

УДК 632.9:57.021

## ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ САЛИЦИЛАТА ХИТОЗАНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОПРЕПАРАТА ВИТАПЛАН В ОТНОШЕНИИ *Cochliobolus sativus*

© 2022 г. И. И. Новикова<sup>1</sup> \*, Э. В. Попова<sup>1</sup>, И. Л. Краснобаева<sup>1</sup>, Н. М. Коваленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений” (ВИЗР),  
Пушкин, Санкт-Петербург, 196608 Россия

\*e-mail: irina\_novikova@inbox.ru

Поступила в редакцию 25.08.2021 г.

После доработки 22.10.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Изучена возможность повышения биологической эффективности биопрепарата Витаплан путем включения в состав салицилата хитозана как индуктора болезнестойчивости растений против темно-бурой пятнистости пшеницы. Установлено, что добавление салицилата хитозана в концентрации 0.1% в среду для глубинного культивирования штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D (компонентов препарата Витаплан), а также к препарату Витаплан увеличивало его защитный эффект в патосистеме пшеница — *Cochliobolus sativus* в 1.5–2 раза. Повышенная биологическая активность новых форм препарата Витаплан, по-видимому, является результатом сочетания фунгицидной активности биопрепарата и индукции защитных реакций растения салицилатом хитозана.

**Ключевые слова:** биопрепарат Витаплан, фунгистатическая активность, антагонистический эффект, салицилат хитозана, индуцированная устойчивость, пшеница, темно-бурая пятнистость

**DOI:** 10.31857/S0555109922030102

Одна из актуальных задач сельского хозяйства — разработка эффективных средств и способов снижения потерь урожая от болезней сельскохозяйственных культур. При этом требования к безопасности применяемых средств защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов — возбудителей болезней постоянно увеличиваются. В настоящее время особое внимание уделяется наиболее перспективному и экологически безопасному направлению в защите растений, связанному с использованием препаратов элиситорного действия, повышающих неспецифическую устойчивость растений к фитопатогенам. К числу таких препаратов относится хитозан и препараты на его основе, которые широко используют в защите растений от болезней в качестве индукторов болезнестойчивости [1–3].

Не меньшее внимание в последние годы уделяется разработке полифункциональных биопрепаратов на основе эндофитных штаммов бактерий или микромицетов, снижающих численность популяций фитопатогенных видов. Механизмы действия таких препаратов связаны не только с синтезом различных метаболитов, обладающих прямой антагонистической активностью, но и с запуском системной индуцированной устойчивости вслед-

ствие образования штаммами-продуцентами гормонов, таких, как салициловая кислота (СК), абсцизовая, жасмоновая кислоты, этилен, а также циклических липопептидов [4–8].

В настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом наиболее широко применяют биопрепараты на основе штаммов *Bacillus subtilis* Cohn. [9–11]. Целый ряд препаративных форм на основе отобранных высокоактивных штаммов этого вида разработаны в ВИЗР: Алирин-Б, Гамаир, Витаплан. Полифункциональные биопрепараты на основе штаммов микробов-антагонистов практически не уступают по эффективности химическим фунгицидам, обладая по сравнению с ними целым рядом преимуществ: отсутствием формирования резистентности у фитопатогенных видов, безопасностью для полезной энтомофауны, низкой токсичностью в отношении теплокровных и человека, и способностью длительно контролировать численность фитопатогенов после интродукции в агробиотенос. Для повышения биологической эффективности биопрепаратов заслуживает внимания подход, позволяющий увеличивать способность штаммов-продуцентов запускать каскад защитных реакций и повышать системную устойчивость растений.

В этой связи для усиления биологической активности биопрепарата Витаплан целесообразным представляется включение в его препаративную форму соединений, проявляющих свойства индукторов болезнеустойчивости, которые повышают неспецифический иммунитет растений к биогенным стрессам. Природный полисахарид хитозан — наиболее подходящий кандидат в качестве такого индуктора болезнеустойчивости.

На основании представления о том, что биологическая активность природных полисахаридов определяется их способностью индуцировать биохимические пути, приводящие к активации реакций защиты растений и формированию у них устойчивости к грибным, бактериальным и вирусным болезням можно предположить, что хитозан и его производные будут включать (отдельно или в комбинации с бактериальными клетками) системную устойчивость к фитопатогенам. Это нашло подтверждение в ряде работ, в которых было установлено, что добавление хитозана к микробам-антагонистам повышало эффективность биоагентов в защите овощных культур и клубники от мучнистой росы [12].

