

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*Beta vulgaris* L.), ЗАРАЖЕННЫХ ГРИБОМ *Alternaria alternata*, НА ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ *Bacillus subtilis*

О.В. ЛАСТОЧКИНА^{1, 2}, Л.И. ПУСЕНКОВА¹, Р.А. ЮЛДАШЕВ^{1, 2},
Е.Ю. ИЛЬЯСОВА¹, S. ALINIAEIFARD³

Болезни листьев, вызванные патогенными грибами рода *Alternaria*, значительно снижают качество и продуктивность корнеплодов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). К перспективным агентам биоконтроля болезней растений относятся биопрепараты на основе бактерий *Bacillus subtilis* в связи с их способностью стимулировать рост и активировать иммунитет растений к биотическим стрессорам. К началу исследования мы не располагали сведениями о влиянии *B. subtilis* на физиологические характеристики растений сахарной свеклы, пораженных альтернариозом. Нами впервые представлены данные, которые свидетельствуют, что такие биопрепараты препятствуют снижению фотосинтеза, индуцированному возбудителем альтернариоза, и инициируют защитные реакции у растений сахарной свеклы, включая синтез ингибиторов гидролитических ферментов и при этом уменьшая количество пролина. Высокую эффективность проявил испытанный впервые новый штамм *B. subtilis* 10-4, выделенный из почв в Республике Башкортостан. Цель работы заключалась в оценке влияния биопрепаратов фитоспорин-М, витаплан и штамма *B. subtilis* 10-4 на физиолого-биохимические показатели и продуктивность сахарной свеклы сорта Кампаи при заражении *Alternaria alternata*. В опытах использовали биопрепараты фитоспорин-М (*B. subtilis* 26D, НВП «БашИнком», г. Уфа), витаплан (*B. subtilis* 2604D + *B. subtilis* 2605D, ЗАО «Агробиотехнология», Россия) и *B. subtilis* 10-4 (Башкирский НИИ сельского хозяйства). Растения опрыскивали суспензиями биопрепаратов 2-кратно: в фазу 2-3 пар и 4-6 пар настоящих листьев. Полевые опыты проводили в Предуральской степной зоне Республики Башкортостан (ООО «Чишмы агроинвест») в 2013 году. Всходы были искусственно заражены нанесением на листья по 100 мкл суспензии гриба *A. alternata* (10⁶ КОЕ/мл). Оценивали содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а, b и каротиноидов) в листьях, площадь листовой поверхности, активность гидролаз и их ингибиторов, образование пролина и сахара в листьях, а также накопление сахарозы в корнеплодах и их продуктивность. Впервые показано, что 2-кратное внесение фитоспорина-М, витаплана и штамма *B. subtilis* 10-4 стимулировало синтез фотосинтетических пигментов в здоровых растениях (в 1,2-1,9 раза) и препятствовало снижению фотосинтетической активности в зараженных *A. alternata* (в 1,2-1,5 раза), что проявилось в увеличении площади листовой поверхности (до 30 %) и массы листьев (в 1,8-2,9 раза) в сравнении с контролем. Инфицирование *A. alternata* повышало активность гидролаз (протеиназ, амилаз) и снижало активность их ингибиторов, что свидетельствует об интенсивном развитии патогена в тканях листьев и уменьшении сопротивляемости растений к действию ферментов патогена. Обработка исследуемыми биопрепаратами снижала активность гидролаз и увеличивала активность их ингибиторов как в зараженных, так и в здоровых листьях, что указывает на индукцию у растений защитных реакций против *A. alternata*. Интересно, что максимальную активацию защитных белков вызывало применение штамма *B. subtilis* 10-4 и фитоспорина-М. О защитном действии биопрепаратов также свидетельствует снижение индуцированного возбудителем альтернариоза накопления пролина и сахара — маркеров формирования устойчивости растений в экстремальных ситуациях. В здоровых растениях под влиянием биопрепаратов также наблюдалось незначительное повышение количества пролина и сахара, что подтверждает важную роль этих компонентов в формировании индуцированной устойчивости к возбудителю альтернариоза. Интегральными показателями положительного эффекта фитоспорина-М, витаплана и штамма *B. subtilis* 10-4 на растения, а также снижения повреждающего действия *A. alternata* служат данные о формировании более крупных корнеплодов с повышенной сахаристостью по сравнению с контрольными необработанными растениями, причем максимальные значения этих показателей наблюдались при применении фитоспорина-М и штамма *B. subtilis* 10-4.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, фотосинтетические пигменты, гидролазы, сахар, пролин, сахароза, *Alternaria alternata*, устойчивость, продуктивность, *Beta vulgaris* L., сахарная свекла.

Болезни листьев, вызванные патогенными грибами рода *Alternaria*, значительно снижают продуктивность и качество растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) — одной из наиболее важных сахароносных культур, которая служит источником сырья для сахарной, пищевой, кондитерской,

спиртовой промышленности, производства биоэтанола, удобрений, кормов для животных (1). У пораженных растений развивается альтернариоз, для которого характерно образование пятнистостей на поверхности листьев (2). Нарушаются физиологические функции, изменяются анатомо-морфологические показатели, снижается продуктивность, отмирают отдельные части растений, происходит их полная гибель (3). Преждевременные потери ассимиляционной площади листового аппарата, вызванные альтернариозом, приводят к утрате пластических веществ корней, затраченных на новообразование листьев, замедляется нарастание массы корнеплодов, в них снижается содержание сахарозы (2).

