

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

ВЛИЯНИЕ КОНЬЮГАТА ХИТОЗАНА С КОФЕЙНОЙ КИСЛОТОЙ И *Bacillus subtilis* НА ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ВИРУСНОМ ЗАРАЖЕНИИ И ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ

© 2024 г. Ж. Н. Калацкая^{1, *}, Л. Г. Яруллина², Н. А. Еловская¹, Г. Ф. Бурханова²,
Е. И. Рыбинская¹, Е. А. Заикина², И. А. Овчинников¹, В. О. Цветков³, К. М. Герасимович¹,
Е. А. Черепанова², О. А. Иванов¹, К. С. Гилевская⁴, В. В. Николайчук⁴

¹Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, 220072 Республика Беларусь

²Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, 450054 Россия

³Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия

⁴Институт химии новых материалов НАН Беларуси,
Минск, 220141 Республика Беларусь

*e-mail: kalatskayaj@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

В работе оценивали влияние конъюгата хитозан-кофейная кислота (Хит-КК), отдельно и в смеси с *Bacillus subtilis* 47 на защиту растений от Y-вируса картофеля (YBK) при оптимальном увлажнении и в условиях водного дефицита. При обработке Хит-КК и смесью Хит-КК + *B. subtilis* 47 здоровых растений картофеля при оптимальных условиях почвенного увлажнения выявлено накопление пролина и фенольных соединений, активация полифенолоксидазы, что приводило к повышению неспецифической устойчивости растений. Обработка Хит-КК снижала уровень инфицирования YBK у растений картофеля в оптимальных условиях и при водном дефиците, увеличивая массу мини-клубней картофеля. Обработка смесью Хит-КК + *B. subtilis* 47 была эффективна только в условиях водного дефицита. Выявлено, что решающим фактором в формировании устойчивости растений картофеля к Y-вирусу при применении Хит-КК является изменение прооксидантно-антиоксидантного статуса клеток растений.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., Y вирус картофеля (YBK), *Bacillus subtilis* 47, конъюгат, кофейная кислота, водный дефицит, про-/антиоксидантная система, продуктивность мини-клубней

DOI: 10.31857/S0555109924060074 EDN: QFLPNI

В связи с растущим спросом на продовольствие во всем мире, ключевой задачей ближайших десятилетий является устойчивое развитие сельского хозяйства [1]. Картофель является четвертой по популярности потребления человеком культурой после риса, пшеницы и кукурузы [2]. Однако растения картофеля часто подвергаются воздействию комбинации различных неблагоприятных факторов, которые снижают их урожайность и качество клубней, что приводит к экономическим потерям и снижению производства продовольствия [3, 4]. Рост растений картофеля и урожайность клубней в значительной степени зависят от влажности почвы. Даже короткие периоды водного стресса могут иметь заметные последствия. Проблема

водоснабжения также возникает в регионах с достаточным, но неравномерным количеством осадков в течение вегетационного периода [5]. Существуют также свидетельства того, что изменение климата влечет расширение ареала обитания патогенов [3, 6]. Вирусные заболевания картофеля являются одной из основных проблем, вызывающих ухудшение качества клубней и снижение урожайности [7].

Разрабатываемые экологически безопасные приемы борьбы с патогенами с использованием биопестицидов рассматриваются как перспективная альтернатива полной или частичной замены химических соединений [8]. Использование бактерий, стимулирующих рост растений (Plant Growth

Promoting Bacteria, PGPB), является одним из экологически безопасных подходов к устойчивому развитию сельского хозяйства [1, 9–11].

Виды *Bacillus* являются одними из наиболее изученных бактерий, которые способствуют подавлению патогенов растений, включая такие механизмы, как конкуренция за питательные вещества и пространство, производство антибиотиков, гидролитических ферментов, сидерофоров и/или индукция системной устойчивости. *Bacillus spp.* также могут выступать в качестве биоудобрений, способствуя поглощению определенных элементов питания из окружающей среды, либо биостимуляторов, обеспечивая растение биологически активными соединениями (биосинтез растительных гормонов) [9, 11–13]. Бактериальные препараты также могут быть использованы для защиты различных видов растений от вирусных заболеваний [14, 15]. Однако различные вещества и факторы окружающей среды могут негативно влиять на рост бактерий *Bacillus* и производство ими спор и метаболитов [12–14]. Необходим поиск способов преодоления существующих ограничений, связанных с использованием штаммов полезных микроорганизмов, например, путем косвенной поддержки их жизнедеятельности. Показано, что хитозан может выступать в качестве сигнальных молекул для связи между PGPR и корнями растений, а в некоторых случаях инициировать защиту от вирусной инфекции [16]. Противовирусная активность хитозана в растениях ранее доказана в работах [17, 18]. Также показано, что хитозан может быть использован для повышения биологической активности микробиологических препаратов на основе штаммов рода *Bacillus* [16, 19, 20]. Существуют и трудности включения хитозана в бактериальные культуральные среды, так как он может ингибировать рост бактерий за счет собственной антимикробной активности [12, 21]. Одним из способов преодоления негативных последствий добавления хитозана в бактериальные препараты может быть его модификация. Фенольные соединения участвуют в защите растений от биотических стрессов. Растения отвечают на атаку патогенов накоплением таких фитоалексинов, как гидроксикумарины и конъюгаты гидроксициннамата. Синтез, высвобождение и накопление фенольных веществ, в частности салициловой кислоты, являются центральными звеном многих защитных стратегий от патогенов [22]. Было показано, что конъюгация хитозана и кофейной кислоты (**Хит-КК**) позволяет получать материалы с улучшенными свойствами: антиоксидантными, антимикробными, ростостимулирующими и др. [23]. Отмечен значительный ростостимулирующий эффект обработки семян огурца и ячменя конъюгатами на основе хитозана и гидроксикоричных кислот [24, 25]. Совместная обработка *Bacillus subtilis* и конъюгатов хитозана с гидроксикоричными кислотами стимулировала защитные

реакции растений картофеля против возбудителя фитофтороза картофеля [20]. Однако роль конъюгатов Хит-КК в защите растений от абиотических стрессов или подавлении вирусной инфекции остается неизвестной. Кроме того, нет информации о способности смесей конъюгатов Хит-КК и бактериальных агентов стимулировать устойчивость растений к вирусным заболеваниям.

Цель работы — изучение потенциала конъюгатов Хит-КК в смеси с *Bacillus subtilis* 47 для защиты растений картофеля от Y-вируса при оптимальном увлажнении и в условиях водного дефицита в почве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения. Для работы использовали размноженные *in vitro* безвирусные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Бриз белорусской селекции, полученные из Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству (Республика Беларусь).

Бактерии. Использовали грамположительный аэробный штамм *Bacillus subtilis* 47 ВІМ В-859D, торговая марка “Карфил” из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Антимикробная активность. Антимикробную активность конъюгата Хит-КК определяли в отношении штамма *B. subtilis* 47 как описано в работе [26]. В чашки Петри вносили 15 мл ГМФ-агара и 100 мкл тестируемой бактериальной культуры *B. subtilis* 47 с концентрацией клеток 1×10^9 КОЕ/мл. На поверхность засеянного агара помещали стерильные диски диаметром 6 мм, пропитанные растворами конъюгата в концентрациях 0.0125, 0.025, 0.05 мг/мл (№2–4), хитозана в концентрации 0.1 мг/мл (№5) и нанокмпозитов на основе хитозана (№6–8), которые не обсуждаются в данной статье. Инкубацию вели при температуре 25°C в течение суток, после чего наличие антибактериального эффекта исследуемых соединений оценивали по диаметру зон ингибирования роста бактерий вокруг дисков.