Хитозан и препараты на его основе широко используются в защите растений от болезней в качестве индукторов неспецифической устойчивости [1, 2]. Отдельного внимания заслуживают соединения, которыми проводится модификация хитозана, таких, как салициловая кислота, представляющая собой классический индуктор устойчивости растений к болезням, играющий центральную роль в защите растений от биотрофных патогенов [13]. Высокая индуцирующая активность салицилата хитозана по отношению к бурой ржавчине и темно-бурой пятнистости пшеницы была установлена ранее [14].

Цель работы — изучение возможности повышения эффективности биопрепарата Витаплан против темно-бурой пятнистости пшеницы путем включения в его состав салицилата хитозана как индуктора болезнеустойчивости.

## МЕТОДИКА

Работу проводили с использованием яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29. Для заражения использовали гриб *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechs. Ex Dastur (конидиальная стадия *Bipolaris sorokiniana* Sacc. In Sorok., Shoem.), вызывающий одну из наиболее вредоносных болезней пшеницы — темно-бурую листовую пятнистость, из “Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей” Центра коллективного пользования научным оборудованием “Инновационные технологии защиты растений” ВИЗР.

В экспериментах использовали штаммы-антагонисты *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D и фитопатогенные микроорганизмы из Государственной коллекции микроорганизмов ВИЗР. Культивирование штаммов проводили в течение 72 ч на питательной среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт 30, меласса 15, рН — 7.2, в колбах объемом 750 мл с 100 мл среды на лабораторной качалке при 28°C и 220 об./мин.

Биопрепарат Витаплан СП (смачивающийся порошок), разработанный в ВИЗР, и включенный в “Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения на территории РФ”, предназначен для защиты основных сельскохозяйственных культур от грибных и бактериальных болезней. Витаплан СП выпускается ЗАО “Агробиотехнология” ООО УК “АБТ-групп”. В настоящей работе использовали Витаплан в виде культуральной жидкости (КЖ), полученной при глубинном культивировании штаммов-продуцентов препарата *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D, что позволило оптимизировать его состав путем включения индукторов болезнеустойчивости.

Схема опыта предусматривала следующие варианты: контроль (обработка водой); Витаплан КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D в соотношении 1 : 1 (титр жизнеспособных клеток  $10^{10}$  КОЕ/мл); Витаплан + 0.05% салицилата хитозана (СХ); Витаплан + 0.1% СХ; Витаплан + 0.2% СХ; Витаплан + 0.5% СХ; композиция Витаплан + 0.1% СХ (КЖ препарата разводили дистиллированной водой в 10 раз (титр  $10^9$  КОЕ/мл) и добавляли СХ до концентрации 0.1%; салицилат хитозана (СХ) — 0.1%.

Для получения 0.1%-ного СХ использовали хитозан с мМ 60 кДа, полученный методом окислительной деструкции [15] из хитозана с молекулярной массой 150 кДа и степенью деацетилирования 85% (“Биопрогресс”, Россия). На его основе получали салицилат хитозана, содержащий ионно-связанные фрагменты салициловой кислоты, составляющие 25%, путем добавления СК до достижения концентрации раствора 0.1% по хитозану. Ионную природу связи (образование соли) между хитозаном и СК в производных (Хитозан + СК) подтверждали ИК-спектрами, полученными на спектрометре Spectrum VX (“Perkin Elmer”, США) по наличию характеристических полос  $1552.92$  и  $1386.12$   $\text{см}^{-1}$  карбоксильной группы  $-\text{COO}^-$ , а также широкой полосы в области  $3100-2600$   $\text{см}^{-1}$ , отражающей валентные колебания функциональных групп  $-\text{NH}_3^+$  и  $\text{OH}$  [16].

