

Научная статья
УДК 635.21:579.64(470.57)
EDN: CLFIST
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-569-578



Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на активность метаболических процессов, протекающих в клубнях картофеля при хранении

Л.И. Пусенкова*✉, С.Р. Гарипова***, О.В. Ласточкина***,

И.А. Шпирная**, В.А. Валиева*

*Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Российская Федерация

**Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Российская Федерация

***Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Российская Федерация

Аннотация. Изучено влияние предпосадочной инокуляции клубней картофеля бактериями *Bacillus subtilis* на биохимические процессы в клубнях нового урожая в послеуборочный период в разные сроки хранения. Содержание малонового диальдегида в клубнях, обработанных штаммами 10-4 и 26Д, через 1 и 6 месяцев снижалось на 15,5 и 35,5% и на 14,9 и 13,6% относительно контроля. Содержание пролина в клубнях, предобработанных штаммом 10-4, в оба срока хранения незначительно отличалось от контроля, а в случае использования штамма 26Д было ниже контроля на 14,7 и 26,3%. Сначала активность защитных белков в обработанных клубнях снижалась относительно контроля, затем активность ингибиторов трипсина в клубнях значительно превышала показатели в клубнях, хранящихся непродолжительное время. Содержание белка в предобработанных клубнях сначала было выше контроля, затем либо на уровне (штамм 26Д), либо на 15% ниже контроля (штамм 10-4). Содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных штаммом 10-4 клубнях на 16,1 и 17,9% превышало контроль через 1 и 6 месяцев хранения, а в случае использования штамма 26Д не отличалось от контроля. Количество редуцирующих сахаров было на 39,4% ниже контроля через 1 и 6 месяцев хранения (штамм 10-4) и на 35,6% через 6 месяцев хранения (штамм 26Д). Предобработка штаммами 10-4 и 26Д положительно повлияла на основные биохимические показатели клубней при длительном хранении, обеспечив защитный эффект и сохранение биологической ценности продукции.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, картофель, хранение, ингибиторы трипсина, протеолитическая активность

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00262 (<https://rscf.ru/project/23-26-00262/>).

Для цитирования: Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Шпирная И.А., Валиева В.А. Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на активность метаболических процессов, протекающих в клубнях картофеля при хранении // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 569–578. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-569-578. EDN: CLFIST.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on metabolic processes in potato tubers during storage

Ludmila I. Pusenkova*✉, Svetlana R. Garipova***, Oksana V. Lastochkina***,

Irina A. Shpirnaya**, Valeria A. Valieva*

*Bashkir Research Institute of Agriculture of Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa, Russian Federation

**Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russian Federation

***Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa, Russian Federation

© Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Шпирная И.А., Валиева В.А., 2023

Abstract. The article examines the effect produced by the preplant inoculation of potato tubers with *Bacillus subtilis* on biochemical processes occurring in the tubers of a new crop during the postharvest period at different storage periods. The content of malondialdehyde in tubers treated with strains 10-4 and 26D decreased by 15.5 and 35.5% and by 14.9 and 13.6% relative to the control after one and six months, respectively. The proline content in tubers pretreated with strain 10-4 differed insignificantly from the control in both storage periods, while in the case of strain 26D, it was lower than the control by 14.7 and 26.3%. First, the activity of protective proteins in treated tubers decreased relative to the control; then, the activity of trypsin inhibitors in tubers was found to significantly exceed that in tubers stored for a short time. The protein content of pretreated tubers was initially higher than that of the control; then, it was either at the same level (strain 26D) or 15% lower than the control (strain 10-4). The content of ascorbic acid in tubers pretreated with strain 10-4 exceeded that of the control by 16.1 and 17.9% after one and six months of storage, respectively, whereas in the case of strain 26D, no difference from the control was noted. The amount of reducing sugars was 39.4% lower than the control after one and six months of storage (strain 10-4) and 35.6% after six months of storage (strain 26D). The pretreatment with strains 10-4 and 26D positively affected the main biochemical parameters of tubers during long-term storage, providing a protective effect and preserving the biological value of produce.

Keywords: endophytic bacteria, potatoes, storage, trypsin inhibitors, proteolytic activity

Funding. The Russian Science Foundation (grant no. 23-26-00262; <https://rscf.ru/project/23-26-00262/>) supported the study.

For citation: Pusenkova L.I., Garipova S.R., Lastochkina O.V., Shpirnaya I.A., Valieva V.A. Effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on metabolic processes in potato tubers during storage. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):569-578. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-569-578. EDN: CLFIST.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель является одной из важнейших полевых культур, особенность биологии которой связана с вегетативным способом ее размножения. Вследствие регулярного накопительного воздействия фитопатогенов данная культура с течением времени вырождается и физиологически стареет под влиянием абиотических стрессов, связанных с неблагоприятными внешними факторами при выращивании и хранении [1], что вызывает как снижение урожая клубней и их качества, так и ухудшение их сохранности. Качество клубней, сформированное в полевых условиях во время роста и развития растений, должно быть сохранено во время послеуборочного хранения [2]. Повышение сохранности семенного и продовольственного картофеля является особенно актуальным вопросом, поскольку ежегодные потери урожая при хранении вследствие клубневых инфекций составляют от 15–20 до 80–100% [3]. Хранение клубней – это естественный процесс их старения [4], на который оказывает влияние множество факторов, в том числе сорт картофеля, зрелость клубней [5, 6], а также биохимические, физиологические и микробиологические процессы, протекающие в поствегетационный период [7].

