Fig. 2. Total reactive oxygen species content in leaves of potato plants at the stage of budding. Here and in Fig. 3, 4: 1 – plants grown on the Triona-M substrate; 2 – plants grown on a Triona-M substrate with the addition of 10 ml/l of a preparation based on *Bacillus subtilis*, 10^{-5} M of salicylic acid and 1 g/l of chitosan; 3 – plants infected with potato virus X; 4 – plants grown on a Triona-M substrate with the addition of 10 ml/l of a preparation based on *Bacillus subtilis*, 10^{-5} M of salicylic acid and 1 g/l of chitosan, infected with potato virus X; * – significant difference from control ($p \leq 0.05$)

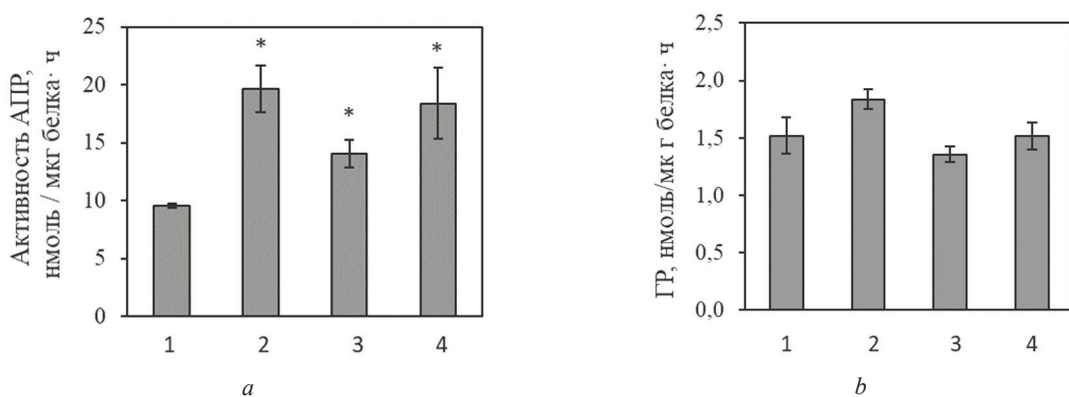
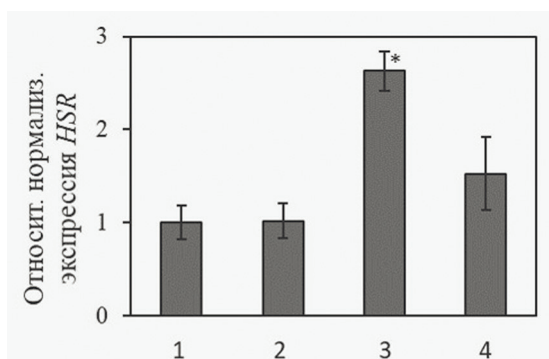


Рис. 3. Активность АПР (a) и ГР (b) в листьях растений картофеля на стадии бутонизации

Fig. 3. Activities of ascorbate peroxidase (a) and glutathione reductase (b) in leaves of potato plants at the stage of budding

повышение данного показателя (в 1,6 раза) в листьях зараженных растений, выращенных в субстрате с добавлением препарата (рис. 4). При этом экспрессия гена *HSR* в варианте «Триона ХВК» была в 1,7 раза выше, чем в варианте «Триона + добавки ХВК».

Таким образом, использование комплексного препарата приводит к усилению генерации АФК при заражении растений ХВК. При этом регистрируется увеличение активности АПР и ГР относительно контроля (чистый субстрат Триона-М) как при заражении вирусом, так и без него. По-видимому, увеличение содержания АФК под действием комплексного препарата способствует активации защитной системы и, как следствие, успешному формированию устойчивости к патогенным микроорганизмам. Так, при использовании препарата наблюдается лишь незначительное повышение уровня экспрессии гена маркера гиперчувствительного ответа при заражении ХВК, в то время как для растений, выращенных на чистом субстрате, экспрессия *HSR*, наоборот, в 3 раза выше исходной. Последнее, в совокупности с представленными ниже данными по урожайности и содержанию вирусного материала в листьях растений, свидетельствует об успешной активации защитных механизмов по подавлению вирусной инфекции, что обусловило отсутствие индукции гиперчувствительного ответа спустя 20 сут после заражения ХВК.