Y-вирус картофеля и инфицирование растений. Изолят Y-вируса (YBK) был получен из инфицированных растений картофеля в Научно-практическом центре Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству в 2023 г. Вирус поддерживали путем размножения инфицированных растений картофеля с помощью мини-клубней в защищенном от насекомых биотехнологическом комплексе при температуре 20–21°C, освещенности 12000 люкс и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь).

Искусственное заражение YBK проводили путем нанесения сока инфицированных растений-доноров (200 мкл/лист) на механически поврежденные с помощью мелкозернистой наждачной бумаги

листья 3 и 4 уровней экспериментальных растений. Для получения сока зараженные УВК листья растирали в фосфатном буфере (рН 7.8).

Получение конъюгата хитозана с кофейной кислотой. Конъюгат хитозана с кофейной кислотой (Хит-КК) получали карбодиимидным методом [26]. Для синтеза конъюгата использовали 30 кДа олигомеры хитозана (степень деацетилирования 98.3%, степень полимеризации ~186) производства “Glentham Life Sciences” (Великобритания), кофейную кислоту (КК, “Chem-Impex, Intl Inc.”, США) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (EDC), “Sigma-Aldrich”, (Германия). EDC и КК использовали в соотношении 3 : 1. Конъюгат синтезирован в массовом соотношении Хит-КК = 5 : 1. Синтезированный конъюгат Хит-КК очищали методом диализа с использованием целлюлозной диализной трубки с размером пор 14 кДа (“Sigma D9277-100FT” и “Sigma D9652-100FT”, США) против дистиллированной воды в течение 1 сут. Конъюгат лиофилизировали с помощью лиофильной сушилки Freezone 1.0 “Labconco”, (США) при – 47°C и 0.03 мбар в течение 16 ч и хранили в виде лиофилизата.

Содержание КК в синтезированном конъюгате определяли спектрофотометрически по поглощению в диапазоне 200–400 нм “Specord-50” (Германия). Содержание КК рассчитывали по предварительно построенной калибровочной кривой. Степень присоединения КК к хитозану составила $5.0 \pm 0.6\%$ или 53.8 ± 7.2 мкг/мг хитозана.

Схема эксперимента. Размножение растений картофеля *in vitro* проводили на агаризованной среде MS. Адаптацию полученных пробирочных растений к условиям *ex vitro* проводили в контейнерах на 4 л, по три штуки на вариант, по девять растений на контейнер, на торфяном почвогрунте “Универсальный” (Республика Беларусь) с добавлением минеральных удобрений. Растения выращивали в защищенной от насекомых теплице при температуре 20–21°C, освещенности 12 000 люкс и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) в течение 3 недель. Затем опрыскивали поверхность листьев смесью *B. subtilis* 47 в концентрации 1×10^7 КОЕ и конъюгатом Хит-КК в концентрации 0.025 мг/мл или отдельно только конъюгатом Хит-КК в концентрации 0.025 мг/мл. Инфицирование растений УВК проводили через 3 дня после обработки исследуемыми смесями.

Моделирование водного дефицита. Создание водного дефицита почвы начинали через 3 сут после заражения листьев УВК и продолжали в течение 3 месяцев до появления мини-клубней. Водный дефицит создавали за счет сокращения полива растений (40–45% влажности почвогрунта от наименьшей влагоемкости, после стекания гравитационной воды). В контроле растения выращивали при оптимальной влажности 80–85% от наименьшей влагоемкости торфогрунта. Регулирование

оптимальной влажности торфогрунта и условий водного дефицита проводили весовым методом, а также с помощью влагомера TR 001 (Китай).

Оводненность тканей листьев определяли весовым методом: растительные образцы выдерживали в термостате до постоянного веса при температуре 105°C и высчитывали по формуле: $(a - b) / a \times 100$, где a – сырая масса; b – абсолютно сухая масса.

Выявление УВК методом ИФА. Контроль за накоплением УВК выполняли с помощью метода ИФА “сэндвич-вариант” (методом двойного наслоения антител), тест-системой с пероксидазной ферментативной меткой (Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А. Г. Лорха РАСХН) в строгом соответствии с прилагаемым протоколом проведения анализа. Оптическую плотность продуктов ферментативной реакции измеряли на фотометре ИФА-анализатор В-300 “Витязь” (Беларусь) при $\lambda = 492$ нм.

Для определения степени инфицирования УВК методом ИФА и биохимических исследований через 14 сут после заражения собирали по 2–3 сформированных листа без признаков заболевания в верхнем ярусе над инфицированными листьями с симптомами повреждения.

Биохимические исследования. Количественную оценку биохимических показателей проводили с помощью спектрофотометра “Jasco V-630” (Япония). Содержание белка в экстракте определяли по методу Брэдфорда.

Определение содержания перекиси водорода (H_2O_2). Свежие листья 0.2 г гомогенизировали в 600 мкл 25 мМ Na-фосфатного буфера (рН 6.2) и центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g. Содержание H_2O_2 в растениях определяли с помощью ксиленового оранжевого. Оптическую плотность продукта определяли при 560 нм [27]. Концентрацию H_2O_2 определяли по калибровочной кривой и выражали в мкмоль/г сырой массы.

Определение содержания пролина. Общее содержание пролина определяли по методике Бейтса с соав. с изменениями [28]. Листья массой 0.3 г гомогенизировали в 3%-ной сульфосалициловой кислоте и центрифугировали 15 мин при 12000g. К аликвоте надосадочной жидкости добавляли ледяную уксусную кислоту и нингидриновый реактив в соотношении 1 : 1 : 1 и нагревали 60 мин при 90°C на термошейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин). Оптическую плотность измеряли при длине волны 515 нм. Содержание пролина в каждом образце определяли по калибровочной кривой и выражали в мг/г сырой массы.

Определение общего содержания фенольных соединений. Общее содержание фенольных соединений (ФС) в листьях определяли по методу Фолина-Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси [29]. Листья массой 0.2 г экстрагировали последовательно

дважды в 10 мл 70%-ного этанола в термошейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин) при 90°C в течение 45 мин, полученные экстракты объединяли. Для определения содержания ФС к 0.1 мл экстракта образца добавляли 0.8 мл раствора карбоната натрия и реактив Фолина—Чокальтеу (1 мл), перемешивали встряхиванием и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Измеряли абсорбцию при 765 нм по отношению к реакционной смеси без образца экстракта. Содержание фенольных соединений выражали в мкг-экв. хлорогеновой кислоты в 1 г сырой массы.

Определение активности полифенолоксидазы. Активность полифенолоксидазы (ПФО, ЕС 1.10.3.2) определяли спектрофотометрическим методом, основанном на измерении оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении катехола за определенный промежуток времени согласно Кумар с соавт. [30]. Активность фермента рассчитывали в условных единицах (ΔD_{560}) в мин/мг белка.