Применение микробных биопрепаратов оказывает направленное воздействие на ход обменных процессов в клубнях при их хранении, обеспечивая сокращение потерь. Так, обработки клубней препаратами группы «Экстрасол» (штамм *Bacillus subtilis* Ч-13) в лечебный период снижают потери в период хранения более чем на 30% [8]. Биологическая эффективность обработки клубней жидкой препаративной формой на основе штамма *B. subtilis* И5-12/23 перед закладкой на длительное хранение составила 78,9–86,9% и была выше, чем у химического стандарта – фунгицида «Максим КС» (52,1%) [9]. Применение микробных препаратов для интенсификации адаптационных защитных реакций клубней картофеля при хранении – эффективный прием,

активирующий ответные защитные реакции клубней более чем в 2 раза [8].

Особый интерес представляют эндофитные бактерии *B. subtilis*, способные колонизировать ткани растений-хозяев и изнутри влиять на их метаболизм в ходе всего онтогенеза, сохраняя защитный потенциал в послеуборочный период [10]. Ранее нами было показано пролонгированное действие биопрепарата «Фитоспорин-М» (штамм *B. subtilis* 26Д) на сохранность клубней: полученные при обработке растений клубни обладали более высокой устойчивостью к возбудителям фузариозной сухой гнили и фитофтороза в период хранения по сравнению с контрольными [11]. Доказана также способность модулировать защитные механизмы гидропонных стерильных клубней при обработке *B. subtilis* непосредственно перед закладкой на хранение [12].

Поскольку формирование конституционных защитных механизмов происходит во время роста, одним из механизмов защиты клубней при хранении может являться иммунизация растений в период их выращивания. Сведения о физиологических механизмах сохранения индуцированной в полевых условиях устойчивости клубней картофеля в поствегетационный период в научной литературе практически отсутствуют.

Целью проведенной работы являлось изучение влияния предпосадочной обработки клубней эндофитными бактериями *B. subtilis* на адаптационные защитные реакции картофеля при его хранении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на клубнях картофеля сорта Башкирский, выращенных из предобработанных штаммами *B. subtilis* 10-4 (10^8 КОЕ/мл) и 26Д (10^9 КОЕ/мл) клубней в полевых условиях и заложенных на длительное хранение. Объектами исследования являлись эндофитные бактерии *B. subtilis*: штаммы 10-4 (новый штамм из коллекции Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства,

регистрационный номер Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов В-12988) и 26Д (эталонный штамм, регистрационный номер 016-02-2491-1, бактериальная основа препарата биофунгицидного действия «Фитоспорин-М» научно-внедренческого предприятия «Башинком»). Предпосадочную обработку клубней проводили путем опрыскивания жидкой формой препарата штаммов бактерии *B. subtilis* 10-4 и 26Д в концентрации 10^8 КОЕ/мл.

Влияние предобработок растений эндозитными бактериями на биохимические показатели работы фитоиммунной системы в клубнях картофеля в период хранения оценивали через 1 месяц после уборки (лечебный период, в течение которого клубни хранились при температуре 16 °С для залечивания механических повреждений, созревания клубней и их подготовки к длительному хранению) и через 6 месяцев хранения при температуре 3 ± 1 °С по степени накопления конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА), содержанию пролина, неферментативного антиоксиданта – аскорбиновой кислоты, оценивали также протеолитическую активность и уровень активности ингибиторов трипсина, содержание редуцирующих сахаров.

Оценка уровня перекисного окисления липидов. Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию в клубнях конечного продукта ПОЛ – МДА – с помощью цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [13]. Навеску клубней (0,5 г) растирали с 3 мл дистиллированной воды, добавляли 3 мл 20%-й трихлоруксусной кислоты и центрифугировали (10000 g, 10 мин). К 2 мл надосадочной жидкости добавляли 2 мл 0,5%-й тиобарбитуровой кислоты в 20%-й трихлоруксусной кислоте, инкубировали при 100 °С (30 мин), далее раствор охлаждали и измеряли оптическую плотность при 532 и 590 нм (Spectrophotometer SmartSpec™ Plus, Bio-Rad, США). Концентрацию МДА вычисляли с использованием коэффициента молярной экстинкции $155000 \text{ л}/(\text{см} \cdot \text{моль})$.

Определение содержания пролина. Содержание пролина оценивали с помощью нингидринового реактива [14]. Навеску клубней (0,5 г) заливали 5 мл кипящей дистиллированной воды, инкубировали при 100 °С (30 мин) и охлаждали. Далее 1 мл экстракта смешивали с 1 мл нингидринового реактива и 1 мл ледяной уксусной кислоты, инкубировали при 100 °С (1 ч) и охлаждали. Оптическую плотность растворов измеряли при 522 нм (Spectrophotometer SmartSpec™ Plus, Bio-Rad, США).

Определение содержания аскорбиновой кислоты. Определение содержания аскорбиновой кислоты проводили методом титрования (ГОСТ 24556-89). Навеску (10 г) растирали с 10 мл дистиллированной воды, переносили в колбу на 100 мл, выдерживали 10 мин, а затем фильтровали. Полученный экстракт использовали для титрования раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до установления розовой окраски.

Определение активности ингибиторов трипсина и протеолитической активности. Для получения экстрактов из клубня пробочным сверлом вырезали цилиндры, включающие все зоны клубня. Навеску клубня гомогенизировали в фарфоровой ступке со стеклянным песком, ресуспендировали в дистиллированной воде

(1:9) и выдерживали 30 мин при 4 °С. Полученный экстракт дважды центрифугировали при 10000 g и 4 °С в течение 10 мин на центрифуге Eppendorf 5417R (Eppendorf, Германия). В супернатанте определяли активность ингибиторов трипсина и протеолитическую активность. Супернатанты замораживали и хранили при минус 18 °С. Для определения содержания белка их размораживали, центрифугировали при 10000 g и 4 °С в течение 10 мин, белок определяли по Бредфорду. Протеолитическую активность определяли по методу Эрлангера [15], активность ингибиторов трипсина определяли методом Гофмана и Вайсблая [16] микрометодом, оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре «Униплан» (АИФР-01) (ПИКОН, Россия).