Рис. 4. Экспрессия гена *HSR* в листьях растений картофеля на стадии бутонизацииFig. 4. Expression of *HSR* gene in leaves of potato plants at the stage of budding

Важнейшими параметрами при исследовании влияния комплексного препарата являются урожайность мини-клубней, а также общая структура урожая, определяемая такими показателями, как средняя масса и доля сухого вещества в изучаемом растительном материале картофеля сорта Уладар.

Следует отметить, что полный цикл вегетации длился около 3 мес., после чего производился подсчет урожайности полученных мини-клубней. Данные по урожайности (см. таблицу) демонстрируют эффективность действия комплексного препарата в составе ионообменного субстрата Триона-М. Наблюдается увеличение количества мини-клубней, их средней массы в присутствии индуцирующих устойчивость добавок и содержания сухого вещества (см. таблицу).

В настоящее время активно изучаются различные функциональные композиции элиситоров и индукторов устойчивости, совместное действие которых способно обеспечить комплексный эффект, включая индукцию механизмов защиты, стимуляцию роста и развития растения, ускорение формирования различных культурно-значимых признаков [18]. Показано, что низкомолекулярный хитозан в комплексе с салициловой кислотой проявляет как лечебное, так и защитное (иммунизирующее) действие против Y-вируса картофеля [19]. Была предложена новая концепция создания препаратов на основе хитозана [18] с использованием его и как полианионной полимерной матрицы для сорбции различных соединений, и как индуктора неспецифической устойчивости в сочетании с сигнальными молекулами болезнестойчивости иного, чем у хитозана, механизма действия.

Структура урожая картофеля сорта Уладар

Yield structure of potato cv. Uladar

Вариант	Средняя масса клубня, г	Относительное содержание сухого вещества в клубнях, %
Контроль, зараженный ХВК	13,6 ± 3,1	18,7 ± 0,4
Контроль, не зараженный ХВК	16,0 ± 4,6	19,5 ± 0,6
Добавки + ХВК	22,9 ± 3,5	22,4 ± 0,2
Добавки без инфицирования ХВК	21,6 ± 4,5	23,5 ± 0,8

Повышение биологической эффективности препаратов в данном случае достигается за счет включения в их состав хитозана с широким диапазоном молекулярных масс, при этом возможны подбор соотношения олигомеров и полимеров хитозана с низкой и высокой молекулярной массой, наиболее эффективного для каждой системы патоген–хозяин, подбор соответствующей органической физиологически активной кислоты (салициловой, кремниевой, арахидоновой, глутаминовой, янтарной), введение в состав микробиологически активных добавок, улучшение препаративных форм и совершенствование методов использования. Координированная индукция целого комплекса защитных реакций происходит при сочетании хитозана с биологически активными веществами, гормонами роста и микробиологическими препаратами. Так, повышение