Активность общей пероксидазы (ПО, ЕС 1.11.1.7). Активность определяли по методу [31], основанном на окислении субстрата 0.01%-ного уксуснокислого бензидина и 0.3%-ного пероксида водорода. Активность фермента рассчитывали в условных единицах (ΔD_{590}) в мин/мг белка.

Активность супероксиддисмутазы (СОД, ЕС 1.15.1.1) измеряли как описано в работе [32]. Поглощение раствора измеряли при 560 нм. За единицу активности принимали $U = (D_{15} - D_0)/D_0 \times 100\%$, где D_0 — оптическая плотность приготовленной смеси, D_{15} — оптическая плотность через 15 мин. За единицу активности принимали количество фермента, способного ингибировать реакцию восстановления нитросинего тетразолия на 50%. Активность СОД выражали в условных единицах на 1 мг белка.

Активность аскорбатпероксидазы (АПО, ЕС 1.11.1.11) определяли, регистрируя снижение абсорбции при 290 нм в результате окисления аскорбата по методу, приведенному в [33]. За единицу активности АПО принимали количество фермента, которое окисляло 1 нмоль аскорбата в мин на мг белка.

Определение активности глутатионредуктазы. Активность глутатионредуктазы (ГР, ЕС 1.8.1.7) определяли по методике [34]. Кинетику потребления НАДФН регистрировали при 340 нм. Активность фермента рассчитывали по коэффициенту молярной экстинкции, который составляет $6.2 \text{ mM}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. За 1 единицу активности ГР принимали убыль 1 нмоль НАДФН за 1 ч.

Биохимические исследования проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistics 22. Для оценки распределения использовали тест Колмогорова—Смирнова.

Различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты представлены в виде $M \pm CI$ (где M — среднее значение, CI — доверительный интервал). Критический уровень значимости составлял $p < 0.05$. Достоверные различия между вариантами на рисунках и таблицах отмечены разными буквами латинского алфавита, одинаковые буквы на разных столбцах диаграмм и в надстрочных подписях над значениями в таблицах обозначают отсутствие достоверных различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что многие соединения хитозана обладают антимикробной активностью и при включении в бактериальные культуральные среды могут ингибировать рост бактерий [14, 21]. В связи с этим изучена антибактериальная активность конъюгата Хит-КК по отношению к штамму *B. subtilis* 47 для оценки совместимости компонентов смеси. Антибактериальную активность соединения оценивали по образованию зон ингибирования роста бактерий. Установлено, что в концентрациях от 0.0125 мг/мл до 0.05 мг/мл (диски 2, 3, 4) конъюгат Хит-КК и отдельно хитозан в концентрации 0.1 мг/мл (диск 5) не проявляют антимикробной активности к штамму *B. subtilis* 47, так как вокруг зон нанесения конъюгата и хитозана не наблюдалось ингибирования роста бактерий (рис. 1).

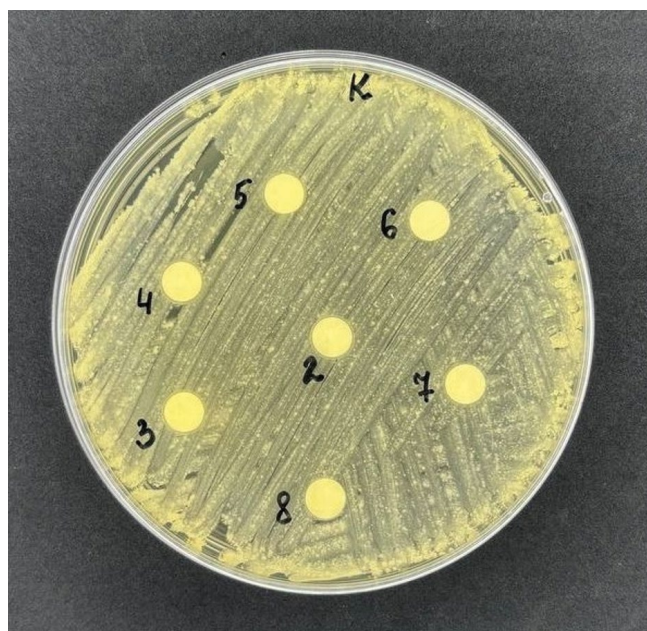


Рис. 1. Результаты оценки антибактериальной активности Хит-КК и хитозана в отношении штамма *Bacillus subtilis* 47: К — штамм *Bacillus subtilis* 47 (Кар-фил); 2 — Хит-КК 0.0125 мг/мл; 3 — Хит-КК 0.025 мг/мл; 4 — Хит-КК 0.05 мг/мл; 5 — хитозан 0.1 мг/мл; 6, 7, 8 — нанокмпозиты на основе хитозана.

Вирусные заболевания и недостаток влаги в почве являются одними из основных проблем, вызывающих потерю урожайности и ухудшение качества картофеля. Использование бактерий рода *Bacillus*, повышающих засухоустойчивость растений, и модифицированного хитозана, способного усиливать и модулировать иммунный ответ растений на вирусные инфекции, является возможным решением обозначенных проблем.

Результаты ИФА продемонстрировали, что обработка растений конъюгатом Хит-КК снижала степень инфицирования листьев картофеля на $24 \pm 2,0\%$ и $17 \pm 0,9\%$ в условиях оптимального и недостаточного увлажнения почвы соответственно. Совместная обработка Хит-КК и *B. subtilis* 47 не влияла на степень инфицирования растений УВК при оптимальном увлажнении, но в условиях дефицита влаги применение Хит-КК совместно с *B. subtilis* 47 снижало уровень заражения на 9.1% (рис. 2).

Влияние вирусного заражения и водного стресса на водный обмен было оценено по показателю оводненности тканей. Содержание воды в листьях незначительно снижалось при водном почвенном дефиците или заражении растений УВК. Комбинированный стресс вызвал уменьшение содержания воды в тканях листьев картофеля на 6% по сравнению с контрольными растениями в оптимальных условиях увлажнения. У растений, обработанных Хит-КК, содержание воды не отличалось от контрольных во всех условиях опыта. Обработка смесью Хит-КК + *B. subtilis* 47 в условиях водного дефицита, особенно при инфицировании, приводила к максимальному в эксперименте (на 9% по отношению к оптимальному контролю) снижению оводненности в тканях (табл. 1).

Накопление пролина – важный показатель состояния растений при действии осмотического стресса. Дополнительный синтез этой аминокислоты повышает общую устойчивость растений к абиотическим стрессам. Существуют свидетельства, что пролин может выступать в качестве метаболического сигнала, регулирующего окислительно-восстановительный гомеостаз и экспрессию некоторых генов стрессового ответа [35]. Показано, что инокуляция растений эндофитными штаммами *B. subtilis* приводила к накоплению пролина [20].