Титр жизнеспособных клеток в препарате определяли стандартным методом десятикратных серийных разведений с высевом на сухой питатель-

ный агар (СПА) для культивирования бактерий (АО “НПО “Микроген”, Россия) и последующим подсчетом числа выросших колоний. Оценку антибактериальной активности образцов по отношению к возбудителю бактериального рака томатов *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Smith) Davis et al. (штамм 101) и антигрибной активности по отношению к фитопатогенным микромицетам (*Alternaria solani* Sorauer, *Fusarium solani* (Mart.) Appel et al., *F. culmorum* Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. redolens* W.L. Gordon, *F. sporotrichoides* Sherb., *Sphaeropsis malorum* Peck., *Rhizactonia solani* J.G. Kühn, *Botrytis cinerea* Pers., *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechs. Ex Dastur, *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst.) проводили методом бумажных дисков по диаметру зоны лизиса тест-культур фитопатогенов на агаризованной питательной среде. Для этого поверхность агара Чапека в чашках Петри сплошным газонм засеивали суспензией фитопатогена с титром  $10^5$  КОЕ/мл, а затем на поверхность агара помещали стерильные бумажные фильтры диаметром 8 мм, на которые пипеткой наносили суспензию лабораторного образца препарата определенной концентрации. Выращивание тест-культур проводили в термостате при 22–25°C. Зоны лизиса измеряли на 5 сут.

Изучение прямого фунгистатического действия исследуемых образцов проводили *in vitro* методом агаровых блоков. В стерильные чашки Петри разливали охлажденную до 40°C агаризованную среду Чапека. После застывания на поверхность среды равномерно наносили суспензии испытуемых образцов препаратов (0.2 мл), а затем помещали блоки 10-суточных культур возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили зерновых культур *C. sativus* диаметром 6 мм, вырезанные стерильным сверлом из мицелиальных газонов грибов, выращенных на агаре Чапека в течение 8–10 сут. В качестве контроля служили чашки с агаризованной средой Чапека с блоками тест-культуры без испытуемых образцов препаратов. Чашки инкубировали в темноте при 25°C. Диаметры колоний гриба измеряли на 5 и 7 сут. культивирования, после чего оценивали фунгистатическое действие испытуемых образцов по формуле Эббота [17].

Опыты по оценке иммуномодулирующей активности образцов препаратов проводили методом отделенных листьев [18]. За 24 ч до инокуляции патогеном 7-дневные проростки пшеницы восприимчивого к болезням сорта Саратовская 29 опрыскивали суспензиями препаратов в разведении 1 : 10. Заражение листьев пшеницы проводили суспензией спор ( $4 \times 10^3$ ;  $2 \times 10^4$  спор/мл) гембиотрофа *C. sativus*. Степень пораженности листьев пшеницы оценивали на 4 сут, признаки пораженности листьев пшеницы в виде бурых пятен при заражении *C. sativus* в контроле принима-

ли за 100%. Иммуномодулирующую активность исследуемых вариантов препаратов оценивали в процентах, как степень пораженности листьев растений патогеном по отношению к контролю.

Влияние различных препаратов Витаплана на прорастание конидий *C. sativum* проводили в капле (200 мкл). Раствор образца (0.1 мл) наносили на предметное стекло, добавляли 0.1 мл спор *C. sativus* и выдерживали в темноте при 22°C во влажной камере в течение 24 ч. Прорастание конидий оценивали микроскопированием, просматривая не менее 100–200 конидий в варианте и в контроле (в воде). Частоту прорастания выражали в процентах от общего числа спор, просмотренных в контроле и опыте.

Все опыты проводили в 3-кратной повторности, полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики на основе стандартных ошибок средних  $\pm$ SEM, 95%-доверительных интервалов, наименьшей существенной разности НСР при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрены два пути использования салицилата хитозана для повышения биологической эффективности препарата Витаплан. Первый путь – это включение СХ в концентрации 0.05, 0.1, 0.2 и 0.5% в состав среды при глубинном культивировании штаммов *B. subtilis* (получении препарата Витаплан), другой – создание композиции путем включения СХ в концентрации 0.1% в состав конечной препаративной формы Витаплана.

На первом этапе исследований оценивали влияние различных концентраций СХ на жизнеспособность и антагонистическую активность штаммов, составляющих основу препарата Витаплан. На основании полученных данных выявили оптимальную концентрацию СХ в среде для глубинного культивирования, существенно повышающую антагонистическую активность штаммов *B. subtilis* (табл. 1).

Установлено, что включение СХ в среду для культивирования в концентрации 0.05 и 0.1% положительно повлияло на плотность бактериальных клеток и коррелировало с увеличением антагонистической активности штаммов Витаплана по отношению к тест-культурам (табл. 1).

Введение 0.2 и 0.5% СХ в питательную среду на порядок уменьшало титр жизнеспособных клеток штаммов, что закономерно приводило к снижению антагонистической активности КЖ по отношению к некоторым видам фитопатогенных микроорганизмов, таких, как *C. sativus*, *F. solani*, *C. lagenarium* и др.