Содержание редуцирующих сахаров. Содержание редуцирующих сахаров определяли спектрофотометрическим методом, основанном на их способности давать окрашенные соединения с 3,5-динитросалициловой кислотой [17].

Все эксперименты были проведены в трех биологических и трех аналитических повторах. Статистическая обработка данных включала оценку достоверности различий средних арифметических (t-тест) при уровне значимости $p < 0,05$ с использованием программ Microsoft Excel.

Происходящие при длительном хранении клубней окислительно-восстановительные процессы, в результате которых накапливаются продукты ПОЛ и снижается функция антиоксидантной системы, рассматриваются в качестве основных физиолого-биохимических механизмов, определяющих сохранность картофеля [18]. Соответственно, по степени накопления или убывания в клубнях конечного продукта ПОЛ – МДА, а также пролина – многофункционального стрессового метаболита растений, выполняющего также роль антиоксиданта, можно судить о характере и направленности физиологических процессов в клубнях под влиянием предобработки бактериями и оценить вклад этого фактора в повышение жизнеспособности клубней в период хранения.

Анализ содержания МДА показал, что в клубнях без обработки (контроль) в период длительного хранения (6 месяцев) по сравнению с его уровнем при краткосрочном хранении отмечена активация реакций ПОЛ. Так, в контроле уровень МДА после 6 месяцев хранения составил 15,79 нМг/г сырой массы, что на 36,8% выше по сравнению с первоначальным значением. В то же время в предобработанных эндозитными бактериями *B. subtilis* клубнях отмечено снижение уровня накопления МДА по сравнению с контролем на 15,5 и 35,5% через 1 и 6 месяцев хранения в случае использования штамма 10-4 и на 14,9 и 13,6% при обработке штаммом 26Д соответственно (рис. 1, а). Таким образом, в начале срока хранения и особенно через полгода хранения обработанные бактериями *B. subtilis* клубни отличались сниженным по сравнению с необработанными клубнями содержанием МДА, что свидетельствовало о протекторной роли бактерий, приводящей к ослаблению окислительных повреждений мембран.

Увеличение содержания пролина в растениях часто связывают с активизацией процессов системной защиты в ответ на стрессовые воздействия, а величину его снижения – со степенью физиологического благополучия

организма [19]. Выявлено, что в начальный срок хранения содержание пролина как в клубнях, предобработанных штаммом 10-4, так и в контрольном варианте отличалось незначительно и составило 1,09 и 1,19 мкг/г сырой массы, тогда как содержание пролина в клубнях, предобработанных штаммом 26Д, было ниже контроля на 14,7 и 26,3% соответственно в начальный и конечный сроки хранения (рис. 1, b). Очевидно, что эти штаммы по-разному воздействуют на физиологические процессы в длительно хранящихся клубнях. Под влиянием штамма 10-4 в конечный срок хранения отмечено большее снижение содержания МДА и большее увеличение содержания пролина по отношению к варианту обработки штаммом 26Д.

Известно, что одним из механизмов защитного действия растений против фитопатогенов и фитофагов является продукция защитных белков, ингибирующих активность протеиназ патогенов и фитофагов [20], синтез которых может индуцироваться под влиянием эндофитных бактерий *B. thuringiensis* штамма В-5351 [21]. Представляло интерес исследование активности

данных соединений в хранящихся клубнях в связи с бактериальной обработкой эндофитных штаммов *B. subtilis* 10-4 и 26Д (рис. 2).

Анализ ингибиторной активности в тканях заложенных на хранение клубней, полученных от предобработанных штаммами *B. subtilis* 10-4 и 26Д растений, показал, что при непродолжительном хранении уровень активности ингибиторов трипсина в контрольном варианте был значительно выше при сравнении с клубнями, подвергнутыми бактериальной обработке (см. рис. 2, а). Однако при анализе данной активности после длительного хранения показано, что клубни, полученные из предобработанных растений, существенно превышали уровень контрольного варианта по содержанию белков – ингибиторов трипсина. Таким образом, обработка имела модулирующий эффект на показатели активности защитных белков. В начале срока закладки на хранение в обработанных бактериями клубнях наблюдалось снижение содержания данных соединений по сравнению с контролем. Это может быть связано с реакциями, приводящими к эффекту праймирования,

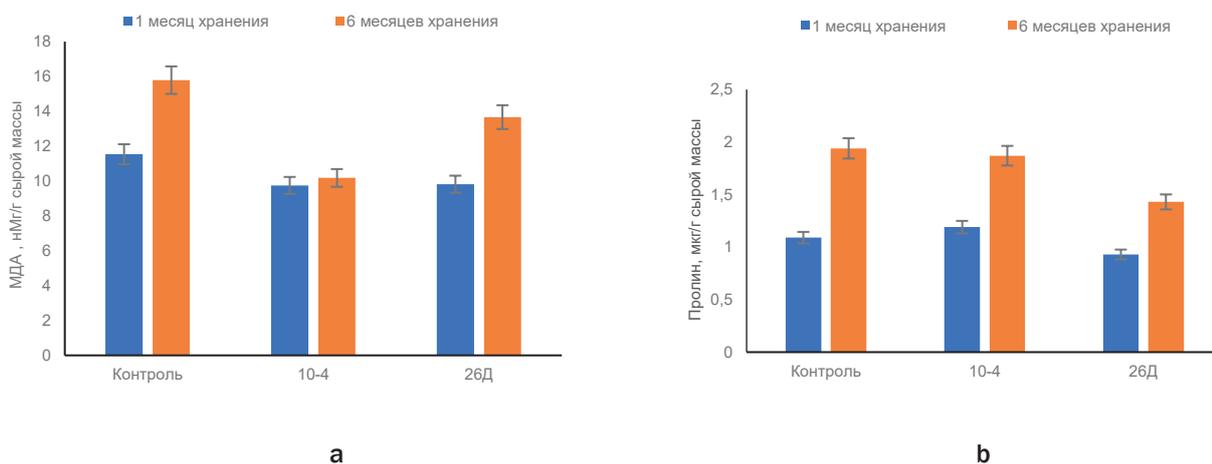


Рис. 1. Влияние предобработки штаммами *Bacillus subtilis* 10-4 и 26Д на содержание малонового диальдегида (а) и пролина (b) в клубнях при хранении

