

Влияние нанокompозитов хитозана и бактерий *Bacillus subtilis* на про/- антиоксидантную систему и устойчивость растений картофеля к инфицированию *Phytophthora infestans* и недостатку почвенной влаги

**Черепанова Е. А.^{А*}, Яруллина Л. Г.^А, Сорокань А. В.^А,
Заикина Е. А.^А, Бурханова Г. Ф.^А, Цветков В. О.^Б, Марданшин И. С.^Б,
Фаткуллин И. Я.^А, Пустовая А. Д.^Б, Калацкая Ж. Н.^Г.**

^А Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, 450054 Россия. *E-mail: k_cherepanova@mail.ru

^Б Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия.

^В Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства УФИЦ
РАН, Уфа, 450059 Россия.

^Г Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск

Картофель является одной из основных продовольственных культур в мире. Однако растения одновременно или последовательно подвергаются различным абиотическим и биотическим стрессам, которые снижают урожайность и качество картофеля. Картофель является одной из наиболее чувствительных культур к недостатку влаги. Компоненты про- и антиоксидантной системы растений могут отражать адаптационную способность растений и служить маркерами устойчивости в условиях стресса. Помочь растениям преодолеть стрессовые воздействия помогают препараты, обладающие антистрессовым и иммуномодулирующим действиями.

В настоящее время первостепенной задачей растениеводства является уменьшение экологической нагрузки на среду обитания и разработка новых биопрепаратов для профилактики заболеваний и защиты растений от патогенов и абиотических стрессов. Хитин, хитозан и их олигомеры считаются активными элиситорами иммунитета растений. Преимуществами этих полисахаридов являются биосовместимость, нетоксичность и широкий спектр физиолого-биохимической активности. Использование бактерий, стимулирующих рост растений, также является одним из экологически чистых подходов к достижению устойчивого сельского хозяйства. Показано, что хитозан может быть использован для повышения биологической активности микробиологических препаратов на основе штаммов рода *Bacillus* (Amine et al., 2021). Однако существуют также трудности, связанные с включением хитозана в бактериальные питательные среды, поскольку он может подавлять рост бактериальной культуры из-за своей антимикробной активности, а также зависимости эффективности биопрепаратов от различных факторов окружающей среды. Введение но-

вых функциональных групп и заместителей, например, низкомолекулярных оксикоричных кислот (Варламов и др., 2020) позволяет создавать соединения на основе хитозана с улучшенными свойствами: антиоксидантными, антимикробными и др.

Механизмы влияния на растения получаемых в настоящее время конъюгатов на основе хитозана и оксикоричных кислот, а также нано- и субмикронных частиц на их основе только начинают изучаться. Следует отметить, что экспериментальные данные об иммуномодулирующем потенциале нано- и субмикронных частиц оксикоричных кислот в виде конъюгата с хитозаном, а также их взаимодействия с агрономически полезными микроорганизмами практически отсутствуют. Таким образом, значительный интерес представляет поиск и выяснение физиологических и молекулярных механизмов защитного и иммуностимулирующего действия новых нано- и субмикронных частиц на основе производных хитозана в комплексе с биологическими агентами на растения картофеля и повышение их устойчивости к возбудителям болезней и абиотическим стрессам.

В связи с этим целью нашей работы являлось изучение влияния обработки клубней картофеля сорта Удача наноккомпозитами хитозана с феруловой и кофейной кислотами, а также бактерий *Bacillus subtilis* 26Д и их сочетанием с наноккомпозитами хитозана на рост растений, устойчивость к инфицированию возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans*, компоненты про/антиоксидантной системы и их урожайность в нормальных условиях и при недостатке влаги в почве.

Методы. Для исследования были отобраны клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача башкирской селекции, полученных в Башкирском НИИСХ УФИЦ РАН (г. Уфа) – по 15 клубней на вариант опыта. Бактерии *B. subtilis* штамм 26Д и споры *Ph. infestans* были взяты из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия). Конъюгаты хитозана с феруловой кислотой (Хит-ФК) были получены в Институте новых материалов НАН Беларуси.