Преимущества использования для оздоровления растений биологических препаратов в сравнении с химическими средствами защиты заключаются в экологической безопасности и системном иммуномодулирующем действии (3, 4). К перспективным агентам биоконтроля и активаторам иммунитета растений относятся микробные препараты на основе бактерий *Bacillus subtilis*, обладающих антагонизмом к патогенным микроорганизмам и положительно влияющих на продуктивность культур (4-6). Ростостимулирующий и протекторный эффекты этих препаратов показаны на многих видах растений (7-9) и в отношении различных стрессовых факторов биотической и абиотической природы (10-12). Считается, что такое действие обусловлено способностью *B. subtilis* продуцировать биологически активные вещества (инсектицидные и антимикробные компоненты, фитогормоны, сидерофоры и хелаторы) (13-15), снижать содержание этилена в растениях, улучшать фиксацию азота, усвояемость макро- и микроэлементов (16), запускать механизмы системной устойчивости растений в ответ на стрессы (17) посредством активации салицилат- и жасмонат-зависимых сигнальных путей (18-20).

Важную роль в индукции устойчивости растений к патогенам играют гидролитические ферменты (амилазы, пектиназы, протеазы) и их ингибиторы (21-23). На модельных растениях картофеля и сахарной свеклы показано, что внесение биопрепаратов на основе *B. subtilis* способствует активации синтеза ингибиторов протеаз и защищает растения от проникновения и развития патогенных микроорганизмов (6). О развитии защитных реакций растений к стрессам разной природы можно также судить по степени накопления в них пролина и сахаров, служащих маркерами формирования устойчивости в экстремальных ситуациях (24-26). В то же время, несмотря на значительный объем экспериментальных данных, последовательность развития защитных механизмов, индуцируемых *B. subtilis*, до конца не ясна. Начиная свои исследования, мы не располагали сведениями о влиянии *B. subtilis* на фотосинтетическую активность листьев сахарной свеклы как интегральную характеристику физиологического состояния всего растения и о характере изменений в содержании пролина и сахаров в листьях в условиях заражения возбудителями альтернариоза.

В результате проведенных исследований мы впервые выявили, что внесение биологических препаратов на основе *Bacillus subtilis* препятствует снижению фотосинтетической активности листового аппарата сахарной свеклы, индуцированному возбудителем альтернариоза, и инициирует защитные реакции, включающие активацию ингибиторов гидролитических ферментов, повышение содержания пролина и сахаров. Это снижает повреждающее действие патогенного гриба *A. alternata* на растения сахарной свеклы и способствует формированию более крупных корнеплодов.

Цель работы заключалась в оценке влияния биопрепаратов фитоспорин-М, витаплан и штамма *Bacillus subtilis* 10-4 на физиолого-биохи-

мические показатели и продуктивность сахарной свеклы при заражении *Alternaria alternata*.

Методика. Исследования выполняли на растениях сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. сорта Кампай (ООО «АгроСем-Инвест», г. Краснодар). В опытах использовали биопрепараты фитоспорин-М (*B. subtilis* 26D, НВП «БашИнком», г. Уфа) (П, 30 г/10 л), витаплан (*B. subtilis* 2604D + *B. subtilis* 2605D, ЗАО «Агробιοтехнология», Россия) (СП, 20 г/га) и новый штамм *B. subtilis* 10-4, выделенный в Башкирском НИИ сельского хозяйства (10^5 КОЕ/мл) (8). Растения опрыскивали суспензиями биопрепаратов 2-кратно — в фазу 2-3 пар и 4-6 пар настоящих листьев. Расход рабочей жидкости составлял 300 л/га.

Полевые опыты проводили в Предуральской степной зоне Республики Башкортостан (ООО «Чишмы агроинвест») в 2013 году на мелких делянках (5 м²). Почва на опытном поле — чернозем выщелоченный (рН 5,25), Нг — 5,50 мг-экв/100 г почвы, содержание гумуса — 8,69 %, калия и фосфора — соответственно 29,0 и 23,0 мг/100 г. Сахарную свеклу высаживали в сроки, общепринятые для региона, появление всходов отмечали на 12-14-е сут. Всходы искусственно заражали, нанося на листья по 100 мкл суспензии гриба *A. alternata* (10^6 КОЕ/мл). Степень развития болезни оценивали визуально в течение вегетации по 5-балльной шкале: 0 баллов — отсутствие симптомов, 1 балл — поражение от 1 до 25 % площади листа, 2 балла — от 26 до 50 %, 3 балла — от 51 до 75 %, 4 балла — более 75 %.

В течение вегетации трижды (фазы 4-6 пар настоящих листьев, смыкания листьев в рядах, технической спелости) отбирали контрольные (необработанные, здоровые) и опытные (обработанные биопрепаратами и зараженные *A. alternata*) целые растения или отдельно корнеплоды и побеги для оценки физиолого-биохимических показателей.

Содержание хлорофиллов а и b определяли согласно S.W. Jefferey с соавт. (27). Образцы листьев взвешивали, измельчали, перетирали в ступке с добавлением углекислого кальция и 90 % ацетона (из расчета 0,05 г листьев на 10 мл ацетона), полученный экстракт фильтровали. Оптическую плотность растворов экстрагированных пигментов измеряли при $\lambda = 436$ нм и $\lambda = 680$ нм на спектрофотометре UV-2401PC («Shimadzu», Япония). Концентрацию каротиноидов в суммарной вытяжке пигментов вычисляли по формуле P. Wettstein (28).

Образование пролина в листьях оценивали по методике L.S. Bates с соавт. (29) в модификации Л.Г. Калинкиной (30). Для этого брали по 2 г исследуемого материала и заливали 2,5 мл кипящей дистиллированной воды. Пробирки доводили до кипения в водяной бане и охлаждали. Затем пробирки с 2 мл холодной пробы, 2 мл нингидринового реактива, 2 мл ледяной уксусной кислоты помещали в водяную баню, кипятили 1 ч и охлаждали. Интенсивность окрашивания комплекса пролина с нингидрином определяли при $\lambda = 522$ нм на спектрофотометре СФ-26 («ЛОМО», Россия). Содержание пролина устанавливали по калибровочной кривой, используя стандартные растворы химически чистого L-пролина («Sigma Aldrich», США).