Fig. 1. Impact of *Bacillus subtilis* (10-4, 26D) on the content of malondialdehyde (a) and proline (b) in tubers during storage

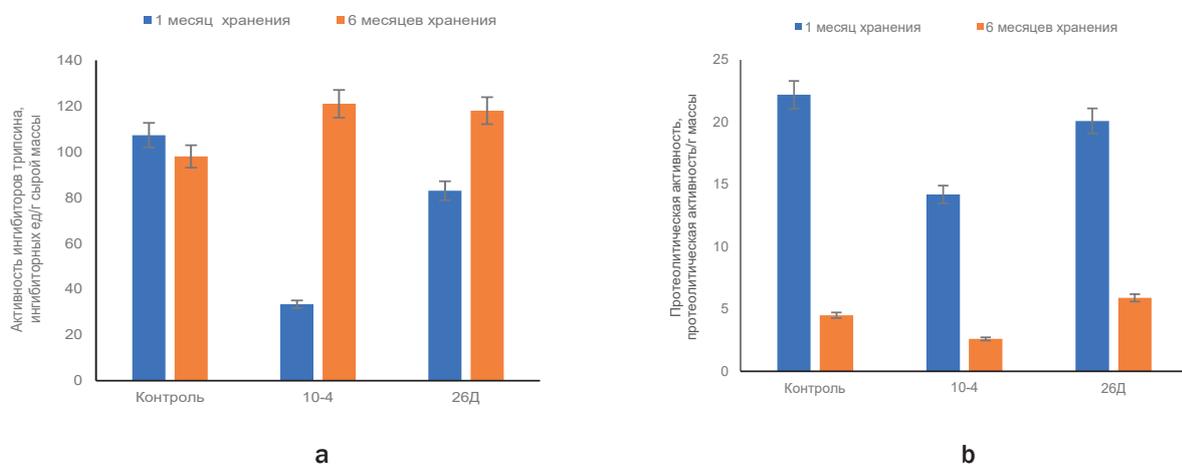


Рис. 2. Влияние предобработки штаммами *Bacillus subtilis* 10-4 и 26Д на уровень активности ингибиторов трипсина (а) и протеолитической активности (b) в клубнях при хранении

Fig. 2. Impact of *Bacillus subtilis* (10-4, 26D) on the level of trypsin inhibitors activity (a) and proteolytic activity in tubers (b)

в которых действие эндофитных бактерий может быть сравнимо с процессами слабого патогенеза.

Тем не менее в конце срока хранения активность ингибиторов протеиназ в клубнях значительно превышала показатели клубней, хранящихся непродолжительное время, что свидетельствовало об усилении защитного действия обоих штаммов эндофитных бактерий в клубнях при длительном хранении. Примечательно, что в контрольных образцах данная активность не столь лабильна и незначительно снижается к концу хранения.

Протеолитическая активность тканевых ферментов имела тенденцию к снижению как в контрольных, так и в обработанных бактериями клубнях, что уменьшает вероятность накопления свободных аминокислот (см. рис. 2, б). Примечательно, что наибольшее снижение протеолитической активности (на 36 и 42,2% по отношению к контролю соответственно) выявлено в варианте обработки штаммом 10-4. Таким образом, обработка эндофитными бактериями оказала модулирующий и штаммоспецифичный по силе воздействия эффект на показатели активности защитных белков.

В состоянии пониженной функциональной активности растительного организма при низкой температуре хранения уровень аскорбиновой кислоты может характеризовать ответную реакцию растительных тканей на продукты метаболизма бактерий [8]. В нашем эксперименте выявлено, что содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных эндофитными бактериями *B. subtilis* штамма 10-4 клубнях превышало величину этого показателя в контроле на 16,1% через 1 месяц и на 17,9% через 6 месяцев хранения. При этом содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных штаммом *B. subtilis* 26Д клубнях в оба срока достоверно не отличалось от контроля (рис. 3, а). Можно предположить, что повышенное накопление антиоксиданта в варианте бактериализации штаммом 10-4 (см. рис. 3, а) явилось компенсаторной реакцией растения на снижение активности ингибиторов протеиназ (см. рис. 2, а).

Отмечена тенденция снижения содержания растворимого белка при хранении. Бактериальные обработки оказали влияние на данный показатель, который зависел от срока хранения клубней (рис. 3, б). Так, при непродолжительном хранении содержание белка в обработанных клубнях на 20% превышало значения контрольного варианта. При длительном хранении данный показатель оказался на уровне контрольного варианта (штамм 26Д) или был снижен на 15% (штамм 10-4).

За период хранения в контрольных клубнях произошло увеличение содержания редуцирующих сахаров на 48,2% (рис. 3, с), что снижало технологическое качество клубней и их лежкость. В начальный срок хранения в обработанных штаммом 10-4 клубнях содержание редуцирующих сахаров было исходно ниже контроля на 39,4%. Но к концу 6-месячного срока хранения оно сравнялось с величиной данного показателя в обработанных штаммом 26Д клубнях. При этом оба инокулированных варианта характеризовались меньшим накоплением редуцирующих сахаров при длительном хранении по сравнению с контролем на 39,4% (штамм 10-4) и 35,6% (штамм 26Д), что сопряжено с положительным влиянием на пригодность к переработке хранящихся клубней.