Наибольшую антагонистическую активность по отношению к большинству тест-культур показали: Витаплан + 0.05% и Витаплан + 0.1% СХ.

**Таблица 1.** Влияние внесения СХ в состав питательной среды при получении препарата Витаплан на титр клеток и антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микроорганизмов

Тест-объект	КЖ (контроль)	Витаплан + СХ, %			
		0.05	0.1	0.2	0.5
Титр, КОЕ/мл	$1.3 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$1.8 \times 10^{11}$	$3.3 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^{10}$
Диаметр зоны отсутствия роста, мм					
<i>Alternaria solani</i>	23.5 ± 1.6	30.8 ± 1.1	36.3 ± 1.2	22.8 ± 1.8	16.3 ± 0.4
<i>Fusarium solani</i>	14.8 ± 1.2	30.5 ± 1.3	27.0 ± 1.0	14.5 ± 0.8	17.7 ± 0.8
<i>F. culmorum</i>	16.8 ± 1.0	24.2 ± 1.2	25.2 ± 1.3	25.0 ± 1.2	15.5 ± 0.6
<i>F. graminearum</i>	18.5 ± 1.4	26.8 ± 1.1	26.2 ± 1.2	16.7 ± 0.7	18.5 ± 0.8
<i>F. redolens</i>	18.5 ± 1.2	29.5 ± 1.3	22.7 ± 1.4	19.5 ± 0.9	14.3 ± 0.6
<i>F. sporotrichoides</i>	15.3 ± 0.5	36.8 ± 1.4	21.7 ± 1.6	23.8 ± 0.8	13.5 ± 0.8
<i>Sphaeropsis malorum</i>	22.7 ± 1.2	27.2 ± 1.1	21.2 ± 1.2	17.2 ± 0.6	14.5 ± 1.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	24.2 ± 1.3	23.2 ± 1.2	22.3 ± 1.3	20.7 ± 1.0	12.0 ± 1.2
<i>Botrytis cinerea</i>	31.3 ± 1.2	41.2 ± 1.5	41.7 ± 2.0	35.8 ± 1.6	13.3 ± 0.5
<i>Cochliobolus sativus</i>	41.0 ± 1.8	47.2 ± 1.3	45.5 ± 2.2	17.5 ± 0.5	17.7 ± 0.8
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	35.0 ± 1.3	35.2 ± 1.5	31.2 ± 1.2	22.5 ± 0.7	16.5 ± 0.6
<i>Clavibacter michiganensis</i> 101	14.8 ± 1.0	17.2 ± 0.4	17.3 ± 0.6	13.3 ± 0.5	12.8 ± 0.4
НСП <sub>0.05</sub>	3.0	2.2	2.1	2.5	1.8

**Таблица 2.** Влияние СХ на фунгистатическую активность препарата Витаплан по отношению к *C. sativus*

Вариант	Ингибирование роста мицелия <i>C. sativus</i> , %		Прорастание конидий <i>C. sativus</i> , % к контролю
	5 сут	7 сут	
Контроль (вода)	—	—	85.2
Витаплан	63.3	73.3	47.6
Витаплан+0.05% СХ	62.2	71.7	55.9
Витаплан +0.1% СХ	61.1	70.8	50.0
Витаплан+0.2% СХ	57.8	62.5	65.8
Витаплан +0.5% СХ	46.7	59.2	84.1
Витаплан +0.1% СХ*	52.2	57.5	9.0
0.1% СХ	40.9	38.6	3.3
НСП <sub>0.5</sub>	3.2	3.8	4.3

\* СХ вносили в полученную культуральную жидкость (КЖ).

На следующем этапе была проведена оценка способности препаратов Витаплан + СХ ингибировать рост гриба и прорастание конидий патогена, а также повышать устойчивость пшеницы к возбудителю темно-бурой пятнистости.

В соответствии с регламентами применения биопрепаратов в сельском хозяйстве, сравнительную оценку биологической эффективности Витаплана и его вариантов с СХ проводили, используя титр  $10^9$  КОЕ/мл. Результаты оценки влияния различных препаратов Витаплана + СХ на линейный рост и на прорастание конидий *C. sativus* *in vitro* представлены в табл. 2.