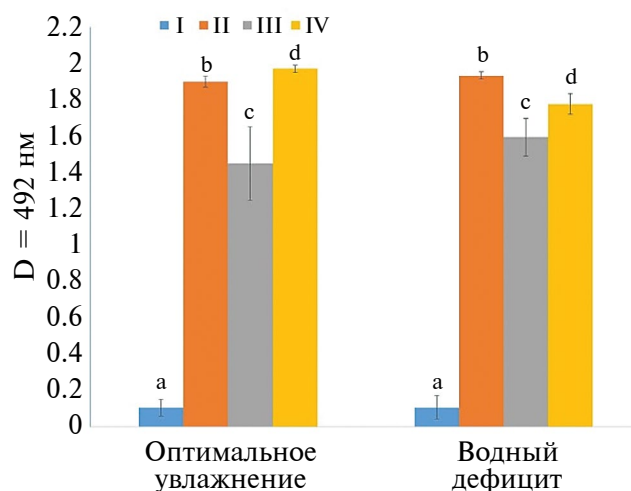


Рис. 2. Степень инфицирования УВК листьев картофеля без обработки (II), после обработки Хит-КК (III) и смесью Хит-КК и *B. subtilis* 47 (IV): I – контроль – незараженные растения.

Как показали эксперименты, применение Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 увеличивало содержание пролина в среднем на $14 \pm 0.7\%$ по отношению к контрольным растениям в оптимальных условиях увлажнения и на $25.4 \pm 1.4\%$ и $62.6 \pm 5\%$ соответственно при дефиците почвенной влаги. Заражение растений УВК при нормальной влажности почвы приводило к увеличению содержания пролина, но в обработанных Хит-КК и инфицированных растениях его количество оставалось на уровне здоровых растений. На фоне дефицита почвенной влаги инфицирование УВК увеличивало накопление пролина в 2.1 раза. При этом выявлено снижение содержания пролина в обработанных Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 растениях при инфицировании УВК на 15.5% и 11.5% соответственно по сравнению с контрольными растениями (рис. 3а).

Обработки Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 повышали содержание фенольных соединений (ФС) в здоровых растениях на 13.2–13.6% и увеличивали активность ПФО на 9.2% и 17.9% по сравнению с контролем в оптимальных условиях увлажнения. При недостатке влаги содержание ФС в обработанных Хит-КК оставалось на уровне контрольных

Таблица 1. Влияние УВК и смеси Хит-КК+*B. subtilis* 47 на оводненность (%) тканей листьев картофеля при оптимальных условиях увлажнения и водном дефиците в почве

Показатель	Здоровые растения		Инфицированные УВК растения	
	оптимальное увлажнение	водный дефицит	оптимальное увлажнение	водный дефицит
Контроль	88.6 ± 0.75^a	86.3 ± 0.72^b	86.2 ± 1.14^b	83.3 ± 1.05^d
Хит-КК	88.3 ± 0.57^a	86.5 ± 0.98^{bc}	86.3 ± 0.49^b	81.9 ± 1.12^{dc}
Хит-КК+ <i>B.subtilis</i> 47	87.8 ± 0.72^{ac}	84.0 ± 1.01^d	85.7 ± 0.43^b	80.7 ± 1.44^e

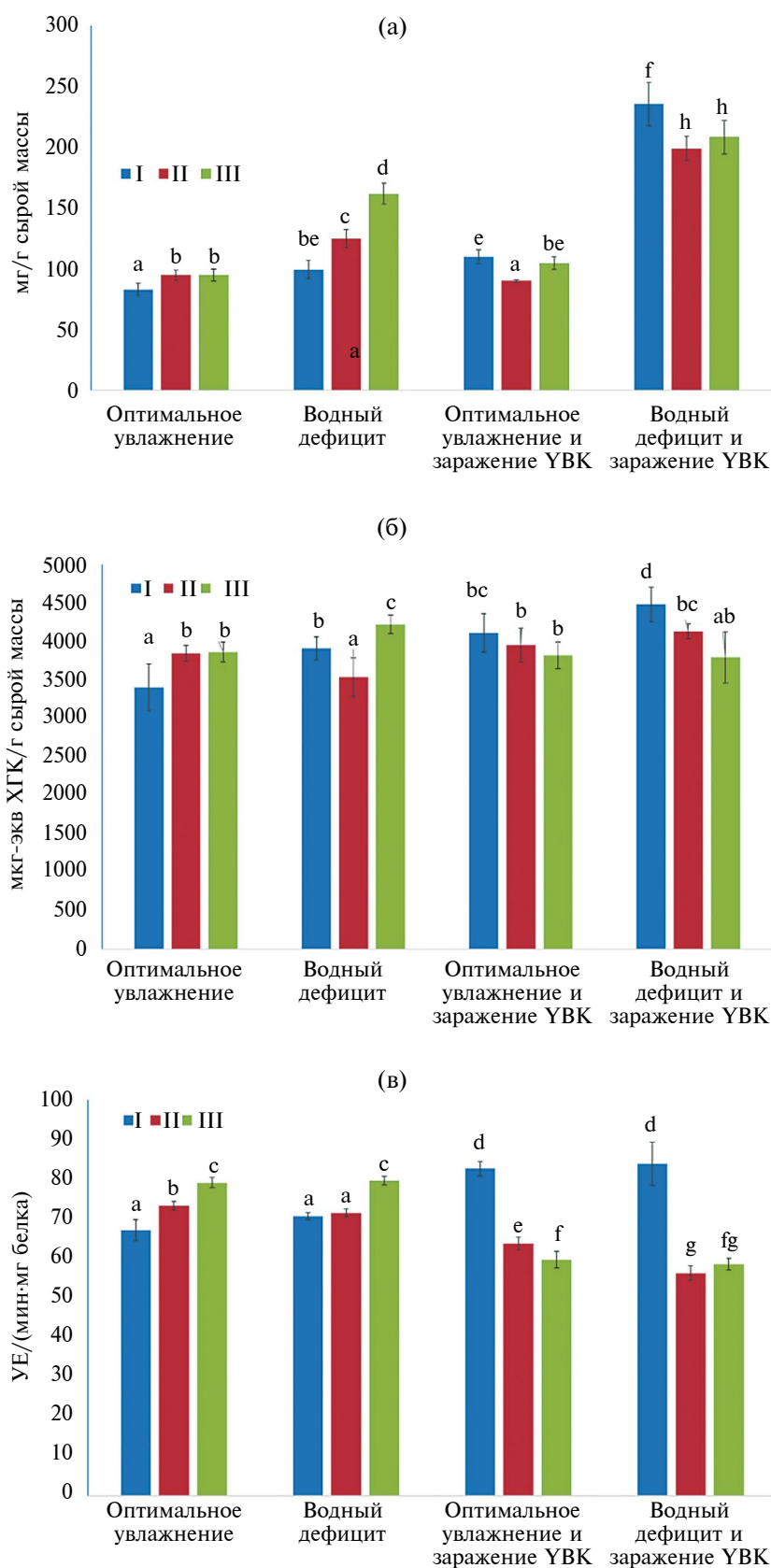


Рис. 3. Влияние обработок (I–III) на содержание пролина (а), содержание фенольных соединений (б) и активность ПФО (в) в листьях здоровых и зараженных YBK растений картофеля в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците в почве: I – контроль; II – обработка Хит-КК; III – обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47.