Ферментативную активность протеиназ, амилаз и их ингибиторов определяли спектрофотометрическим методом (21, 31), накопление сахара в листьях — фотометрическим методом с применением 2,4-динитрофенола по ГОСТ Р 51636-2000, количество сахарозы в корнеплодах — методом холодного водного дигерирования с использованием поляриметра П161-М (Россия) (32). Площадь поверхности листьев измеряли с помощью фотопланиметра, массу надземной части растений и массу корнеплодов — ве-

совым методом (33).

Все опыты проводили в 3-4 биологических и 4-5 аналитических повторах. Статистическую обработку выполняли с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0 («StatSoft, Inc.», США). На рисунках и в таблицах представлены средние значения (M) и их стандартные отклонения ($\pm SD$) при $P = 0,95$.

Результаты. Альтернариоз поражает листовую поверхность растений, образуя пятнистости, и приводит к уменьшению фотосинтетической поверхности листьев (2). Фотосинтез — главный процесс при формировании продуктивности растений, от его интенсивности зависит общая биологическая урожайность культур (34). В свою очередь, содержание основных фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а, b и каротиноидов) служит одним из косвенных индексов фотосинтетической активности и важнейшим биохимическим показателем растения, определяющим интенсивность фотосинтеза (24, 34). В наших опытах инфицирование сахарной свеклы *A. alternata* приводило к снижению в листьях содержания хлорофилла а (до 1,5-кратного) и b (до 1,2-кратного) по сравнению со здоровыми растениями (рис. 1), что свидетельствует о нарушении процесса фотосинтеза и уменьшении фотосинтетической деятельности растений.

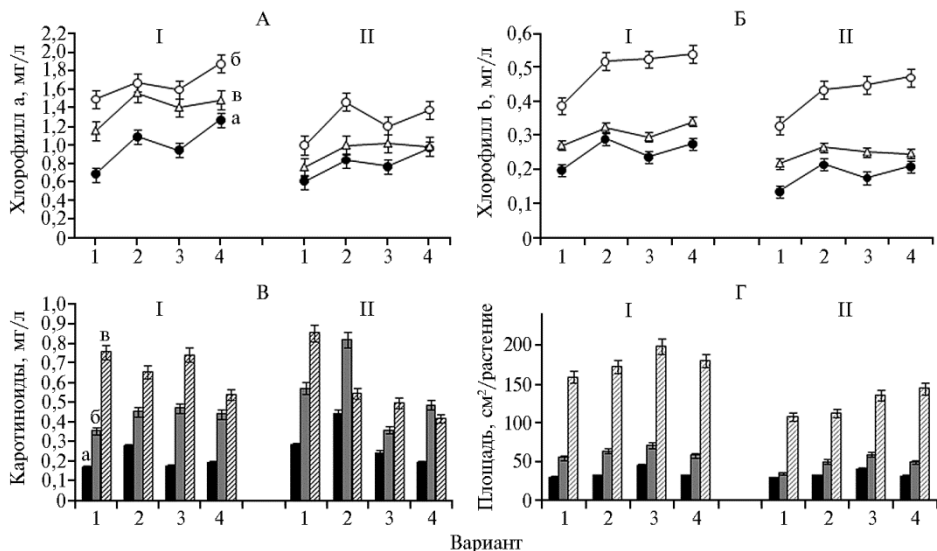


Рис. 1. Содержание хлорофилла а (А), хлорофилла b (Б), каротиноидов (В) и площадь листовой пластинки (Г) у здоровых (I) и инфицированных *Alternaria alternata* (II) растений сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. сорта Кампай при использовании биопрепаратов: 1 — контроль, 2 — фитоспорин-М, 3 — витаплан, 4 — штамм *Bacillus subtilis* 10-4; а — первая обработка, б — вторая обработка, в — уборка урожая (ООО «Чишмы агроинвест», Республика Башкортостан, 2013 год).

Инокуляция штаммом *B. subtilis* 10-4 и обработка биопрепаратами фитоспорин-М и витаплан восстанавливала фотосинтетическую деятельность растений. Так, 2-кратная обработка биопрепаратами предотвращала индуцированное стрессом снижение содержания хлорофиллов а и b во всех вариантах опыта (см. рис. 1, А, Б). Содержание каротиноидов в листьях при заражении *A. alternata* увеличивалось (см. рис. 1, В). Обработка витапланом и штаммом *B. subtilis* 10-4 способствовала снижению их количества, тогда как после двух обработок фитоспорином-М наблюдалось значительное накопление каротиноидов, превышавшее контрольные значения. Однако к уборке содержание каротиноидов снижалось и было сопоставимо с таковым в вариантах, в которых применялись витаплан и

штамму 10-4 (см. рис. 1, В). Следует отметить, что в незараженных растениях 2-кратная обработка биопрепаратами хоть и приводила к незначительному повышению количества каротиноидов, но к уборке этот показатель был ниже, чем в контрольном варианте (см. рис. 1, В).

Внесение биопрепаратов в нормальных условиях произрастания стимулировало фотосинтетическую деятельность растений, вероятно, за счет увеличения содержания физиологически активного хлорофилла а. Действительно, результаты, полученные при оценке площади поверхности листьев (см. рис. 1, Г), коррелировали с данными о влиянии исследуемых препаратов на содержание хлорофиллов а и b. Растения, обработанные препаратами, во всех вариантах в течение всего вегетационного периода характеризовались значительно большей площадью листовой пластинки как в норме, так при заражении *A. alternata* (см. рис. 1, Г).