Клубни опрыскивали растворами конъюгатов хитозана с феруловой кислотой (Хит-ФК), суспензией бактерий *B. subtilis* 26Д, конъюгатами Хит-ФК с бактериями 26Д. Контролем служили клубни, которые опрыскивали дистиллированной водой. Клубни сажали в открытый грунт, для создания нормальных условий выращивания влажность грунта поддерживали на уровне $75 \pm 5\%$ наименьшей влагоёмкости почвы, для имитации засухи с момента появления всходов влажность грунта поддерживали на уровне $55 \pm 5\%$.

Исследование устойчивости растений, выросших в открытом грунте, было проведено через 45 дней после их посадки методом искусственного инфицирования изолированных листьев. Для этого листья картофеля с двух верхних ярусов размещали в пластиковых кюветах, где создавались условия влажной камеры, затем инфицировали суспензией спор *Ph. infestans* 1840. На 10 сутки после инфицирования листья фотографировали и результаты обрабатывали в программе ImageJ.

В течение вегетации измеряли длину стеблей картофеля. В фазу бутонизации растений картофеля отбирали растительный материал для анализа концентрации белков, активности пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы, концентрации перекиси водорода в листьях. Пероксидазную и каталазную активности в супернатанте гомогената растительного материала определяли микрометодом (Veselova et al., 2019) при длине волны 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Концентрацию H_2O_2 при 560 нм по методу (Bindschedler et al., 2006) и оптическую плотность продукта реакции измеряли на люминесцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США) при 560 нм. Активность супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1.) измеряли методом (Bonnet et al., 2000) на люминесцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США) при 540 нм.

Содержание пролина в листьях картофеля определяли согласно (Yarullina et al., 2021) и продукт реакции измеряли на люминесцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США) при 522 нм.

По окончании вегетации анализировали урожайность картофеля по количеству клубней, их среднему весу и термогравиметрическим методом определяли количество сухого вещества в клубнях.

Результаты. По результатам измерения длины стеблей картофеля было обнаружено, что в условиях нормальной влажности грунта наибольший ростстимулирующий эффект оказывали обработки *B.subtilis* 26Д + Хит-КК и *B.subtilis* 26Д + Хит-ФК, которые давали прибавку длины стеблей на 55% и 61% соответственно, по отношению к контрольным растениям. В условиях недостатка влаги в почве меньше всего замедлялся рост растений, обработанных Хит-ФК, он составил 98% от контроля, росшего в условиях нормальной влажности почвы, а у обработанных Хит-КК он даже был чуть больше, чем у контрольных растений, росших в условиях оптимальной влажности, и составил 107%. У обработанных *B.subtilis* 26Д + Хит-КК и *B.subtilis* 26Д рост стеблей был больше, чем у контроля, росшего в тех же условиях, но меньше, чем у контроля, росшего в условиях нормальной влажности почвы.

Искусственное инфицирование изолированных листьев (рис. 1) выявило, что площадь развития симптомов фитофтороза на листьях контрольных растений, растущих в условиях оптимальной увлажнённости почвы, достигала 80%, а у предобработанных конъюгатом хитозана с кофейной кислотой (Хит-КК) - чуть более 50%. Обработка конъюгатом хитозана с феруловой кислотой (Хит-ФК), как в отдельности, так и в смеси с *B. subtilis* 26Д, снижала степень поражения листьев картофеля до 20%. Сочетание *B. subtilis* 26Д совместно с Хит-КК было менее эффективным, и в этом случае симптомы фитофтороза в среднем развивались на 30% площади листьев, изолированных с растений, не испытывающих недостатка почвенной влаги.