растений с оптимальным увлажнением, а в варианте Хит-КК + *B. subtilis* 47 содержание ФС увеличились на $9.5 \pm 0.6\%$ и отмечен рост активности ПФО по сравнению необработанными растениями. Заражение УВК как при оптимальном увлажнении, так и в условиях водного дефицита, привело к значительному увеличению содержания ФС и активации ПФО, но под влиянием Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 содержание ФС снижалось. Так, на фоне водного стресса в обработанных Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 и зараженных УВК листьях, уровень ФС был на 7,8 и 15,4% ниже по сравнению с необработанным контролем (рис. 3б), а активность ПФО снизилась на 23–28% при применении Хит-КК и 30–32% при использовании смеси (рис. 3в).

Накопление низкомолекулярных полифункциональных соединений, таких как пролин и фенольные соединения, активация ПФО при обработке здоровых растений картофеля при оптимальных условиях почвенного увлажнения позволяет предположить, что Хит-КК и смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 могут играть роль сигнальных соединений, мобилизирующих защитные системы и повышающих неспецифическую устойчивость. Индукция у растений реакций устойчивости, вызванная Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47, обуславливает впоследствии антистрессовый эффект и снижение негативного влияния совместного воздействия патогена и засухи, что отражается в снижении активированных стрессом синтеза пролина и фенольных соединений в обработанных растениях.

Учитывая, что формирование защитного ответа на инфицирование определяется на ранних этапах патогенеза, важно выяснить влияние производных хитозана в комплексе с бактериями *B. subtilis* 47 на состояние про-/антиоксидантной системы растений. Известно, что хитин, хитозан и их олигомеры являются активными элиситорами иммунитета растений, в том числе, за счет регуляции редокс-статуса растительных клеток [36, 37]. Производные гидроксикоричной кислоты обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами [30], снижая образование активных форм кислорода за счет нейтрализации свободных радикалов [38] и активации антиоксидантных ферментов [39]. Ранее было показано, что пришивка фенольной кислоты усиливает антиоксидантную и антибактериальную активность в конъюгации с хитозаном [40]. Способность *B. subtilis* самостоятельно активировать некоторые антиоксидантные ферменты, снижать содержание малонового диальдегида (МДА) и H_2O_2 показана в работе [41].

Обработка конъюгатом Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 в оптимальных условиях увлажнения приводила к снижению содержания пероксида водорода на 9% в здоровых растениях картофеля. Обработка смесью бактерий с конъюгатом Хит-КК в

условиях дефицита влаги в почве приводила к достоверному снижению содержания H_2O_2 на 17,5%. Заражение растений УВК вызывало снижение уровня H_2O_2 у растений, выращенных при оптимальной (на 24%) и недостаточной влажности почвы (на 38%), по сравнению с контрольными растениями. Конъюгат Хит-КК не изменял содержание пероксида, а смесь вызвала его снижение на 23,7% по сравнению с инфицированным контролем. У растений, испытывающих водный стресс и заражение УВК, обработка конъюгатом Хит-КК увеличивала содержание H_2O_2 на 20,2%, а обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47 не вызвала изменений по сравнению с инфицированным контролем (рис. 4а).

Изменение концентрации H_2O_2 в тканях растений в процессе патогенеза может происходить в результате многих метаболических процессов, но в большей степени это происходит в результате изменения активности антиоксидантных ферментов [42].

Одним из важных ферментов антиоксидантной системы растений, участвующих в утилизации АФК, является СОД. Эффективное функционирование СОД во многом определяется функционированием других компонентов защитных систем, в частности, утилизирующих пероксид водорода (каталазы, пероксидазы, ферментов аскорбат-глутатионового цикла).

Применение Хит-КК не изменило активность СОД, но активность фермента снизилась у здоровых растений, обработанных Хит-КК + *B. subtilis* 47 в оптимальных условиях влажности почвы. Водный дефицит вызывал снижение активности СОД у необработанных растений, однако обработка Хит-КК и особенно Хит-КК + *B. subtilis* 47 активировали СОД у здоровых растений. Заражение растений УВК при оптимальном увлажнении и при водном дефиците незначительно снижало активность СОД у растений, обработанных Хит-КК по сравнению с соответствующим контролем. Смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 значительно снижала активность СОД по сравнению с инфицированными контрольными растениями при оптимальном увлажнении и не изменяла активности СОД в сравнении с применением Хит-КК и инфицированными растениями в условиях водного дефицита (рис. 4б).

При применении Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 активность ПО снизилась у здоровых растений в оптимальных условиях увлажнения. Водный дефицит вызывал снижение активности у необработанных растений, но Хит-КК и особенно Хит-КК + *B. subtilis* 47 активировали ПО у здоровых растений в данных условиях выращивания.

Заражение растений УВК при оптимальном увлажнении снизило активность ПО по сравнению со здоровыми растениями. Применение Хит-КК активировало ПО на 26,5%, Хит-КК + *B. subtilis* 47 значительно снижали активность ПО как по сравнению с инфицированными контрольными, так и здоровыми растениями. Активность ПО не