Очевидно, что выявленное увеличение содержания фотосинтетических пигментов при использовании биопрепаратов в условиях инфицирования *A. alternata* (см. рис. 1, А, Б, В), помимо их непосредственной роли в процессе фотосинтеза и увеличении размеров листьев (см. рис. 1, Г), может вносить вклад в развитие защитных реакций растений (34). В частности, каротиноиды выполняют фотопротекторную и антиоксидантную функции (35-38), предотвращая повреждение, вызываемые образованием синглетного кислорода и триплетного хлорофилла (37). К тому же они могут принимать энергию возбуждения триплетного хлорофилла, а затем рассеивать ее в виде тепла или гасить молекулы синглетного кислорода (38, 39). Однако следует отметить, что, несмотря на очевидную роль каротиноидов в антиоксидантной защите растений, данные об изменении их содержания при действии стрессовых воздействий весьма противоречивы (22, 24, 36). Подобные эффекты могут объясняться, с одной стороны, индукцией образования каротиноидов под действием стресс-фактора, с другой — его усиленной деградацией при сильном стрессе (22).

Вместе с тем при формировании защитных реакций растений к патогенам значительную роль играют гидролитические ферменты (протеазы, амилазы) и их ингибиторы (21). При инфицировании *A. alternata* происходило повышение активности протеиназ и амилаз (рис. 2, Б, Г) в листьях сахарной свеклы, что свидетельствует об интенсивном развитии патогена в тканях растений. Вероятно, этот процесс был обусловлен изменениями метаболизма растения-хозяина под воздействием патогена, а также секрецией самим патогеном гидролитических ферментов, способных мацерировать ткани и разрушать компоненты клеточной стенки, что позволяет патогену преодолевать естественную резистентность растения-хозяина. Растения, обработанные штаммом *B. subtilis* 10-4, фитоспорином-М и витапланом характеризовались снижением активности гидролаз как в зараженных, так и в здоровых листьях (см. рис. 2, А-Г), причем наибольшее снижение гидролитической активности наблюдалось в вариантах с использованием препарата фитоспорин-М и штамма *B. subtilis* 10-4.

Значимый вклад в регуляцию активности гидролитических ферментов вносят белковые ингибиторы растения, подавляющие активность собственных и чужеродных ферментов, в частности патогенных грибов и бактерий (23, 40). В ответ на инфицирование *A. alternata* в листьях сахарной свеклы активность ингибиторов гидролаз снижалась (см. рис. 2, Е, З), вследствие чего, вероятно, уменьшалась сопротивляемость растений к действию ферментов патогена и его распространению в тканях. Обработка исследуемыми препаратами, напротив, способствовала увеличению активности ингибиторов гидролаз (см. рис. 2, Е, З), что указывает на индуциро-

вание у растений под их влиянием защитных реакций против *A. alternata*. Следует отметить, что максимальную активацию защитных белков вызвало применение штамма *B. subtilis* 10-4 и фитоспорина-М.