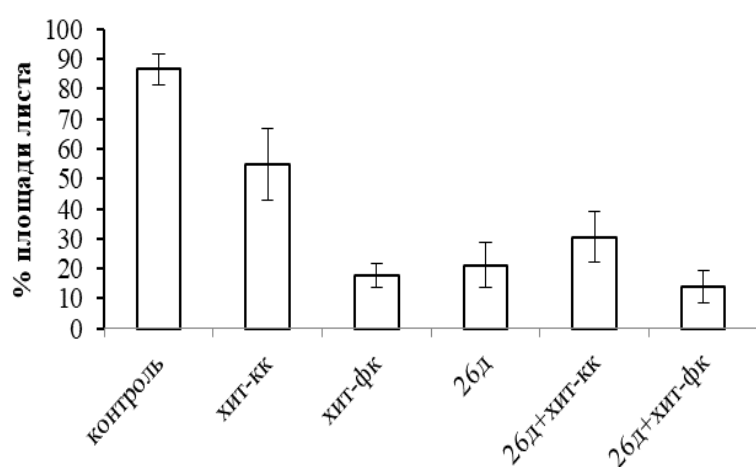


Рис. 1. Симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля Удача, обработанных биопрепаратами в полевых условиях при нормальной влажности почвы, через 10 суток после искусственного инфицирования *P. infestans*

Следует отметить, что на листьях, изолированных с растений, растущих при недостатке почвенной влаги (рис. 2), развитие симптомов заболевания фитофторозом замедлялось. В этом случае на листьях контрольных растений площадь симптомов составляла только 60% от всей листовой пластинки. При обработке конъюгатом Хит-КК площадь поражения листовой пластины составляла 35%, при обработке Хит-ФК - 20%, а в случае смесей конъюгатов Хит-КК и Хит-ФК с *B. subtilis* – около 15 % площади листовой пластинки.

Известно, что накопление пролина говорит об уровне стрессоустойчивости растений. В нашем опыте максимальное накопление пролина наблюдалось в образце *B. subtilis* +Хит-ФК в условиях недостатка влаги, что говорит о том, что данная обработка повышает иммунный статус растения. В остальных изученных образцах уровень пролина незначительно отличался от значений в контрольных растениях.

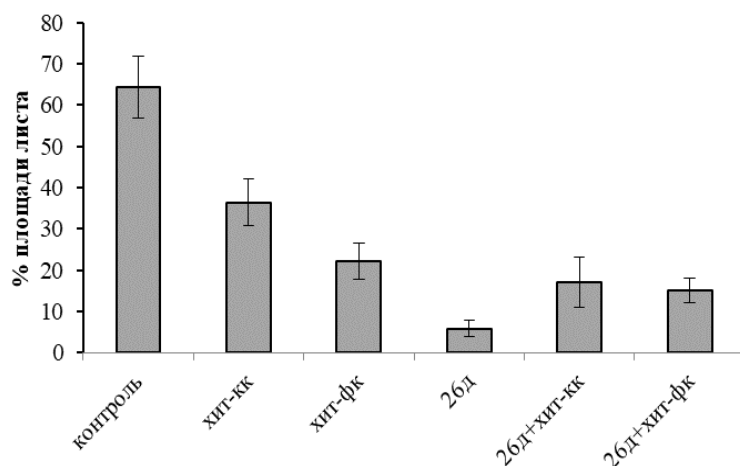


Рис. 2. Симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля Удача, обработанных биопрепаратами в полевых условиях при недостатке влаги в почве, через 10 суток после искусственного инфицирования *P. infestans*

При недостатке влаги в почве, обработанные Хит - КК растения картофеля отличались наибольшей активностью пероксидазы по сравнению с другими вариантами обработок. Каталазная активность при этом значительно повышалась в растениях, обработанных конъюгатами Хит-ФК. Обработка бактериями *B. subtilis* 26Д максимально стимулировала активность супероксиддисмутазы, что способствовало повышению концентрации перекиси водорода в растительных тканях. Растения, обработанные композитами Хит-КК или Хит-ФК совместно с *B. subtilis* в условиях почвенной засухи отличались значительным повышением активности каталазы по сравнению с другими вариантами, что, вероятно, способствовало подавлению развития окислительного стресса в растениях.