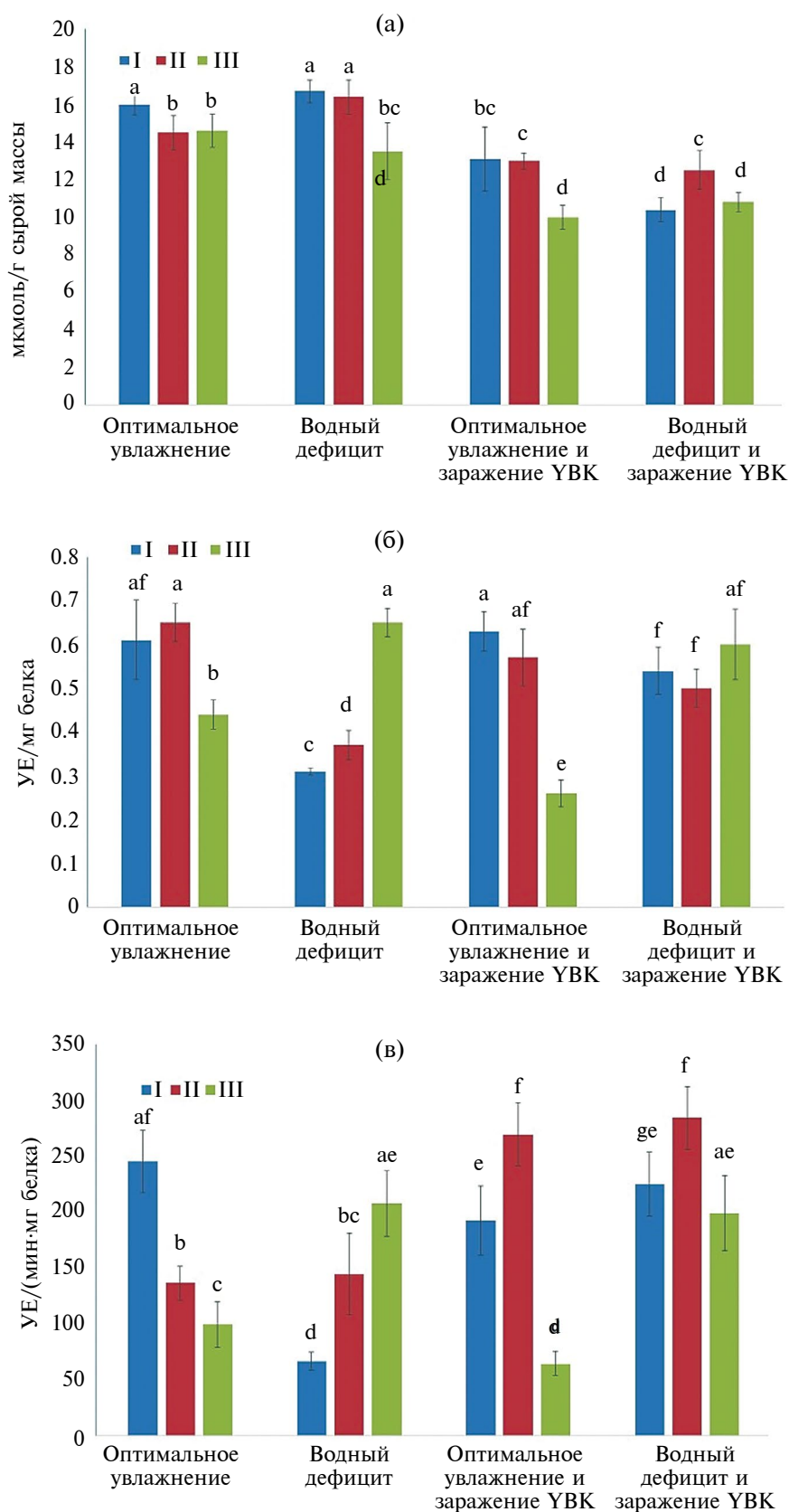


Рис. 4. Влияние обработок (I–IV) на содержание пероксида водорода (а), активность СОД (б) и активность пероксидазы (в) в листьях здоровых и зараженных YBK растений картофеля в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците в почве: I – контроль; II – обработка Хит-КК; III – обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47.

изменилась у инфицированных необработанных растений в условиях водного дефицита, но увеличивалась при воздействии Хит-КК на инфицированные растения. Применение смеси бактерий и Хит-КК снижало активность ПО в сравнении с применением Хит-КК и инфицированными растениями в условиях водного дефицита (рис. 4в).

Обработка Хит-КК снижала активность АПО и ГР у здоровых растений в оптимальных условиях увлажнения, а смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47, напротив, повышала активность ГР и АПО. Недостаточное почвенное влагообеспечение вызывало повышение активности ГР и снижение активности АПО у неинфицированных растений. Обе обработки снижали

активность АПО, Хит-КК повышал активность ГР, а Хит-КК + *B. subtilis* 47 не оказывали существенного влияния на эти показатели при водном дефиците. Инфицирование растений значительно повышало активность АПО и ГР по сравнению со здоровыми растениями как в оптимальных, так и в стрессовых условиях. Применение Хит-КК повышало активность АПО и ГР на 27,2% и в 2,3 раза соответственно относительно инфицированного контроля, но Хит-КК + *B. subtilis* 47 значительно снижали эти показатели. В условиях вирусного заражения и водного дефицита в случае применения Хит-КК выявлена тенденция к снижению АПО и ГР, а смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 снижала АПО, но увеличивала ГР (рис. 5а, б).

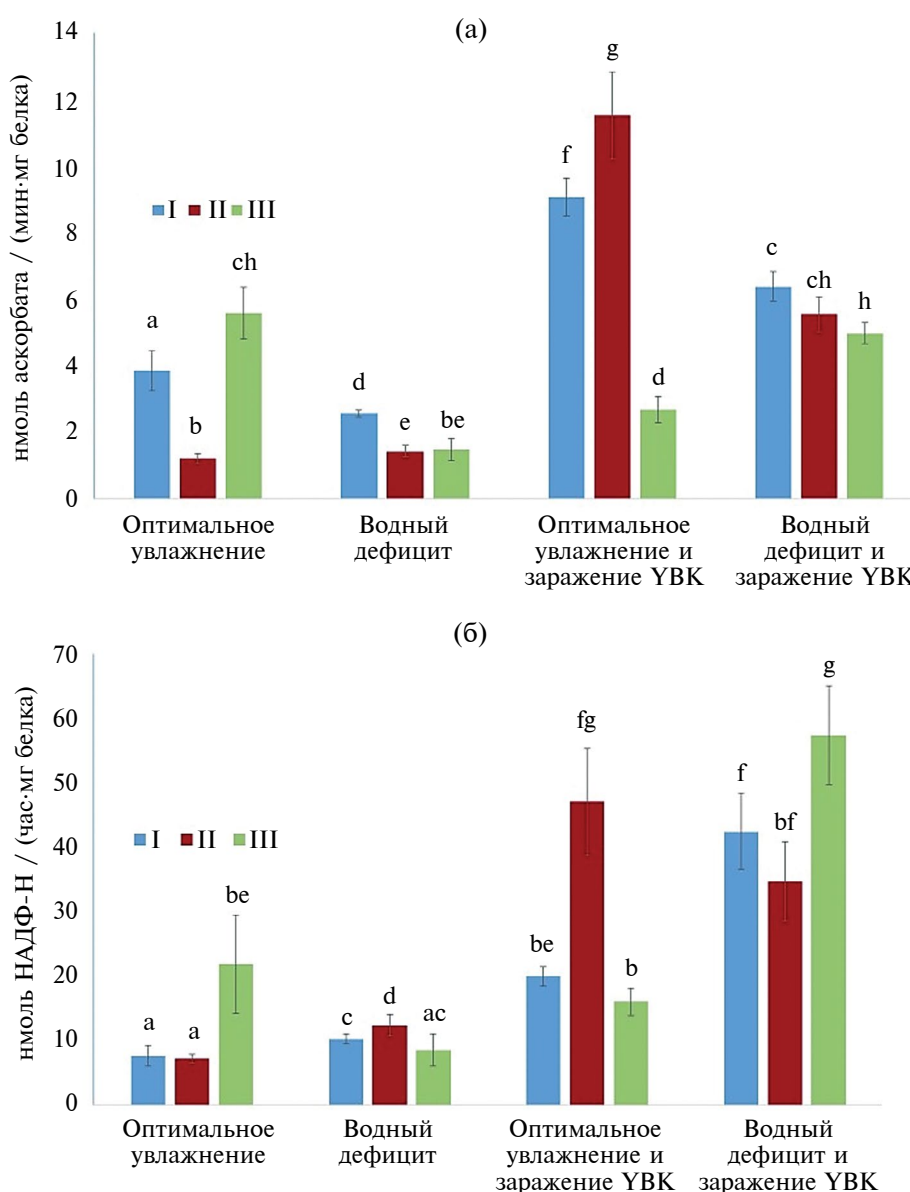


Рис. 5. Влияние обработок (I–III) на активность АПО (а) и ГР (б) в листьях здоровых и зараженных YBK растений картофеля в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците в почве: I — контроль; II — обработка Хит-КК; III — обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47.

Таким образом, в условиях водного дефицита уровень пероксида водорода не изменился у здоровых растений, обработанных конъюгатом Хит-КК, но был заметно ниже у растений, обработанных Хит-КК + *B. subtilis* 47 (рис. 4а), что сопровождалось накоплением пролина и ФС, активацией СОД, ПО, ПФО, но снижением активности АПО.