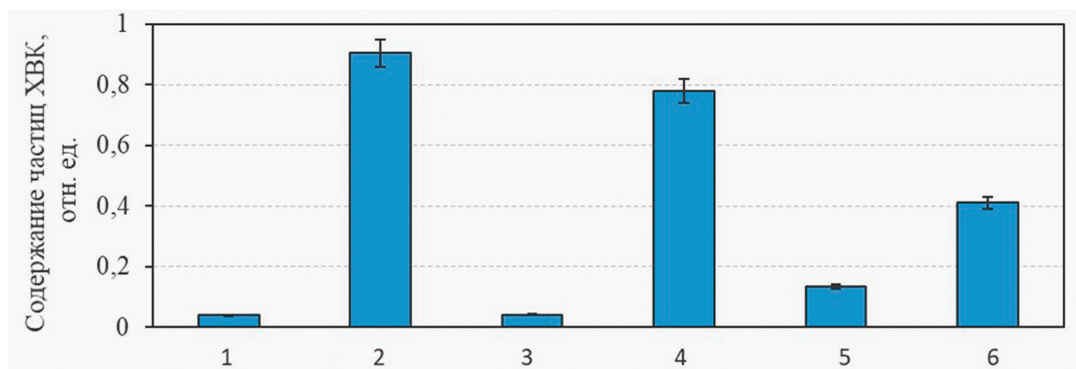


Рис. 5. Содержание частиц X-вирусов в 50-дневных регенерантах картофеля сорта Уладар на ионообменном субстрате Триона-М в присутствии индукторов устойчивости: салициловой кислоты (10^{-5} М), хитозана (1 и 5 г/л), препарата на основе *Bacillus subtilis* 47 (10 мл/л субстрата) на фоне вирусного инфицирования ХВК: 1 – контроль, ионообменный субстрат Триона-М; 2 – растения, инфицированные ХВК на субстрате Триона-М; 3 – растения с добавлением комплексного препарата (СК 10^{-5} М, хитозан 1 г/л субстрата (0,1 %), *Bacillus subtilis* 47 (10 мл $2,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл); 4 – растения с добавлением комплексного препарата (0,1 % по хитозану), инфицированные ХВК; 5 – растения с добавлением комплексного препарата (СК 10^{-5} М, хитозан 5 г/л субстрата (0,5 %), *Bacillus subtilis* 47 (10 мл $2,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл); 6 – растения с добавлением комплексного препарата (0,5 % по хитозану), инфицированные ХВК)

Fig. 5. Potato virus X particles content in 30-day regenerants of cv. Uladar potato plants in the Triona ion-exchange substrate in the presence of resistance inducers: salicylic acid (10^{-5} M), chitosan (1 and 5 g/l), preparation based on *Bacillus subtilis* 47 (10 ml/l) during viral infection with potato virus X: 1 – control, ion-exchange substrate Triona-M; 2 – plants infected with potato virus X on the Triona-M substrate; 3 – plants grown with the addition of a complex preparation (salicylic acid 10^{-5} M, chitosan 1 g/l substrate (0.1 %), *Bacillus subtilis* 47 (10 ml $2.5 \cdot 10^9$ CFU/ml); 4 – plants with the addition of a complex preparation (with 0.1 % chitosan) infected with potato virus X; 5 – plants grown with the addition of a complex preparation (salicylic acid 10^{-5} M, chitosan 1 g/l substrate (0.1 %), *Bacillus subtilis* 47 (10 ml $2.5 \cdot 10^9$ CFU/ml); 6 – plants grown with the addition of a complex preparation (0.5 % chitosan) infected with potato virus X)

биологической эффективности хитозана против фитотфоры и Y-вируса на картофеле достигнуто в результате включения в состав арахидоновой и салициловой кислот [19]. Схожий подход был применен и нами при создании комплексной защитной добавки в ионообменный субстрат, состоящей из коммерческого препарата хитозана, содержащего смесь олигомеров и полимеров с низкой и высокой молекулярной массой, микробиологического препарата на основе *Bacillus subtilis* и салициловой кислоты.

В ходе дальнейшей работы методом ИФА показано изменение содержания частиц ХВК при включении в ионообменный субстрат Триона-М смеси элиситорных добавок (комплексный препарат: хитозан, салициловая кислота и микробиологический препарат на основе *Bacillus subtilis*), отличающихся между собой содержанием хитозана, т. е. в каждом опытном варианте помимо хитозана присутствовали также салициловая кислота и препарат на основе *Bacillus subtilis* в указанных выше концентрациях. Стоит отметить, что, согласно протоколу производителя наборов для ИФА, значения $ОП_{492} = 0,1$ или немного больше, как в пробе «Триона + 5 г хитозана», не свидетельствуют об инфицировании. Подобное увеличение ($ОП_{492} = 0,133$) обусловлено погрешностью фоновой реакции конъюгата. Показано, что эффективность антивирусного действия вносимых добавок коррелирует с количеством присутствующего в их составе хитозана (рис. 5). Комплексный препарат с содержанием 0,1 % хитозана в субстрате вызывает 15–20 % ингибирования ХВК в растениях картофеля, в то время как препарат с 0,5 % хитозана – порядка 60 % ингибирования вирусной инфекции. Применение более высоких концентраций хитозана в постановочных опытах не приводило к снижению содержания ХВК. Полученные данные согласуются с результатами других авторов [20].