Анализ изоферментных спектров пероксидазы у растений, выращенных при недостатке влаги в почве, показал, что при обработке растений Хит-КК увеличивается активность анионной изопероксидазы картофеля при значительном снижении активности катионных изоформ. В обработанных Хит-ФК растениях активность всех изоформ пероксидазы была значительно ниже, чем в других вариантах обработки и в контроле. Ранее нами было замечено, что важное место в ответных реакциях картофеля на инфицирование возбудителем фитофтороза занимают катионные изопероксидазы, обладающие сродством к клеточным стенкам оомицета *Ph. infestans* (Максимов и др., 2011). Вероятно, защитное действие на растения картофеля к инфицированию *Ph. infestans* под воздействием *B. subtilis* 26Д в сочетании нанокompозитами хитозана связано со стимулирующим действием на активность катионных изоформ пероксидазы.

Такие параметры урожайности картофеля, как число клубней в гнезде и средний вес одного клубня наибольшими в условиях нормальной влажности были у растений, предобработанных композитами Хит-КК или Хит-ФК совместно с *B. subtilis* 26Д. Интересно отметить, что, как и в случае

длины стеблей, лучше всего абиотическому стрессу в виде почвенной засухи сопротивлялись предобработанные Хит-КК и Хит-ФК растения. Количество сухого вещества в клубнях было наибольшим у предобработанных Хит-КК + *B. subtilis* 26Д растений, росших в условиях нормальной влажности почвы, и у растений, предобработанных Хит-КК без добавления бактерий, росших в засушливых условиях.

Таким образом, обработка растений конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами, особенно при их сочетании с бактериями приводила к активации компонентов про-антиоксидантной системы (перекиси водорода, супероксиддисмутаза, каталазы, пероксидазы), а также увеличивала количество пролина, что повышает устойчивость растений к стрессам. Применение композитов хитозана с кофейной или феруловой кислотами в засушливом климате более благоприятно сказывается на адаптации растений к почвенной засухе, а добавление к этим препаратам *B. subtilis* 26Д оказывает положительное влияние на рост и урожайность картофеля, выращиваемого в условиях нормальной влажности почвы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-16-00139.

Библиографические ссылки

1. Amine R., Tarek C., Hassane E., Noureddine E.H., Khadija O. Chemical Properties of Biopolymers (Chitin/Chitosan) and Their Synergic Effects with Endophytic Bacillus Species: Unlimited Applications in Agriculture. *Molecules*. 2021. V. 26. P. 1117
2. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*. 2020. Т.60. С. 317–368
3. Veselova, S.V.; Burkhanova, G.F.; Rumyantsev, S.D.; Blagova, D.K.; Maksimov, I.V. Strains of Bacillus spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019, 55, 41–47
4. Bindschedler, L.V.; Dewdney, J.; Blee, K.A. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *Plant J.* 2006, 47, 851–863
5. Bonnet M., Camares O., Veisseire P. // *J. Experimental Botany*. – 2000. – V. 51. – P. 945–953
6. Yarullina, L.G.; Burkhanova, G.F.; Cherepanova, E.A.; Sorokan, A.V.; Zaikina, E.A.; Tsvetkov, V.O.; Mardanshin, I.S.; Kalatskaya, J.N.; Balyuk, N.V. Effect of Bacillus subtilis and signaling molecules on the state of the pro/antioxidant system and the expression of protective protein genes in potato plants upon phytophthora and a moisture deficit. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2021, 57(6), 760-769.
7. Максимов И. В., Сорокань А. В., Черепанова Е. А., Сурина О. Б., Трошина Н. Б., Яруллина Л. Г. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про-/антиоксидантной системы в растениях картофеля при фитофторозе // *Физиология растений*. – 2011. – Т. 58. – №. 2. – С. 243 – 251.