Через 14 дней после заражения в ярусе листьев растений, расположенном над инокулированными УВК листьями, была установлена положительная реакция на вирус. В листьях регистрировали снижение уровня пероксида водорода по сравнению со здоровыми растениями. Максимальное снижение наблюдалось у растений, подвергшихся комбинированному стрессу, но отмечено значительное накопление низкомолекулярных антиоксидантов и повышение активности ПФО, АПО и ГР было показано как при оптимальном почвенном увлажнении, так и в условиях водного дефицита (рис. 3–5).

Обнаруженное сниженное содержание титра вируса при обработке растений Хит-КК в инфицированных листьях картофеля на 23.7 и 16.3% (рис. 2) в условиях оптимального увлажнения и дефицита влаги в почве соответственно сопровождалось поддержанием пероксида водорода на уровне зараженного контроля в оптимальных условиях или повышением на 20,2% при комбинированном стрессе (рис. 4а). При этом активность СОД оставалась на уровне контроля (рис. 4б), но определяемая активность ПО была выше значений соответствующего контроля (рис. 4в). Авторы [43, 44] указывают, что мобильные формы пероксидаз могут функционировать не только как H_2O_2 -скавенджеры, но и могут катализировать образование АФК, способствующих запуску окислительного стресса при формировании СПУ на воздействие неблагоприятного фактора. Активность АПО и ГР увеличивалась (рис. 5а, б) в зараженных листьях при обработке Хит-КК в оптимальных условиях увлажнения, но в случае комбинированного стресса АПО

и ГР оставались на уровне соответствующего контроля (рис. 5а, б).

В настоящем исследовании смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 была менее эффективна по сравнению с Хит-КК и снижала степень заражения только при дефиците влаги в почве. Обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47 снижала уровень пероксида водорода в зараженных листьях в оптимальных условиях увлажнения, но его значения оставались на уровне соответствующего контроля у обработанных растений, подвергшихся водному дефициту. Смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 в отличие от контроля и обработки только Хит-КК значительно ингибировала активность антиоксидантных ферментов в зараженных растениях при оптимальном увлажнении. Вероятно, низкое содержание пероксида водорода и, вероятно, связанное с этим уменьшение активности СОД, ПО и ферментов аскорбат-глутатионового цикла при воздействии Хит-КК + *B. subtilis* 47 вызвано синергетическим антистрессовым эффектом смеси, ингибирующим образование АФК. Однако снижение H_2O_2 и активности ферментов коррелировало с отсутствием устойчивости у таких растений к вирусному патогену.

Продуктивность обработанных растений картофеля определяли по массе и количеству мини-клубней, полученных в 1 контейнере (табл. 2).

Максимальное количество мини-клубней и их общей массы были получены при обработке растений конъюгатом Хит-КК: увеличение составило 24.1–24.5% и 13.3–13.8% по сравнению с контролем в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците соответственно. При применении смеси Хит-КК с *B. subtilis* 47 наблюдалась тенденция к увеличению продуктивности, но достоверных различий не установлено. Применение конъюгата Хит-КК на зараженных растениях в оптимальных условиях увлажнения увеличивало массу мини-клубней, но не их количество. Напротив, смесь конъюгата Хит-КК с бактериями

Таблица 2. Влияние УВК и смеси Хит-КК + *B. subtilis* 47 на массу и количество мини-клубней, полученных при оптимальном увлажнении почвы и водном дефиците

Вариант опыта	Здоровые растения		Инфицированные УВК растения	
	оптимальное увлажнение	водный дефицит	оптимальное увлажнение	водный дефицит
Масса мини-клубней, г/ контейнер				
Контроль	151.9 ± 8,9 ^a	62.1 ± 0,9 ^c	138.8 ± 2,7 ^c	64.8 ± 2,61 ^c
Хит-КК	188.5 ± 10,4 ^b	73.4 ± 1,8 ^d	155.5 ± 2,4 ^a	55.1 ± 3,03 ^g
Хит-КК + <i>B. subtilis</i> 47	161.8 ± 9,9 ^a	69.6 ± 4,0 ^d	110.4 ± 7,1 ^f	57.5 ± 3,71 ^g
Количество мини-клубней, шт./ контейнер				
Контроль	37.5 ± 1.5 ^a	39.0 ± 0.60 ^a	35.0 ± 2.0 ^{ad}	32.7 ± 0.9 ^d
Хит-КК	42.5 ± 1.5 ^{bc}	44.0 ± 0.6 ^c	37.7 ± 1.2 ^a	31.3 ± 0.9 ^d
Хит-КК + <i>B. subtilis</i> 47	39.0 ± 1.6 ^a	36.3 ± 1.9 ^a	40.7 ± 1.5 ^{ab}	28.7 ± 1.3 ^c

увеличивала количество мини-клубней, но снижала их массу. При комбинированном стрессе обработка конъюгатом Хит-КК как отдельно, так и в смеси с *B. subtilis* 47 снижала продуктивность мини-клубней картофеля.

Таким образом, обнаружено, что применение Хит-КК значительно снижало уровень инфицированности УБК растений картофеля, выращенных в оптимальных условиях увлажнения и условиях дефицита влаги в почве и способствовало увеличению массы мини-клубней картофеля при оптимальном увлажнении. Поддержание выработки пероксида водорода, изменение уровня пролина и фенольных соединений и активация пероксидазы и ферментов аскорбат-глутатионового цикла под действием Хит-КК может быть решающим фактором поддержания устойчивости растений картофеля к У вирусу. Смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 в исследуемой концентрации не обеспечивала эффективного подавления У-вирусной инфекции в листьях картофеля в условиях оптимальной влажности почвы, что, вероятно, обусловлено низкой активностью компонентов антиоксидантной системы. Она вызывала снижение продуктивности мини-клубней в изучаемых условиях выращивания. Выращивание зараженных растений в условиях водного дефицита приводило к снижению уровня АФК, в то время как обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47 минимизировала развитие УБК, вызывая адаптационные изменения в прооксидантно-антиоксидантном равновесии растительной клетки.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ. Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saeed Q., Xiukang W., Haider F.U., Kučerik J., Mumtaz M.Z., Holatko J., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 10529. <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>
2. Vilvert E., Stridh L., Andersson B., Olson Å., Aldén L., Berlin A. // Environmental Evidence. 2022. V. 11. № 6. P. 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13750-022-00259-x>
3. Ramegowda V., Senthil-Kumar M. // J. Plant Physiol. 2015. V. 176. P. 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>
4. Zhang H., Sonnewald U. // The Plant Journal. 2017. V. 90. P. 839–855. <https://doi.org/10.1111/tpj.13557>
5. Hamooh B.T., Sattar F.A., Wellman G., Mousa M.A.A. // Plants. 2021. V. 10. P. 98. <https://doi.org/10.3390/plants10010098>
6. Rubio L., Galipienso L., Ferriol I. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1092. <https://doi.org/doi:10.3389/fpls.2020.01092>
7. Jones R.A. // Plants. 2021. V. 10. P. 233. <https://doi.org/10.3390/plants10020233>
8. Riseh R.S., Hassanisaadi M., Vatankhah M., Babaki S.A., Barka E.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 220. P. 998–1009. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.109>
9. Shah A., Nazari M., Antar M., Msimbira L.A., Naamala J., Lyu D., et al. // Front. Sustain. Food Syst. 2021. V. 5. P. 667546. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>
10. Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M., SkZ A. // Microbiological Research. 2016. V. 184. P. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
11. Maksimov I.V., Abizgil'dina R.R., Pusenkova L.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 4. P. 333–345. <https://doi.org/10.1134/S0003683811040090>
12. Miljaković D., Marinković J., Balešević-Tubić S. // Microorganisms. 2020. V. 8. № 7. P. 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
13. Yarullina L.G., Kalatskaja J.N., Cherepanova E.A., Yalousskaya N.A., Tsvetkov V.O., Ovchinnikov I.A., et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. № 5. P. 549–560. <https://doi.org/10.1134/s0003683823050186>
14. Maksimov I.V., Singh B.P., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Khairullin R.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 1. P. 15–28. <https://doi.org/10.1134/s0003683820010135>
15. Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Cherepanova E.A., Alekseev V.Y., et al. // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 288. <https://doi.org/doi:10.3390/biom12020288>
16. Amine R., Tarek C., Hassane E., Nouredine E.H., Khadija O. // Molecules. 2021. V. 26. № 4. P. 1117. <https://doi.org/10.3390/molecules26041117>
17. Chirkov S.N. // Appl. Biochem. Microbiol. 2002. V. 38. № 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1023/A:1013206517442>
18. He X., Xing R., Liu S., Qin Y., Li K., Yu H., Li P. // Drug and Chemical Toxicology. 2019. V. 44. № 4. P. 335–340.
19. Novikova I.I., Popova E.V., Krasnobaeva I.L., Kovalenko N.M. // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya (Agricultural Biology). 2021. V. 56. P. 511–522.
20. Yarullina L.G., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Sorokan A.V., Zaikina E.A., Tsvetkov V.O., et al. // Microorganisms. 2023. V. 11. № 8. P. 1993. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081993>