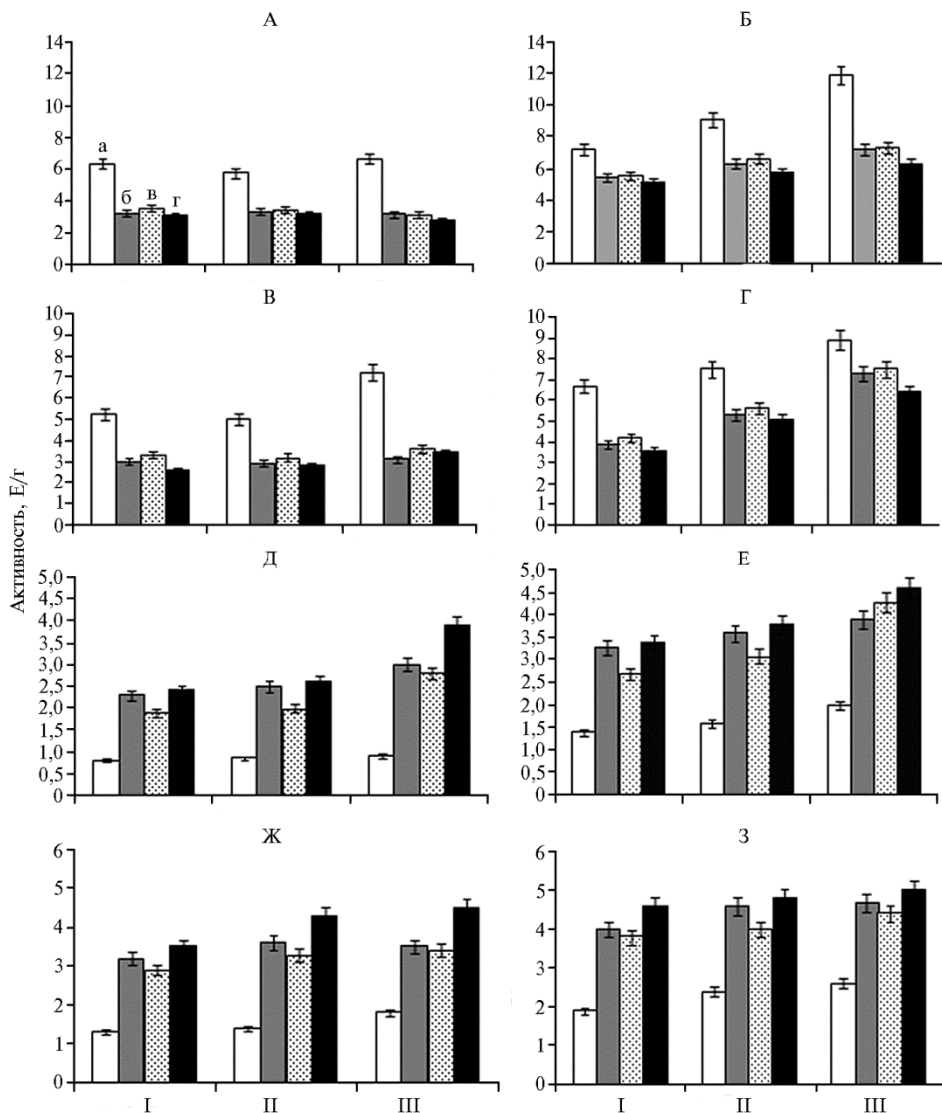


Рис. 2. Активность протеиназ (А, Б), амилаз (В, Г), ингибиторов протеиназ (Д, Е) и ингибиторов амилаз (Ж, З) в листьях у здоровых (А, В, Д, Ж) и инфицированных *Alternaria alternata* (Б, Г, Е, З) растений сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. сорта Кампай при использовании биопрепаратов: а — контроль, б — фитоспорин-М, в — витаплан, г — штамм *Bacillus subtilis* 10-4; I — первая обработка, II — вторая обработка, III — уборка урожая (ООО «Чишмы агроинвест», Республика Башкортостан, 2013 год).

Важными биохимическими маркерами формирования устойчивости могут выступать накопление в растительной массе сахара и пролина (31). Здоровые растения *B. vulgaris* постепенно накапливали сахар в листьях в течение всей вегетации (рис. 3, А), что было вполне характерно и согласовывалось с имеющимися в литературе данными (41). Наибольшую скорость накопления сахара наблюдали на первоначальных этапах роста, когда растение энергично формировало листья и корни, и замедлялась к концу образования третьей пары настоящих листьев. По-видимому, это было связано с тем, что в фазу смыкания рядков пророст листьев замедлял-

ся, происходило интенсивное утолщение и формирование корнеплодов, сопровождавшееся продолжением накопления сахаров в них.

Инфицирование *A. alternata* приводило к резкому повышению содержания сахара в листьях по сравнению с показателями у контрольных здоровых растений, что, по-видимому, выполняет протекторную роль и позволяет растениям продолжать рост в стрессовых условиях (см. рис. 3, Б). Этому могут способствовать свойства моносахаридов, связанные с повышением стабильности биомембран, антиденатурационным воздействием на белки и антиоксидантным эффектом (42). Кроме того, накапливающиеся углеводы помогают поддерживать осмотический статус клеток (33).

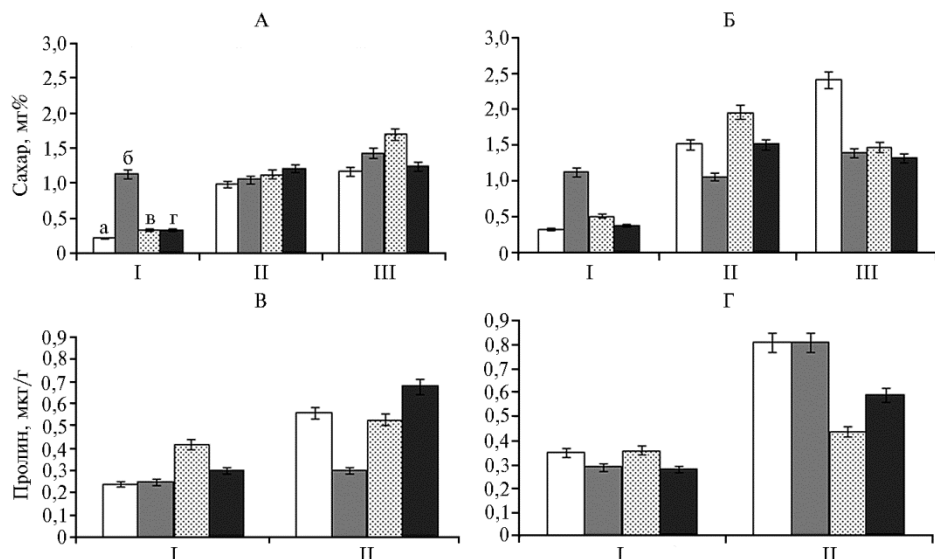


Рис. 3. Содержание сахара (А, Б) и пролина (В, Г) в листьях у здоровых (А, В) и инфицированных *Alternaria alternata* (Б, Г) растений сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. сорта Кампай при использовании биопрепаратов: а — контроль, б — фитоспорин-М, в — витаплан, г — штамм *Bacillus subtilis* 10-4; I — первая обработка, II — вторая обработка, III — уборка урожая (ООО «Чисмы агроинвест», Республика Башкортостан, 2013 год).

Один из наиболее многофункциональных стрессовых метаболитов растений — аминокислота пролин, выполняющая роль не только осмолита и антиоксиданта (24, 43), но и низкомолекулярного шаперона (40), участвующего в поддержании нативной структуры ферментов (24). Во многих исследованиях сообщалось о повышении содержания пролина в растениях в ответ на воздействие стрессов различной природы и о его значении как фактора, важного для выживания растений в экстремальных ситуациях (24-26). Однако данных об изменениях содержания пролина в растениях сахарной свеклы в условиях инфицирования *A. alternata* и использования препаратов на основе *B. subtilis* мы в доступной литературе не обнаружили.