Заключение. Показано, что в растениях картофеля, выращиваемых на ионообменном субстрате в присутствии комплексного препарата, содержащего хитозан, препарат на основе бактерий *Bacillus subtilis* и салициловой кислоты, при заражении ХВК происходит накопление АФК, увеличение активности антиоксидантных ферментов – АПР и ГР. При заражении вирусом

в контрольных растениях, выращиваемых только на субстрате, наблюдается трехкратное повышение уровня экспрессии генов гиперчувствительности *HSR*, в то время как в растениях, выращиваемых на субстрате с добавлением комплексного препарата, уровень экспрессии генов *HSR* при заражении ХВК возрастает только в 1,5 раза. В таких растениях регистрируется более низкое количество ХВК, повышенное количество мини-клубней и более высокое содержание сухого вещества в них. Полученные результаты указывают на эффективность использования этого комплексного препарата в качестве индуктора устойчивости растений картофеля к ХВК, а также в качестве стимулятора их роста и развития. Использование препарата позволит не только сохранить высокую урожайность растений в условиях инфицирования ХВК, но и повысить ее благодаря стимулирующему действию входящих в него компонентов.

Благодарности. Работа финансирована в рамках Государственной программы Республики Беларусь «Наукоемкие 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. 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>
2. Поликсенова, В. 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.
3. 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>
4. 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>
5. Горбатов, В. С. Экологическая оценка пестицидов / В. С. Горбатов, Ю. М. Матвеев, Т. В. Кононова // Агро XXI. – 2008. – № 1–3. – С. 7–9.
6. Yanchevskaya, T. G. Physiological and biochemical optimization of mineral nutrition of plants / T. G. Yanchevskaya. – Saarbrücken : Lambert [in Russian], 2018.
7. Влияние фракций препарата Антивайрус на изменение содержания X-, Y-вирусов в растениях картофеля белорусской селекции *in vitro* / Т. Г. Янчевская [и др.] // Ботаника (исследования) : сб. науч. тр. – Минск, 2016. – № 45. – С. 376–385.
8. Влияние экзогенной жасмоновой кислоты на функционирование защитной системы рассады картофеля (*Solanum tuberosum* L.) при выращивании на искусственном ионообменном субстрате и заражении X-вирусом картофеля / Е. В. Вязов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 391–401.
9. Влияние элиситоров бактериального происхождения на функционирование защитной системы рассады картофеля (*Solanum tuberosum* L.), зараженной X-вирусом / Е. В. Вязов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 135–143.
10. Влияние хитозана на окислительный статус, ферменты окислительного метаболизма и инфицирование X-вирусом растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) на искусственных ионообменных субстратах *in vivo* / Т. Г. Янчевская [и др.] // Физиология растений и генетика. – 2019. – Т. 51, № 2. – С. 147–160.
11. Kozel, N. V. Barley leaf antioxidant system under photooxidative stress induced by Rose Bengal / N. V. Kozel, N. V. Shalygo // Rus. J. Plant Physiol. – 2009. – Vol. 56. – P. 316–332. <https://doi.org/10.1134/S1021443709030030>
12. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone / M. Sanmartin [et al.] // Planta. – 2003. – Vol. 216. – P. 918–928. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0944-9>
13. Mittler, R. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate dependent reduction of nitroblue tetrazolium / R. Mittler, B. A. Zilinskas // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 212, N 2. – P. 540–546. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1366>
14. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation 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/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
15. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе : метод. указания / И. Н. Доманская [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2011. – 31 с.
16. 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.
17. Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля / Рос. с.-х. акад. НПО по картофелеводству. – М. : Коренево, 2011. – 8 с.

18. Тютерев, С. Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам / С. Л. Тютерев // Вестн. защиты растений. – 2015. – Т. 1, № 83. – С. 3–13.
19. Евстигнеева, Т. А. Действие фитоактивного хитозана и салициловой кислоты на устойчивость растений картофеля к вирусу / Т. А. Евстигнеева, Н. А. Павлова, С. Л. Тютерев // Вестн. защиты растений. – 2012. – № 2. – С. 27–33.
20. Тютерев, С. Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням / С. Л. Тютерев. – СПб. : Всерос. НИИ защиты растений, 2014. – 212 с.