Установлена высокая фунгистатическая активность Витаплана, которая составляла 73.3% на 7 сут опыта. При добавлении в среду для глубинного культивирования 0.05 и 0.1% СХ высокая антигрибная активность сохранялась (71.7 и 70.8%). Увеличение концентрации СХ до 0.2 и 0.5% снижало фунгистатическую активность Витаплана до 62.5 и 59.2% соответственно, что могло быть обусловлено уменьшением плотности суспензии клеток бактерий в биопрепарате (табл. 1).

Композиция Витаплан + 0.1% СХ, полученная путем включения салицилата хитозана в готовую форму биопрепарата Витаплан, ингиби-

**Таблица 3.** Влияние Витаплана + СХ на устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости, (метод отделенных листьев, сорт Саратовская 29)

Варианты препаратов	Площадь поражения листьев пшеницы <i>C. sativus</i> , %	
Контроль	30	60
Витаплан	15	50
Витаплан + 0.05% СХ	10	40
Витаплан + 0.1% СХ	5	30
Витаплан + 0.2% СХ	30	60
Витаплан + 0.5% СХ	30	60
Витаплан + 0.1% СХ*	5	25
0.1% СХ	3	5
НСР <sub>0,5</sub> = 4.5		

\* СХ вносили в полученную КЖ.

ривала мицелиальный рост аскомицета до 57.5%. Снижение фунгистатической активности композиции по сравнению с исходным биопрепаратом Витаплан (73.3%) на 7 сут культивирования, во-видимому, связано с невысоким фунгистатическим эффектом самого СХ. Известно, что биоцидная активность хитозана обусловлена поликатионной природой полимера и способностью связываться с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток [19], что нарушает нормальное функционирование обменных процессов клетки с внешней средой и ингибирует рост мицелия гриба.

Согласно полученным данным, СХ как индуктор болезнеустойчивости обладал небольшой фунгистатической активностью, сдерживая рост мицелия *C. sativus* лишь на 40.9% на 5 сут совместного культивирования и на 38.6% – на 7 сут (табл. 2).

Известно, что споры грибов – главный источник инфицирования растений. Скорость прорастания спор имеет большое значение для возникновения заболевания, поэтому факторы, ускоряющие или замедляющие ее, оказывают существенное влияние на процесс заражения растений.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что Витаплан без СХ только вдвое ингибировал прорастание конидий *C. sativus* (47.6%) по сравнению с контролем (85.2%). Препарат Витаплан с СХ в концентрации 0.05 и 0.1% в стандартной среде для глубинного культивирования также ингибировали прорастание конидий аскомицета до 55.9 и 50.0% к контролю соответственно. Увеличение концентрации СХ до 0.2 и 0.5% снижало способность биопрепарата подавлять прорастание конидий *C. sativus*.

Установлен высокий ингибирующий эффект композиции Витаплан + 0.1% СХ на прорастание

конидий *C. sativus*. Если в контроле через 24 ч проросло 85.2%, то в опыте проросших конидий обнаружено только 9.0% (табл. 2). По-видимому, такая высокая ингибирующая активность композиции обусловлена включением в ее состав 0.1% СХ, который активно сдерживал прорастание конидий микромицета – количество проросших спор в данном варианте через сутки составило 3%.

Анализ результатов изучения индуцирующей активности Витаплана показал, что их эффективность зависит от интенсивности поражения растений пшеницы возбудителем темно-бурой пятнистости *C. sativus* (табл. 3).

В контрольных растениях, инфицированных *C. sativus*, интенсивность заражения составляла 30% и 60% от площади листа при разных инфекционных нагрузках. Предварительная обработка Витапланом КЖ с последующим заражением возбудителем темно-бурой пятнистости снижала площадь поражения листьев на 10–15% в зависимости от уровня развития болезни в контроле. Опрыскивание растений пшеницы препаратом Витаплан + 0.05% СХ сокращало пораженность листьев в 1.5–3 раза, а Витаплан + 0.1% СХ – в 2–6 раз.

Отсутствие индуцирующей активности у препаративных форм Витаплан + 0.2% СХ и Витаплан + 0.5% СХ, вероятно, связано с более низким ингибированием прорастания конидий *C. sativus* и слабым фунгистатическим эффектом (табл. 2) по сравнению с другими вариантами (табл. 3).

Обработка растений пшеницы композицией Витаплан + 0.1% СХ повышало устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости, что выразилось в снижении площади поражения листьев возбудителем в 2–6 раз по отношению к контролю. Поскольку 0.1% СХ обладал высокой индуцирующей активностью, то при добавлении к Витаплану наблюдалось усиление иммуномодулирующей активности биопрепарата в 2–3 раза (табл. 3).