Инфицирование сахарной свеклы *A. alternata* приводило к значительному повышению содержания в растениях пролина (см. рис. 3, Г). В то же время обработка фитоспорином-М, витапланом и штаммом *B. subtilis* 10-4 способствовала предотвращению его накопления, индуцированного стрессом (см. рис. 3, Г). Следует отметить, что под влиянием биопрепаратов в здоровых растениях также наблюдалось незначительное повышение количества пролина, что дополнительно указывает на важную роль этого агента в формировании индуцированной устойчивости к возбудителю альтернариоза (см. рис. 3, В).

Совокупным показателем характера физиолого-биохимических про-

цессов за весь период вегетации могут служить данные о внешнем состоянии растений и продуктивности корнеплодов. В нашем опыте искусственное заражение растений грибом *A. alternata* приводило к постепенному увеличению площади пораженной альтернариозом листовой поверхности. Так, к уборке урожая ее доля достигала 75 % и более (4 балла), в то время как у растений, обработанных штаммом *B. subtilis* 10-4, фитоспорином-М, витапланом, она не превышала 35 % (2 балла). Наилучший эффект отмечали в вариантах с использованием штамма *B. subtilis* 10-4 и биопрепарата фитоспорина-М. В этих случаях степень развития болезни не превышала соответственно 25 и 30 %. Вместе с тем 2-кратная обработка биопрепаратами приводила к достоверному увеличению средней массы надземной части здоровых растений в 1,8–2,7 раза и средней массы корнеплодов — в 1,6–2,3 раза в зависимости от варианта опыта (таб.). Обработка биопрепаратами предотвращала стресс-индуцированное снижение показателей продуктивности корнеплодов в условиях заражения *A. alternata* и способствовало сохранению роста массы листьев и корнеплодов, сопоставимого с таковым у здоровых растений.

Накопление массы листьев и корнеплодов у растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) сорта Кампай под влиянием микробных препаратов на основе *Bacillus subtilis* в норме и при инфицировании *Alternaria alternata*

Вариант	Масса наземной части, г			Масса корнеплодов, г		
	I обработка	II обработка	уборка урожая	I обработка	II обработка	уборка урожая
Здоровые						
Контроль	4,45±0,19	14,67±0,77	165,20±2,65	0,52±0,09	4,33±0,30	550,80±10,41
Фитоспорин-М	6,11±0,30	27,96±0,82	304,80±2,32	0,92±0,19	10,42±0,48	971,00±11,89
Витаплан	7,75±0,51	14,25±0,46	425,40±3,01	1,17±0,28	4,94±0,12	970,60±13,03
<i>Bacillus subtilis</i> 10-4	11,00±0,42	36,70±0,91	336,40±4,69	1,80±0,12	14,12±0,22	1142,40±12,62
Зараженные						
<i>A. alternata</i>	6,86±0,22	14,14±1,13	71,20±1,78	1,32±0,09	3,37±0,21	276,30±4,11
Фитоспорин-М	8,84±0,14	15,61±0,91	182,00±1,99	1,81±0,12	7,11±0,29	463,00±5,33
Витаплан	4,68±0,49	11,84±0,70	127,40±2,06	0,64±0,11	3,98±0,15	502,20±5,09
<i>Bacillus subtilis</i> 10-4	11,21±0,30	25,70±1,42	209,40±2,57	2,72±0,23	11,66±0,23	607,20±4,95

Помимо положительного влияния на интенсивность ростовых процессов и накопление биомассы, 2-кратное внесение биопрепаратов обеспечило получение корнеплодов с более высоким содержанием сахарозы в сравнении с контролем и у здоровых, и у зараженных растений. Так, к моменту уборки урожая в контрольном варианте корнеплоды содержали 16,1 % сахарозы, в опытных вариантах — от 17,9 до 19,0 %. Максимальное количество сахарозы было зафиксировано в вариантах с 2-кратной обработкой посевов фитоспорином-М и штаммом *B. subtilis* 10-4. В условиях заражения *A. alternata* корнеплоды растений, обработанных препаратами, во всех вариантах характеризовались повышенным содержанием сахарозы в сравнении с необработанными.

Таким образом, препараты фитоспорин-М, витаплан и штамм *Bacillus subtilis* 10-4 способствуют усилению синтеза фотосинтетических пигментов (хлорофилла а, b и каротиноидов), увеличению активности ингибиторов гидролаз в листьях и снижению стресс-индуцированного накопления пролина и сахара, оказывая защитный эффект в условиях заражения растений сахарной свеклы грибом *Alternaria alternata*. При обработке микробными препаратами на основе *B. subtilis* как у здоровых растений, так и в случае заражения *A. alternata* повышалась масса корнеплодов и содержание в них сахарозы. Наиболее эффективными оказались варианты с 2-кратным применением фитоспорина-М и штамма *B. subtilis* 10-4, в которых негативное влияние фитопатогенного гриба *A. alternata* на растения

максимально нивелировалось и были получены корнеплоды с наибольшей массой и содержанием сахарозы.

¹Башкирский НИИ сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского ФИЦ РАН, 450059 Россия, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19, e-mail: oksanaibg@gmail.com ☒; Поступила в редакцию 9 февраля 2018 года

²Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского ФИЦ РАН, 450054 Россия, г. Уфа, пр. Октября, 71, лит. 1Е, e-mail: yuldashevra@gmail.com;

³University of Tehran, Aburaihan campus, PC 3391653775 Pakdasht, Tehran, Iran, e-mail: aliniaiefard@ut.ac.ir

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 3, pp. 958-968

EFFECT OF *Bacillus subtilis* BASED MICROBIALS ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF SUGAR BEET (*Beta vulgaris* L.) PLANTS INFECTED WITH *Alternaria alternata*

O.V. Lastochkina^{1, 2}, L.I. Pusenkova¹, R.A. Yuldashev^{1, 2}, E.Yu. Ilyasova¹, S. Aliniaiefard³