21. Dutta J., Tripathi S., Dutta P.K. // Food Science and Technology International. 2012. V.18. №1. P.3–34. <https://doi.org/doi:10.1177/1082013211399195>
22. Kumar S., Abedin M.M., Singh A.K., Das S. // Plant Phenolics in Sustainable Agriculture. 2020. V. 1. P. 517–532. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22
23. İlyasoğlu H., Guo Z. // Food Bioscience. 2019. V. 29. P. 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.007>
24. Nedved E.L., Kalatskaja J.N., Ovchinnikov I.A., Rybinskaya E.I., Kraskouski A.N., Nikalaichuk V.V., et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 1. P. 69–76. <https://doi.org/10.1134/s0003683822010069>
25. Nikalaichuk V., Hileuskaya K., Kraskouski A., Kulikouskaya V., Nedved H., Kalatskaja J., et al. // J. Appl. Polym. Sci. 2021. V. 139. № 14. P. 51884. <https://doi.org/10.1002/app.51884>
26. Tenover F.C. // Eds Th. M. Schmidt. Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. 2019. P. 166–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02486-7>
27. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. // New Phytol. 2001. V. 151. P. 185–194.
28. Bates L.S., Waldren R.P., Teare J.D. // Plant and Soil. 1973. V. 39. № 1. P. 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
29. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. // Methods in Enzymology. 1999. V. 299. P. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
30. Kumar V.B.A., Kishor T.C.M., Murugan K. // Food Chemistry. 2008. V. 110 № 2. P. 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.006>
31. Boyarkin A.N. Determination of Peroxidase Activity. / Ed. A.L. Ermakov, Leningrad: Kolos, 1987. P. 41–43.
32. Beyer W.F., Fridovich I. // Anal. Biochem. 1987. V. 161. № 2. P. 559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
33. Nakano Y. Asada K. // Plant Cell Physiol. 1981. V. 22. № 5. P. 867 – 880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
34. Aono M., Kubo A., Saji H. // Plant Cell Physiol. 1991. V. 32. № 5. P. 691–697. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078132>
35. Тарчевский И.А., Егорова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 4. С. 315–329. <https://doi.org/10.31857/s055510992204016x>
36. Jia X., Rajib M., Yin H. // Current Pharmaceutical Design. 2020. V. 26. № 29. P. 3508–3521. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200617165915>
37. Chakraborty M., Hasanuzzaman M., Rahman M., Khan Md., Bhowmik P., Mahmud N.U., et. al. // Agriculture. 2020. V. 10. № 12. P. 624. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
38. Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J.L., Reis S., Borges F. // Free Radic. Res. 2006. V. 40. P. 433–442. <https://doi.org/10.1080/10715760500540442>
39. Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L. // Plant Sci. 2001. V. 160. P. 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2)
40. Yang X., Lan W., Lu M., Wang Z., Xie J. // LWT. 2022. V. 170. P. 114072. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114072>
41. Maslennikova D., Lastochkina O. // Plants. 2021. V.10. № 12. P. 2557. <https://doi.org/10.3390/plants10122557>
42. Smirnoff N., Arnaud D. // New Phytologist. 2019. V. 221. № 3. P. 1197–1214. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>
43. Минибаяева Ф.В., Гордон Л.Х. // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 3. С. 459–464.
44. Hernández J.A., Gullner G., Clemente-Moreno M.J., Künstler A., Juhász C., Díaz-Vivancos P., et.al. // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2016. V. 94. P. 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2015.09.001>

Effect of Chitosan-Caffeic Acid Conjugate and *Bacillus subtilis* Bacteria on the Protective Reactions in PVY-Infected Plants Under Soil Water Deficit

J. N. Kalatskaja^{a, *}, L. G. Yarullina^b, N. A. Yalousskaya^a, G. F. Burkhanova^b,
E. I. Rybinskaya^a, E. A. Zaikina^b, I. A. Ovchinnikov^a, V. O. Tsvetkov^c, K. M. Herasimovich^a,
E. A. Cherepanova^b, O. A. Ivanov^a, K. S. Hileuskaya^d, and V. V. Nikalaichuk^d

^a*V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, 220072 Republic of Belarus*

^b*Institute of Biochemistry and genetics - separate structural subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^c*Ufa University of Science and Technology, Ufa, 450076 Russia*

^d*Institute of Chemistry of New Materials, the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, 220141 Republic of Belarus*

**e-mail: kalatskayaj@mail.ru*

The effect of chitosan-caffeic acid (**Ch-CA**) conjugate separately and in combination with a mixture of *Bacillus subtilis* 47 on the plant defense against PVY under optimal hydration and water deficit in soil was evaluated. The treatments of Ch-CA and Ch-CA+*B. subtilis* 47 on healthy potato plants under optimal soil moisture conditions demonstrated the accumulation of proline and phenolic compounds, as well as the activation of PPO, which collectively led to an increase in the nonspecific plant defenses. The application of Ch-CA resulted in a reduction of PVY infection in potato plants grown under both optimal and soil moisture-deficient conditions and led to an increase the potato mini-tuber's mass. The combination of *B. subtilis* 47 and Ch-CA proved effective in reducing the infection level exclusively under conditions of soil water deficit. It has been demonstrated that the primary factor influencing the development of resistance in potato plants to PVY under moisture-limiting conditions is associated with an elevated peroxidase activity and alterations in antioxidant activity within plant tissues.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., Potato virus Y (PVY), *Bacillus subtilis* 47, conjugate, caffeic acid, soil water deficiency, pro-/antioxidant system, productivity of mini-tubers