Индуцирующая активность препаратов Витаплан, содержащих в своем составе СХ, положительно коррелировала со степенью ингибирования прорастания конидий *C. sativus*. Чем сильнее подавлялось прорастание спор патогена, тем выше была индуцирующая активность образца (табл. 2, 3).

Таким образом, на примере патосистемы пшеница – *C. sativus* изучена биологическая активность новых форм биопрепарата Витаплан в отношении темно-бурой пятнистости пшеницы. Из всех вариантов опыта наибольшую эффективность показали два препарата, полученные разными способами:

- Витаплан + 0.1% СХ – добавление 0.1% салицилата хитозана в среду для глубинного культивирования штаммов–продуцентов;
- Композиция: Витаплан + 0.1% СХ – добавление 0.1% салицилата хитозана в КЖ после получения препарата.

Биологическая эффективность биопрепарата Витаплан КЖ обусловлена двумя механизмами, лежащими в основе взаимоотношений в патосистеме пшеница – *Cochliobolus sativus*, это прямое биоцидное воздействие штаммов *Bacillus* на микромицеты, а также усиления системной устойчивости растений. Прямое биоцидное действие *B. subtilis* связывалось, по-видимому, с синтезом ими различных метаболитов с антибиотической активностью – антибиотиков, биосурфактантов, сидерофоров и др. [20–22]. Помимо прямого антагонистического действия на клетки возбудителя, бациллы способны также повышать устойчивость растений синтезируя элиситоры, благодаря которым происходит активация системной индуцированной устойчивости и системной приобретенной устойчивости [23, 24]. Элиситорами, запускающими защитные реакции у растений, могут быть белки, липопептиды, полисахариды и др. соединения, ассоциированные с клеточной стенкой бактерии *B. subtilis* [4, 25, 26], а также антибиотики и биосурфактанты [6, 8, 23, 27–29].

Согласно исследованиям Шенина с соавт. [30] и Новиковой с соавт. [9] высокая биологическая эффективность биопрепарата Витаплан обусловлена синтезом штаммами *B. subtilis* метаболитных комплексов сложного состава, включающего пептидные и полиеновые антибиотики. Установленная в работе высокая фунгистатическая активность Витаплана по отношению к *C. sativus* (73.3%, табл. 2), по-видимому, определяется синтезом штаммами *B. subtilis* антибиотических веществ, подавляющих или замедляющих рост фитопатогена.

Индущирующая активность исходного биопрепарата Витаплан проявилась в понижении пораженности листьев пшеницы *C. sativus* на 10–15% в зависимости от инфекционной нагрузки (табл. 3). Полученные результаты согласовывались с имеющимися в литературе данными. Так, показано, что снижение развития болезни в результате опрыскивания листьев ячменя фильтратом КЖ штамма *Bacillus amyloliquefaciens* перед инокуляцией *C. sativus*, обусловлено запуском индуцированной устойчивости [31].

Биопрепарат Витаплан представляет собой культуральную жидкость высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D), полученных методом глубоководного культивирования. В состав культуральной жидкости входят споры штаммов, остатки питательной среды, а также метаболиты, выделенные в среду в процессе ферментации [9, 30]. Следует отметить, что при глубоководной ферментации штаммов, входящих в препарат Витаплан, в среде с СХ происходило расщепление и утилизация его как субстрата, а также, вероятно, выход в среду салициловой кислоты, связанной лабильной ионной

связью с хитозаном, вследствие диссоциации соли.

Таким образом, получены варианты жидкого препарата, содержащие комплекс различных метаболитов с антибиотической активностью, с гормональными и сигнальными функциями (такие, как ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая, салициловая, жасмоновая кислоты), а также набор олигомеров хитозана, обладающих элиситорной активностью.

Более высокая способность препарата Витаплан + 0.1% СХ индуцировать устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости по сравнению с исходной может быть обусловлена наличием олигомеров хитозана, образующихся при гидролизе СХ хитиназами бактерии [32], которые, как известно, являются эффективными элиситорами индуцированной устойчивости растений [33, 34].

Повышенная биологическая активность композиции препарата Витаплан + 0.1% СХ, по-видимому, определяется совмещением фунгицидной активности препарата и индукции защитных реакций растения СХ.