По совокупности измеренных физиолого-биохимических показателей клубней в период хранения

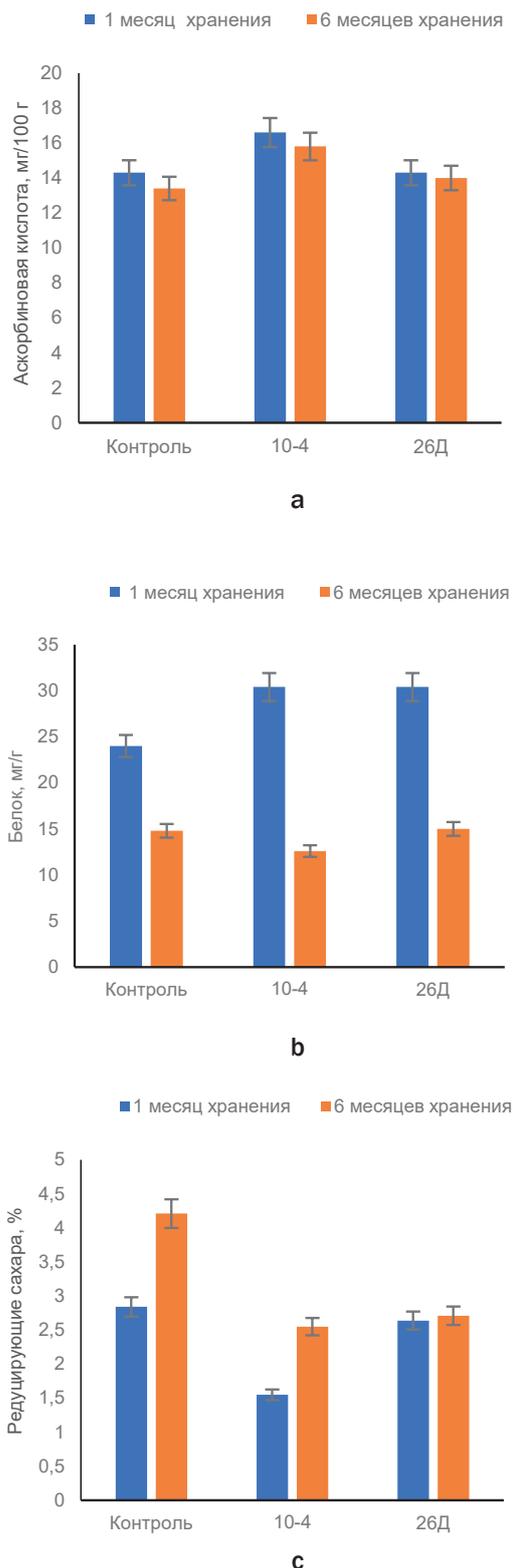


Рис. 3. Влияние предобработки штаммами *Bacillus subtilis* 10-4 и 26Д на содержание аскорбиновой кислоты (а), растворимого белка (б) и редуцирующих сахаров (с) в клубнях при хранении

Fig. 3. Impact of *Bacillus subtilis* (10-4, 26D) on the content of ascorbic acid (a), soluble protein (b), and reducing sugars (c) in tubers during storage

выявлено, что предобработка эндофитными бактериями положительно повлияла на хозяйственно-ценные признаки клубней, обеспечив защитный эффект, который в большей степени был выражен при обработке штаммом *B. subtilis* 10-4. Это выразилось в уменьшении содержания МДА, повышении содержания пролина, уменьшении активности протеиназ и увеличении содержания аскорбиновой кислоты по сравнению с действием штамма 26Д, при этом оба штамма способствовали повышению уровня активности ингибиторов протеиназ и уменьшению содержания редуцирующих сахаров.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что инокуляция эндофитными бактериями не только оказывает долгосрочное действие на растение в течение его онтогенеза, но и влияет на физиологическое состояние клубней в период их хранения [11]. Для оценки вклада обработки растений картофеля бактериями *B. subtilis* штаммов 26Д и 10-4 нами были оценены такие физиолого-биохимические показатели клубней, как содержание в их тканях МДА, пролина, активность ингибиторов трипсина и протеиназная активность, а также содержание аскорбиновой кислоты, растворимого белка и редуцирующих сахаров.

Выявленное в эксперименте увеличение содержания МДА в контрольных клубнях при хранении, вероятно, связано с процессами физиологического старения клубней, которые сопровождаются нарушением внутриклеточного баланса активных форм кислорода (АФК). Увеличение концентрации свободных радикалов изменяет нормальный редокс-статус клеток, вызывая окислительные стрессы, которые приводят к повреждению функциональных макромолекул (ферментов) и нарушению физиологических процессов, протекающих в клеточных структурах клубней [7]. При этом обнаруженное в нашем эксперименте уменьшение содержания МДА в хранящихся 6 месяцев клубнях, предобработанных бактериями, свидетельствует об ослаблении оксидативного стресса в клубнях и защищенности клеток от повреждающего действия АФК. Можно предположить, что защитный эффект *B. subtilis* связан с модуляцией активности антиоксидантных ферментов под их влиянием, вследствие чего они могут контролировать уровень АФК, приводящих к ПОЛ [22]. Как было показано, растения томата, инокулированные эндофитными бактериями *Sphingomonas* sp. LK11, характеризовались повышением активности каталазы, полифенолоксидазы, а также усилением синтеза глутатиона, что в совокупности способствовало снижению в этих растениях стресс-индуцированного уровня ПОЛ и накоплению МДА [23]. Таким образом, полученные нами результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о снижении под влиянием ростстимулирующих бактерий окислительных повреждений растений.