References

1. 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>
2. Poliksenova V. D. Induced plant resistance to pathogens and abiotic stress factors (for example, 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).
3. 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>
4. 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>
5. Gorbatov V. S., Matveev Yu. M., Kononova T. V. Environmental assessment of pesticides. *Agro XXI* [Agro XXI], 2008, no. 1–3, pp. 7–9 (in Russian).
6. Yanchevskaya T. G. *Physiological and biochemical optimization of mineral nutrition of plants*. Saarbrücken, Lambert [in Russian], 2018.
7. Yanchevskaya T. G., Grits A. N., Makarova T. B., Oleshuk E. N., Romanovskaya T. V. Influence of fractions of the Antivirys preparation on the change in the content of X-, Y-viruses in potato plants of Belarusian breeding *in vitro*. *Botanika (issledovaniya): sbornik nauchnykh trudov* [Botany (research): collection of scientific papers]. Minsk, 2016, no. 45, pp. 376–385 (in Russian).
8. Vyazov E. V., Kalyaga T. G., Filipchik E. A., Safonova O. Yu., Shalygo N. V., Grits A. N. [et al.] Influence of exogenous jasmonic acid on the functioning of a defense system of potato seedlings (*Solanum tuberosum* L.) grown on artificial ion exchange substrate and infected with X-virus of potato. *Vesti Natsyyanal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 391–401 (in Russian).
9. Vyazov E. V., Kalyaga T. G., Filipchik E. A., Safonova O. Yu., Grits A. N., Karaseva E. N., Makarova T. B., Ol'shanikova 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. *Vesti Natsyyanal'noi 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).
10. Yanchevskaya T. G., Shalygo N. V., Ol'shanikova A. L., Grits A. N., Makarova T. B., Oleshuk E. N., Karaseva E. N., Rybinskaya E. I., Filipchik E. A., Kalyaga T. G. Influence of chitosan on oxidative status, enzymes of oxidative metabolism and X-viral infection of potato plants (*Solanum tuberosum* L.) on artificial ion exchange substrates *in vivo*. *Fiziologiya rastenii i genetika* [Plant physiology and genetics], 2019, vol. 51, no. 2, pp. 147–160 (in Russian).
11. Kozel N. V., Shalygo N. V. Barley leaf antioxidant system under photooxidative stress induced by Rose Bengal. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2009, vol. 56, pp. 316–322. <https://doi.org/10.1134/S1021443709030030>
12. Sanmartin M., Drogoudi P. D., Lyons T., Pateraki I., Barnes J., Kanellis A. K. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*, 2003, vol. 216, pp. 918–928. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0944-9>
13. Mittler R., Zilinskas B. A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 1993, vol. 212, no. 2, pp. 540–546. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1366>
14. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation 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/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
15. Domanskaya I. N., Radyuk M. S., Budakova E. A., Samovich T. V., Spivak E. A., Shalygo N. V. *Technology of DNA typing of genes of barley resistance to drought*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2011. 31 p. (in Russian).
16. Pasalari Kh., 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).
17. *Instructions for using the enzyme immunoassay diagnostic kit for the determination of potato viruses*. Moscow, Korenevo, 2011. 8 p. (in Russian).
18. Tyuterev S. L. Environmentally friendly inducers of plant resistance to diseases and physiological stress. *Vestnik zashchity rastenii* [Plant protection bulletin], 2015, vol. 1 (83), pp. 3–13 (in Russian).
19. Evstigneeva T. A., Pavlova N. A., Tyuterev S. L. The effect of phytoactive chitosan and salicylic acid on the resistance of potato plants to the virus U. *Vestnik zashchity rastenii* [Plant protection bulletin], 2012, no. 2, pp. 27–33 (in Russian).
20. Tyuterev S. L. *Natural and synthetic inducers of plant resistance to diseases*. St. Petersburg, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 2014. 212 p. (in Russian).

Информация об авторах

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

Рыбинская Екатерина Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kate.rybinskaya@gmail.com

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

Янчевская Тамара Георгиевна – канд. биол. наук. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: t_yanch@mail.ru

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: yauhen.viazau@gmail.com

Курьянчик 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

Савина Светлана Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: svetlanapavluchkova@yandex.ru

Шальго Николай Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai_shalygo@yahoo.com

Information about the authors

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

Katsiarina I. Rybinskaya – Junior 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: kate.rybinskaya@gmail.com

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

Tamara G. Yanchevskaya – Ph. D. (Biol.). 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: t_yanch@mail.ru

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: yauhen.viazau@gmail.com

Tatsiana G. Kuryanchyk – 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

Svetlana M. Savina – 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: svetlanapavluchkova@yandex.ru

Nikolai V. Shalygo – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.). Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai_shalygo@yahoo.com