Согласно работе [35] и другим работам применение 0.1%-ного СХ может эффективно индуцировать реакции защиты от патогенов, формируя устойчивость к болезням [13]. Однако СХ может обладать и прямым действием на патоген, блокируя прорастание спор, поскольку хитозан является пленкообразующим полимером. Нанесенный на листья растений, он может задерживать также прорастание и развитие спор [36]. Это подтверждается результатами по ингибированию прорастания конидий *C. sativus* 0.1%-ным раствором СХ (табл. 2) и согласуется с проведенными ранее гистологическими исследованиями, которые показали, что на поверхности плодов цитрусовых, обработанных хитозаном, наблюдалось ограничение роста патогена и нарушение структуры его гиф [37].

На основании результатов, полученных в настоящей работе, можно утверждать, что после обработки растений пшеницы новыми препаратами Витаплан, содержащими СХ или его олигомеры, запускаются механизмы защитных реакций, которые выражаются в формировании химических и физических барьеров против атаки патогена. Кроме того, у обработанных растений пшеницы внедрение гриба в эпидермальный слой сдерживается в результате прямого ингибирования прорастания конидий фунгицидными компонентами метаболитных комплексов штаммов *Bacillus*. Композиция Витаплан + 0.1% СХ, которую получили смешиванием КЖ штаммов *Bacillus subtilis* после окончания ферментации с СХ (0.1%), обладала более высокой биологической активностью по сравнению с другими препаратами. Это связано с тем, что пленкообразующий полимер хитозан при нанесении на листья растений задержи-

вал прорастание конидий *C. sativus* и проникновение патогена в ткани (табл. 2), что проявлялось в снижении степени пораженности растений. Таким образом, биологическая эффективность препарата Витаплана и препаратов с СХ обусловлена несколькими способами воздействия, каждый из которых потенциально может тормозить развитие болезней, что существенно повышает их защитный эффект.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности создания нового поколения экологически безопасных средств защиты растений на основе сочетания активных штаммов микроорганизмов—антагонистов и хитозанов для повышения биологической эффективности и расширения спектра действия препаративных форм, предназначенных для защиты растений от болезней.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламов В.П., Немцев С.В., Тихонов В.Е. Хитин и хитозан: природа, получение и применение. Щелково: Изд-во Российского Хитинового Общества, 2010. 292 с.
2. Badawy M.E.I., Rabea E.I. // International Journal of Carbohydrate Chemistry. 2011. V. 2011. Review Article. 29 p. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>
3. Тютерев С.Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб: ВИЗР, 2014. 212 с.
4. De Vleeschauwer D., Höfte M. // Adv. Bot. Res. 2009. № 51. P. 223–281. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51006-3)
5. Максимов И.В., Абизильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 373–385.
6. Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М. // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 763–775. <https://doi.org/10.7868/s0015330315060111>
7. Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P., Losick R., Kolter R. // Nat. Rev. Microbiol. 2013. V. 11. № 3. P. 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960PMID:23353768>
8. Pieterse C., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S., Bakker P. // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. № 52. P. 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
9. Novikova I.I., Shenin Y.D. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 9. P. 817–826. <https://doi.org/10.1134/S0003683811090031>
10. Новикова И.И., Бойкова И.В., Павлюшин В.А., Зейрук В.Н., Васильева С.В., Азизбекян Р.Р., Кузнецова Н.И. // Вестник защиты растений. 2013. № 4. С. 12–21.
11. Павлюшин В.А., Новикова И.И., Бойкова И.В. // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 3. С. 421–438. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.421rus>
12. Abdel-Kader M.M., El-Mougy N.S., Aly M.D., Lashin S.M. // Int. J. Agric. Forestry. 2012. V. 2. № 2. P. 8–48. <https://doi.org/10.5923/j.ijaf.20120202.07>
13. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
14. Попова Э.В., Коваленко Н.М., Сокоорнова С.В., Тютерев С.Л., Домнина Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 540–545. <https://doi.org/10.1134/S055510991805015X>
15. Muzzarelli R.A.A. Chitin. N.Y.: Pergamon Press, Oxford, 1977. 326 p.
16. Федосеева Е.Н., Федосеев В.Б. // Высокомолекул. соед., Серия А. 2011. Т. 53. № 11. С. 1900–1907.
17. Oh J.-W., Chun SeC., Chandrasekaran M. // Agronomy. 2019. V. 9. № 2. P. 21–33. <https://doi.org/10.3390/agronomy9010021>
18. Kumar J., Hüeckelhoven R., Beckhove U., Nagarajan S., Kogel K.-H. // Phytopathology. 2001. V. 91. № 2. P. 127–133. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.127>
19. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Варламов В.П. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 5. С. 91–97.
20. Cao Y., Xu Z., Ling N., Yuan Y., Yang X., Chen L., Shen B., Shen Q. // J. Am. Soc. Sci. Hortic. 2012. № 135. P. 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.002>
21. Rezuanel I., Jeong Y-T., Lee Y.S., Song C.H. // Mycobiology. 2012. V. 40. № 1. P. 59–66. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.059>
22. Wang T., Liang Y., Wu M., Chen Z., Lin J., Yang L. // Chin. J. Chem. Eng. 2015. V. 23. № 4. P. 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>
23. Ongena M., Jordan E., Adam A, Paquot M, Brans A., Joris B., Arpigny J-L., Thonart P. // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. № 4. P. 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
24. Ahn I-P, Park K., Kim C-H. // Mol. Cells. 2002. V. 13. № 2. P. 302–308.
25. Van der Ent S., Van Wees S., Pieterse C. // Phytochemistry. 2009. V. 70. № 13–14. P. 1581–1588. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.009>
26. Van Loon L.C. // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 119. № 3. P. 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>
27. Ongena M, Henry G, Thonart P. Recent Developments in Management of Plant Diseases (Plant Pathology in the 21st Century). / Ed. U. Gisi, L. Chet, M.L. Guillino, Dordrecht, Heidelberg, London, N.Y.: Springer Science + Business Media B, 2010. V. 1. P. 59–69. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9_5)
28. Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J. // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. № 7. P. 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
29. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. In: Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development / Ed. Morrison L., N.Y.: Nova Science, 2015. P. 33–66.