Известно, что накопление пролина является широко распространенным ответом растений на стрессовые ситуации в окружающей среде. В нашем эксперименте уровень пролина в хранящихся клубнях возрос от начала хранения до периода 6-месячного хранения во всех вариантах опыта, однако меньшее его накопление зафиксировано при обработке штаммом 26Д в оба срока наблюдений. Вероятно, эти различия могут быть связаны с разной степенью колонизации тканей картофеля разными штаммами или с различиями в природных свойствах штаммов, которые, как было показано ранее, способны в разной степени вызывать лигнификацию клеточных стенок и продуцировать разные количества индолил-3-уксусной кислоты [24].

Косвенным подтверждением различий в физиологической активности штаммов является также дифференцированная способность вызывать ответную реакцию растений по активности ингибиторов трипсина (см. рис. 2, а) и протеиназной активности (см. рис 2, б). Ранее способность эндофитных бактерий модулировать уровень активности ингибиторов протеиназ была отмечена в работе [20]. Вероятно, более сильное влияние, оказанное штаммом 10-4 на физиологический статус клубней, обусловило и более выраженный эффект праймирования, который зафиксирован в нашем эксперименте по накоплению аскорбиновой кислоты именно в варианте предобработки штаммом 10-4. В нашем эксперименте содержание аскорбиновой кислоты в предобработанных эндофитными бактериями *B. subtilis* штамма 10-4 клубнях превышало величину этого показателя в контроле в 1,2 раза, что согласуется с данными других исследований [8, 25]. Вероятно, именно с эффективно сработавшей системной защитой в ответ на присутствие штамма 10-4 связано уменьшение содержания редуцирующих сахаров в клубнях при хранении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует в пользу того, что предпосадочная инокуляция клубней эндофитными бактериями *B. subtilis* штамма 10-4 посредством снижения уровня стресс-индуцированного увеличения ПОЛ, снижения концентрации пролина, более усиленного накопления аскорбиновой кислоты оказала защитный эффект на растения картофеля в период длительного хранения, обеспечивая замедление процессов старения с сохранением биологической ценности продукции. Защитный эффект клубней в период хранения связан со способностью бактерий *B. subtilis* проникать в растительные ткани картофеля, заселяя их эндофитно, сосуществовать в них и способствовать формированию длительной защиты от стрессовых факторов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Усков А.И., Кравченко Д.В., Ускова Л.Б., Галушка П.А., Замятин А.А., Скулачев М.В. Регуляция физиологического старения культуры картофеля // Земледелие. 2019. N 8. С. 33–37. DOI: 10.24411/0044-3913-2019-10808.
2. Ávila-Valdés A., Quinet M., Lutts S., Martínez J. P., Lizana X.C. Tuber yield and quality responses of potato to moderate temperature increase during Tuber bulking under two water availability scenarios // Field Crops Research. 2020. Vol. 251. P. 107786. DOI: 10.1016/j.fcr.2020.107786.

3. Белов Г.Л., Зейрук В.Н., Мальцев С.В., Абашкин О.В., Абросимов Д.В. Применение химических и биологических препаратов для защиты картофеля при хранении // Агрехимический вестник. 2020. N 6. С. 75–78. DOI: 10.24411/1029-2551-2020-10090. EDN: DRZOJK.
4. Draie R., Al-Absi M. Regulation and control of potato tuber dormancy and sprouting // International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research. 2019. Vol. 6, no 1. P. 4573–4583.