¹Bashkir Research Institute of Agriculture, Subdivision of the Ufa Federal Research Centre RAS, Federal Agency for Scientific Organizations, 19, ul. Riharda Zorge, Ufa, 450059 Russia, e-mail oksanaibg@gmail.com (☒ corresponding author);

²Institute of Biochemistry and Genetics, Subdivision of the Ufa Federal Research Centre RAS, Federal Agency for Scientific Organizations, 71, prosp. Oktyabrya, Ufa, 450054 Russia, e-mail yuldashevra@gmail.com;

³University of Tehran, Aburaihan campus, PC 3391653775 Pakdasht, Tehran, Iran, e-mail aliniaiefard@ut.ac.ir
ORCID:

Lastochkina O.V. orcid.org/0000-0003-3398-1493

Pusenkova L.I. orcid.org/0000-0001-6341-0486

Yuldashev R.A. orcid.org/0000-0001-9033-6867

Ilyasova E.Y. orcid.org/0000-0001-5737-5469

Aliniaiefard S. orcid.org/0000-0001-9572-2839

The authors declare no conflict of interests

Received February 9, 2018

doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.958eng

Abstract

Phytopathogenic *Alternaria* fungi are economically important causative agents of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaf diseases which significantly reduce root yield and quality. Promising agents for plant disease biocontrol are *Bacillus subtilis* based biologicals due to the ability to stimulate plant growth and immunity to many biotic stressors. Starting our experiments, we could not find publications on *B. subtilis* effects towards physiological parameters of sugar beet plants affected by *Alternaria*. This paper is the first to report that *B. subtilis*-based biologicals including novel Bashkirian isolate *B. subtilis* 10-4 prevent a decrease in leaf photosynthetic activity in sugar beet plants affected by *A. alternata*, activate hydrolytic enzyme inhibitors, suppress proline production, and increase sugar content in roots. Our objective was to estimate effects of Fitosporin-M, Vitaplan, and endophytic strain *B. subtilis* 10-4 on leaf photosynthetic pigments (chlorophyll a, b and carotenoids), leaf area index, activity of hydrolases (proteases and amylases) and their inhibitors, as well as proline and sugar levels in leaves, root level of sucrose, and productivity in healthy plants as compared to those artificially infected with *A. alternata*. Our results show that Vitaplan, Fitosporin-M and strain *B. subtilis* 10-4 when used twice increase the concentrations of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b and carotenoids) 1.2-1.9-fold in healthy plants whereas a decrease in photosynthetic activity in *A. alternata*-infected plants is 1.2-1.5 times lower, the leaf area is 30 % higher and leaf weight increases 1.8-2.9 times compared to the untreated plants. *A. alternata* infection increased the activity of hydrolases (protease, amylase) and suppressed their inhibitors, which indicates the intensive development of the pathogen and a decrease in plant resistance to enzymes produced by pathogen during plant tissue colonization. On contrary, biologicals suppress hydrolases and increase activity of their inhibitors both in infected and healthy leaves, which points out to the induction of protective reactions against *A. alternata* in plants. Interestingly, *B. subtilis* 10-4 and Fitosporin-M ensure the maximum activation of protective proteins. Furthermore, biologicals decrease stress-induced accumulation of proline and sugar, the markers of plant resistance to extremal factors in plants, which is in line with protective effect as well. Also, proline and sugar levels slightly elevated in healthy plants treated with the biologicals, which accentuate the role of these substances in induced resistance to *A. alternata*. Ultimately, larger roots with higher sucrose content confirm the positive effect of the used biologicals among which Fitosporin-M and strain *B. subtilis* 10-4 provide the maximum effect.

Keywords: *Bacillus subtilis*, photosynthetic pigments, hydrolases, sugar, proline, sucrose, *Al-*