30. Шенин Ю.Д., Новикова И.И., Кругликова Л.Ф., Калько Г.В. // Антибиотики и химиотерапия. 1995. Т. 40. № 5. С. 3–7.
31. Kriuchkova L.O. // Biologija. 2017. V. 63. № 3. P. 289–295.
32. San-Lang W., Tzu-Yin L., Yue-Horng Y., Hui-Fen L., Yu-Jen C. // Carbohydr Res. 2006. V. 341. № 15. P. 2507–2515.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.06.027>
33. Yin H., Li Y., Zhang H.Y., Wang W.X., Lu H., Grevsen K., Zhao X., Du Y. // Int. J. Plant Sci. 2013. V. 174. № 4. P. 722–732.  
<https://doi.org/10.1086/669721>
34. Deepmala K., Hemantaranjan A., Bharti S., Nishant Bhanu A. // Advances in Plants & Agriculture Research. 2014. V. 1. № 1. P. 23–30.  
<https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006>
35. Колесников Л.Е., Попова Э.В., Новикова И.И., Прияткин Н.С., Архипов М.В., Колесникова Ю.Р. и др. // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 1024–1040.  
<https://doi.org/10.15389/agrobiol.2019.5.1024rus>
36. Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 444–454.  
<https://doi.org/10.1134/S0555109918050124>
37. Benhamou N. // Phytopathology. 2004. V. 94. № 7. P. 693–705.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.693>

## Using Chitosan Salicylate for Increasing Vitaplan Biological Efficiency

I. I. Novikova<sup>a,\*</sup>, E. V. Popova<sup>a</sup>, I. L. Krasnobaeva<sup>a</sup>, and N. M. Kovalenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, 196608 Russia

\*e-mail: [irina\\_novikova@inbox.ru](mailto:irina_novikova@inbox.ru)

The biological effectiveness of a biological product containing chitosan salicylate in the medium for cultivation of strains producing *Bacillus subtilis* VKM B-2604D and VKM B-2605D or in a ready-made preparative form in protecting wheat from dark brown spot, the causative agent *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kuribus), was studied. The inclusion of 0.1% chitosan salicylate in the Vitaplan, CF, increases the inducing effect of the biological product by 1.5–2 times. The increased biological activity of the new formulations of Vitaplan, CF is apparently determined by the combination of the fungicidal activity of the biological product and the induction by chitosan salicylate and chitooligosaccharides plant defense reactions.

**Keywords:** biological product Vitaplan, CF preparative forms, fungistatic activity, antagonistic effect, chitosan salicylate, induced resistance, wheat, dark brown spot