5. Федотова Л.С., Тимошина Н.А., Князева Е.В. Динамика биохимических показателей картофеля в период хранения // Картофель и овощи. 2017. N 1. С. 31–34. EDN: XIROXT.
6. Elmore J.S., Briddon A., Dodson A.T., Muttucumar N., Halford N.G., Mottram D.S. Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: effects of variety and tuber storage time // Food Chemistry. 2015. Vol. 182. P. 1–8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.103.
7. Усков А.И., Ускова Л.Б., Кравченко Д.В., Галушка П.А., Закабунина Е.Н. Регуляция процессов физиологического старения при длительном репродукции картофеля // Земледелие. 2018. N 5. С. 40–44. DOI: 10.24411/0044-3913-2018-10511.
8. Чеботарь В.К., Кипрушкина Е.И. Применение микробных препаратов в технологиях хранения картофеля // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29. N 1. С. 33–35. EDN: TMZFSZ
9. Новикова И.И., Титова Ю.А., Бойкова И.В., Зейрук В.Н., Краснобаева И.Л. Биологическая эффективность новых биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для контроля возбудителей болезней картофеля при вегетации и хранении клубней // Биотехнология. 2017. Т. 33. N 6. С. 68–76. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-68-76. EDN: YMVEAK.
10. Lastochkina O., Aliniaiefard S., Seifkhalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat // Wheat production in changing environments / eds M. Hasanuzzaman, K. Nahar, Md.A. Hossain. Singapore: Springer, 2019. P. 579–614. DOI: 10.1007/978-981-13-6883-7_23.
11. Максимов И.В., Пусенкова Л.И., Абизгильдина Р.Р. Влияние биопрепаратов на основе эндофитной бактерии *Bacillus subtilis* 26Д на поствегетационное сохранение защитного потенциала клубней картофеля против патогенов // Агробиология. 2011. N 6. С. 43–48. EDN: NURDSX.
12. Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Yuldashev R., Shpirnaya I., Kasnak C., et al. The effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and salicylic acid on some resistance and quality traits of stored *Solanum tuberosum* L. tubers infected with fusarium dry rot // Plants. 2020. Vol. 9, no. 6. P. 738. DOI: 10.3390/plants9060738.
13. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1968. Vol. 125, no. 1. P. 189–198. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
14. Bates L.S., Waldern R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.
15. Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха // Прикладная биохимия и микробиология. 1975. N 5. С. 777–783.
16. Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1961. Vol. 95, no 2. P. 271–278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
17. Vasanthan T., Bergthaller W., Driedger D., Yeung J., Sporus P. Starch from Alberta potatoes: wet Isolation and some physicochemical properties // Food Research International. 1999. Vol. 32, no. 5. P. 355–365. DOI: 10.1016/S0963-9969(99)00096-4.
18. Щербачков А.В., Щербачкова Е.Н., Мулина С.А., Роц П.Ю., Дарью Р.Ф., Кипрушкина Е.И. [и др.]. Психрофильные псевдомонады-эндофиты как потенциальные агенты в биоконтроле фитопатогенных и гнилостных микроорганизмов при холодильном хранении картофеля // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. N 1. С. 116–128. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.116rus. EDN: YFQFFJ.
19. Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M. A., Kamaletdinova A. A., Lastochkina O. V., et al. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria // Acta Physiologiae Plantarum. 2022. Vol. 44. P. 89. DOI: 10.1007/s11738-022-03427-1.
20. Яруллина Л.Г., Ахатова А.Р., Касимова Р.И. Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы в регуляции взаимоотношений растений с патогенами // Физиология растений. 2016. Т. 63. N 2. С. 205–217. DOI: 10.7868/S0015330316020159. EDN: VINZCF.
21. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Гордеев А.А., Марданшин И.С., Максимов И.В. Совместное влияние *Bacillus thuringiensis* B-5351 и салициловой кислоты на устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* и урожайность в полевых условиях // Biomics. 2023. Т. 15. N 1. С. 1–6. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-1. EDN: NSIMDV.
22. Yarullina L.G., Veselova S.V., Ibragimov R.I., Shpirnaya I.A., Kasimova R.I., Akhatova A.R., et al. Tsvetkov V., Maksimov I. Search for molecular markers of wheat resistance to fungal pathogens // Agricultural Sciences. 2014. Vol. 5. P. 722–729. DOI: 10.4236/as.2014.58076.
23. Hao Y., Wu H., Liu Y., Hu Q. Mitigative effect of *Bacillus subtilis* QM3 on root morphology and resistance enzyme activity of wheat root under lead stress // Advances in Microbiology. 2015. Vol. 5, no. 6. P. 469–478. DOI: 10.4236/aim.2015.56048.
24. Lastochkina O., Aliniaiefard S., Garshina D., Garipova S., Pusenkova L., Allagulova Ch., et al. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damage // Journal of Plant Physiology. 2021. Vol. 263. P. 153462. DOI: 10.1016/j.jplph.2021.153462.
25. Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Kasnak C., Palamutoglu R., Shpirnaya I., et al. Improving the biocontrol potential of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* with salicylic acid against *Phytophthora infestans*-caused postharvest potato tuber late blight and impact on stored tubers quality // Horticulturae. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 117. DOI: 10.3390/horticulturae8020117.

REFERENCES

1. Uskov A.I., Kravchenko D.V., Uskova L.B., Galushka P.A., Zamyatnin A.A., Skulachev M.V. Regulation of physiological aging of potato culture. *Zemledelie*. 2019;8:33-37. (In Russian). DOI: 10.24411/0044-3913-2019-10808.
2. Ávila-Valdés A., Quinet M., Lutts S., Martínez J. P., Lizana X.C. Tuber yield and quality responses of potato to