REFERENCES

1. Shamilev R.V., Shamilev S.R. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2011, 6: 1-7 (in Russ.).
2. Stognienko O.I., Selivanova G.A. *Bolezni sakharnoi svekly, ikh vozбудiteli* [Diseases and pathogens of sugar beet plants]. Voronezh, 2008 (in Russ.).
3. Zavalin A.A. *Biopreparaty, udobreniya i urozhai* [Biologicals, fertilizers and crop yield]. Moscow, 2005 (in Russ.).
4. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2009, 84(1): 11-18 (doi: 10.1007/s00253-009-2092-7).
5. Perez-Garcia A., Romero D., de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotech.*, 2011, 22: 187-193 (doi: 10.1016/j.copbio.2010.12.003).
6. Pusenkova L.I., Il'yasova E.Yu., Maksimov I.V., Lastochkina O.V. Enhancement of adaptive capacity of sugar beet crops by microbial biopreparations under biotic and abiotic stresses. *Agricultural Biology*, 2015, 50(1): 115-123 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.1.115eng).
7. Esitken A., Yildiz H.E., Ercisli S., Donmez M.F., Turan M., Gunes A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 2010, 124: 62-66 (doi: 10.1016/j.scienta.2009.12.012).
8. Lastochkina O., Pusenkova L., Yuldashev R., Babaev M., Garipova S., Blagova D., Khairullin R., Aliniaiefard S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. *Plant Physiol. Bioch.*, 2017, 121: 80-88 (doi: 10.1016/j.plaphy.2017.10.020).
9. Turan M., Ekinci M., Yildirim E., Güneş A., Karagöz K., Kotan R., Dursun A. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turk. J. Agric. For.*, 2014, 38: 327-333 (doi: 10.3906/tar-1308-62).
10. Abeer H., Asma A.H., Allah A., Qarawi A., Shalawi A., Dilfuza E. Impact of plant growth promoting *Bacillus subtilis* on growth and physiological parameters of *Bassia indica* (Indian Bassia) grown under salt stress. *Pak. J. Bot.*, 2015, 47(5): 1735-1741.
11. Shternshis M.V., Belyaev A.A., Sapatova T.V., Lelyak A.A. Influence of *Bacillus* spp. on strawberry gray-mold causing agent and host plant resistance to disease. *Contemp. Probl. Ecol.*, 2015, 8(3): 390-396 (doi: 10.1134/S1995425515030130).
12. Ivanchina N.V., Garipova S.R. *Agrokhimiya*, 2012, 7: 87-95 (in Russ.).
13. Gutierrez-Manero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F.R., Talon M. The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 2008, 111(2): 206-211 (doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x).
14. Malfanova N., Franzil L., Lugtenberg B., Chebotar V., Ongena M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch. Microbiol.*, 2012, 194(11): 893-899 (doi: 10.1007/s00203-012-0823-0).
15. Bottini R., Cassan F., Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2004, 65(5): 497-503 (doi: 10.1007/s00253-004-1696-1).
16. Grichko V.P., Glick B.R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Bioch.*, 2001, 39(1): 11-17 (doi: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2).
17. Choudhary D.K., Johri B.N. Interactions of *Bacillus* sp. and plants — with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.*, 2009, 164: 493-513 (doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007).
18. Niu D.D., Liu H.X., Jiang C.H., Wang Y.P., Wang Q.Y., Jin H.L., Guo J.H. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol. Plant Microbe. In.*, 2011, 24(5): 533-542 (doi: 10.1094/MPMI-09-10-0213).
19. García-Gutiérrez L., Zerrouh H., Romero D., Cubero J., de Vicente A., Pérez-García A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defense responses. *Microb. Biotechnol.*, 2013, 6: 264-274 (doi: 10.1111/1751-7915.12028).
20. González-Gallegos E., Laredo-Alcalá E., Ascacio-Valdés J., Jasso de Rodríguez D., Hernández-Castillo F.D. Changes in the production of salicylic and jasmonic acid in potato plants (*Solanum tuberosum*) as response to foliar application of biotic and abiotic inductors. *American Journal of Plant Sciences*, 2015, 6(11): 1785-1791 (doi: 10.4236/ajps.2015.611179).

21. Shpirnaya I.A., Ibragimov R.I., Umarov I.A. *Vestnik BGU*, 2006, 3(11): 49-52 (in Russ.).
22. Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Petrova Stoyanova Z., Feller U. Cadmium stress in barley: growth, leaf pigment, and protein composition and detoxification of reactive oxygen species. *J. Plant Nutr.*, 2006, 29(3): 451-468 (doi: 10.1080/01904160500524951).
23. Ievleva E.V., Revina T.A., Kudryavtseva N.N., Sofin A.V., Valueva T.A. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2006, 42(3): 338-344 (in Russ.).
24. Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O. *Vestnik KHNU. Seriya Biologiya*, 2015, 2(35): 6-25 (in Russ.).
25. Molinari H.B.C., Marur C.J., Daros E., de Campos M.K.F., de Carvalho J.F.R.P., Filho B.J.C., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 2007, 130(2): 218-229 (doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00909.x).
26. Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Maslennikova D.R., Yuldashev R.A., Allagulova Ch.R., Lastochkina O.V. *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. N. Khan, R. Nazar, N. Iqbal, N. Anjum (eds.). Springer, Berlin Heidelberg, 2012 (doi: 10.1007/978-3-642-25829-9).
27. Jefferey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pfl.*, 1975, 167: 191-194.
28. Wettstein P. Chrofyll — letal und der submicroscopische Form wechsel der Plastiden. *Exp. Cell Res.*, 1957, 12(4): 427-431.
29. Bates L.S., Waldern R.P., Teare D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 1973, 39: 205-207.
30. Kalinkina L.G. *Fiziologiya rastenii*, 1985, 32: 42-52 (in Russ.).
31. Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95: 271-278.
32. *Metodika opredeleniya khimicheskogo sostava i pokazatelei kachestva sakharnoi svekly* [Analysis of chemical composition and quality indicators of sugar beet plants]. *Kursk, 2001* (in Russ.).
33. Litvinov S.S. *Metodika polevogo opyta v ovoshchevodstve* [Field trials in olericulture]. Moscow, 2011 (in Russ.).
34. Andriyanova Yu.E., Tarchevskii I.A. *Khlorofil i produktivnost' rastenii* [Chlorophyll and plant productivity]. Moscow, 2000 (in Russ.).
35. Cuttriss A.J., Pogson B.J. *Carotenoids. Plant pigments and their manipulation*. K.M. Davies (ed.). CRC Press, Boca Raton, 2004.
36. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Bioch.*, 2010, 48: 909-930 (doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016).
37. Edge R., Truscott G. Properties of carotenoid radicals and excited states and their potential role in biological systems. In: *Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties*. J.T. Landrum (ed.). Kluwer, Dordrecht, 2010.
38. Smolikova G.N., Medvedev S.S. *Fiziologiya rastenii*, 2015, 62(1): 3-16 (in Russ.).
39. Jahns P., Holzwarth A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *BBA-Bioenergetics*, 2012, 1817(1): 182-193 (doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.012).
40. Kim Y., Mosier N.S., Ladisch M.R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnol. Progr.*, 2009, 25(2): 340-348 (doi: 10.1002/btpr.137).
41. Piskureva V.A., Pavlovskaya N.E., Gor'kova I.V., Zhitnikova B.C. *Pishchevaya promyshlennost'*, 2009, 6: 50-51 (in Russ.).
42. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E. *Vestnik KHNU. Seriya biologiya*, 2009, 1(16): 19-38 (in Russ.).
43. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 2010, 15(2): 89-97 (doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009).