- moderate temperature increase during Tuber bulking under two water availability scenarios. *Field Crops Research*. 2020;251:107786. DOI: 10.1016/j.fcr.2020.107786.
- 3.** Belov G.L., Zeyruk V.N., Maltsev S.V., Abashkin O.V., Abrosimov D.V. Protection of potato during storage with chemical and biological preparations. *Agrokhimicheskiy vestnik = Agrochemical Herald*. 2020;6:75-78. (In Russian). DOI: 10.24411/1029-2551-2020-10090. EDN: DRZOJK.
- 4.** Draie R., Al-Absi M. Regulation and control of potato tuber dormancy and sprouting. *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research*. 2019;6(1):4573-4583.
- 5.** Fedotova L.S., Timoshina N.A., Knyazeva E.V. Dynamics of potato biochemical indicators during storage. *Kartofel' i ovoshchi = Potato and Vegetables*. 2017;1:31-34. (In Russian). EDN: XIROXT.
- 6.** Elmore J.S., Briddon A., Dodson A.T., Muttucumaru N., Halford N.G., Mottram D.S. Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: effects of variety and tuber storage time. *Food Chemistry*. 2015;182:1-8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.103.
- 7.** Uskov A.I., Uskova L.B., Kravchenko D.V., Galushka P.A., Zakabunina E.N. Regulation of Physiological Aging Processes during Long-Term Potato Reproduction. *Zemledelie*. 2018;5:40-44. (In Russian). DOI: 10.24411/0044-3913-2018-10511.
- 8.** Chebotar V.K., Kiprushkina E.I. Application of microbial preparations in potato storage technologies. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(1):33-35. (In Russian). EDN: TMZFSZ.
- 9.** Novikova I.I., Titova Yu.A., Boikova I.V., Zeiruk V.N., Krasnobayeva I.L. Biological efficiency of new biopreparations based on antagonistic microbes in control of potato pathogens during plant vegetation and tuber storage. *Biotehnologiya*. 2017;33(6):68-76. (In Russian). DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-68-76. EDN: YMVEAK.
- 10.** Lastochkina O., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat. In: Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain Md.A. (eds). *Wheat production in changing environments*. Singapore: Springer; 2019, p. 579-614. DOI: 10.1007/978-981-13-6883-7_23.
- 11.** Maksimov I.V., Pusenkova L.I., Abizgildina R.R. Biopreparation with endophytic bacterium *Bacillus subtilis* 26D created postharvest protecting effect in potato tubers. *Agrokhimiya*. 2011;6:43-48. (In Russian). EDN: NURDSX.
- 12.** Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Yuldashev R., Shpirnaya I., Kasnak C., et al. The effect of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* and salicylic acid on some resistance and quality traits of stored *Solanum tuberosum* L. tubers infected with fusarium dry rot. *Plants*. 2020;9(6):738. DOI: 10.3390/plants9060738.
- 13.** Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968;125(1):189-198. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
- 14.** Bates L.S., Waldern R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39:205-207. DOI: 10.1007/BF00018060.
- 15.** Gofman Yu.Ya., Vaisblai I.M. Determination of trypsin inhibitor in pea seeds. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1975;5:777-783. (In Russian).
- 16.** Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1961;95(2):271-278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- 17.** Vasanthan T., Bergthaller W., Driedger D., Yeung J., Sporus P. Starch from Alberta potatoes: wet Isolation and some physicochemical properties. *Food Research International*. 1999;32(5):355-365. DOI: 10.1016/S0963-9969(99)00096-4.
- 18.** Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Mulina S.A., Rots P.Yu., Daryu R.F., Kiprushkina E.I., et al. Psychrophilic endophytic pseudomonas as potential agents in biocontrol of phytopathogenic and putrefactive microorganisms during potato storage. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2017;52(1):116-128. (In Russian). DOI: 10.15389/agrobiol.2017.1.116rus. EDN: YFQFFJ.
- 19.** Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M. A., Kamaletdinova A. A., Lastochkina O. V., et al. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2022;44:89. DOI: 10.1007/s11738-022-03427-1.
- 20.** Yarullina L.G., Akhatova A.R., Kasimova R.I. Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant-pathogen interactions. *Fiziologiya rastenii*. 2016;63:2:205-217. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330316020159. EDN: VINZCF.
- 21.** Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Alekseev V. Yu., Gordeev A.A., Mardanshin I.S., Maksimov I.V. Simultaneous effect of *Bacillus thuringiensis* B-5351 and salicylic acid on the resistance of potato plants to *Phytophthora infestans* and yield in the field. *Biomics*. 2023;15(1):1-6. (In Russian). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-1. EDN: NSIMDV.
- 22.** Yarullina L.G., Veselova S.V., Ibragimov R.I., Shpirnaya I.A., Kasimova R.I., Akhatova A.R., et al. Tsvetkov V., Maksimov I. Search for molecular markers of wheat resistance to fungal pathogens. *Agricultural Sciences*. 2014;5:722-729. DOI: 10.4236/as.2014.58076.
- 23.** Hao Y., Wu H., Liu Y., Hu Q. Mitigative effect of *Bacillus subtilis* QM3 on root morphology and resistance enzyme activity of wheat root under lead stress. *Advances in Microbiology*. 2015;5(6):469-478. DOI: 10.4236/aim.2015.56048.
- 24.** Lastochkina O., Aliniaiefard S., Garshina D., Garipova S., Pusenkova L., Allagulova Ch., et al. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damage. *Journal of Plant Physiology*. 2021;263:153462. DOI: 10.1016/j.jplph.2021.153462.
- 25.** Lastochkina O., Pusenkova L., Garshina D., Kasnak C., Palamutoglu R., Shpirnaya I., et al. Improving the biocontrol potential of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* with salicylic acid against *Phytophthora infestans*-caused postharvest potato tuber late blight and impact on stored tubers quality. *Horticulturae*. 2022;8(2):117. DOI: 10.3390/horticulturae8020117.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Пусенкова Людмила Ивановна,
к.с.-х.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Башкирский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450059, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19,
Российская Федерация,
✉ L.Pusenkova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6341-0486>

Гарипова Светлана Равилевна,
д.б.н., доцент,
ведущий научный сотрудник,
Башкирский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450059, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19,
Российская Федерация,
профессор,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
garipovasvetlana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0276-6689>

Ласточкина Оксана Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Институт биохимии и генетики – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71,
Российская Федерация,
oksanaibg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3398-1493>

Шпирная Ирина Андреевна,
к.б.н., доцент,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
i-shia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6348-8467>

Валиева Валерия Азаматовна,
исполняющий обязанности
младшего научного сотрудника,
Башкирский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450059, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19,
Российская Федерация,
valiyeva.valeriya.01@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-7968-9054>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ludmila I. Pusenkova,
Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Leading Researcher,
Bashkir Research Institute of Agriculture
of Ufa Federal Research Centre RAS,
9, Rikhard Zorge St., Ufa, 450059,
Russian Federation,
✉ L.Pusenkova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6341-0486>

Svetlana R. Garipova,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Leading Researcher,
Bashkir Research Institute of Agriculture
of Ufa Federal Research Centre RAS,
9, Rikhard Zorge St., Ufa, 450059,
Russian Federation,
Professor,
Ufa University of Science and Technology,
32 Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
garipovasvetlana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0276-6689>

Oksana V. Lastochkina,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Institute of Biochemistry and Genetics
of Ufa Federal Research Centre RAS,
71, Oktyabrya Ave., Ufa, 450054,
Russian Federation,
oksanaibg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3398-1493>

Irina A. Shpirnaya,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Ufa University of Science and Technology,
32 Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
i-shia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6348-8467>

Valeria A. Valieva,
Acting Junior Researcher,
Bashkir Research Institute of Agriculture
of Ufa Federal Research Centre RAS,
9, Rikhard Zorge St., Ufa, 450059,
Russian Federation,
valiyeva.valeriya.01@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-7968-9054>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 09.08.2023.
Одобрена после рецензирования 19.10.2023.
Принята к публикации 31.10.2023.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 09.08.2023.
Approved after reviewing 19.10.2023.
Accepted for publication 31.10.2023.