

Ренёв Н.О., Мальчевский В.А., Субботин А.М.
ФГБУН ФИЦ Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, Россия;
solitary_72@mail.ru.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЁРЗЛЫХ ПОРОД ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ МИНИ-КЛУБНЕЙ МЕРИСТЕМНЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Микроклональное размножение in vitro активно используется в производстве здорового посадочного материала пищевых и декоративных растений. Однако требуется дальнейшее улучшение для увеличения скорости роста микроклонов in vitro и повышения урожайности регенератора ex vitro. В этом исследовании меристемные растения картофеля (Solanum tuberosum L.), выращенные in vitro, инокулировали с помощью вторичных метаболитов бактерий из многолетнемерзлых пород. Затем микроклоны высаживались в теплицу. Были определены морфологические параметры растения: урожайность и масса клубней. Наши результаты показывают, что при обработке меристемных растений картофеля метаболитами бактерий Bacillus cereus 9-08-CH9 и Achromobacter spanius 10-50TS2 повышается урожайность мини-клубней.

Microclonal reproduction in vitro is actively used in the production of healthy planting material for food and ornamental plants. However, further improvement is required to increase the growth rate of microclones in vitro and increase the yield of the regenerator ex vitro. In this study, potato meristem plants (Solanum tuberosum L.) grown in vitro were inoculated with secondary bacterial metabolites from perennially frozen rocks. Then microclones were planted in a greenhouse. Morphological parameters of the plant were determined: yield and mass of tubers. Our results show that processing of meristem plants of potatoes with metabolites of Bacillus cereus 9-08-CH9 and Achromobacter spanius 10-50TS2 bacteria increases yield of mini-tubers.

Ключевые слова: Solanum tuberosum L.; Bacillus cereus; Achromobacter spanius; меристемные растения; in vitro; мини-клубни.

Keywords: Solanum tuberosum L.; Bacillus cereus; Achromobacter spanius; meristem plants; in vitro; mini tubers.

Введение

Культивирование апикальных меристем с последующим размножением микроклональных растений in vitro широко используется в современной биотехнологии [1]. В семеноводстве микроклональное размножение является обязательным при производстве оздоровленного посадочного материала картофеля. Однако этот метод необходимо оптимизировать для достижения более высокой скорости роста микроклонов и повышения продуктивности регенерированных растений в почвенных условиях (ex vitro).

В настоящее время установлено, что ряд бактериальных штаммов из многолетнемерзлых пород (ММП) и их метаболиты оказывают положительное влияние на морфофизиологические, биохимические и адаптивные параметры растений на культурных злаковых растениях [2, 3].

Однако исследований воздействия бактерий из ММП и их метаболитов на урожайность мини-клубней меристемных растений картофеля в условиях защищенного грунта не проводились.

Цель данной работы изучение влияния метаболитов бактерий из многолетнемерзлых пород на стадии in vitro на урожайность мини-клубней меристемных растений картофеля.

Методы исследования

Исследование влияния вторичных метаболитов проводилось на меристемных культурах *Solanum tuberosum* L сорта «Жуковский ранний», высаженных в условиях защищенного грунта.

В работе использовали 3 штамма бактериальных культур: 875 TS, 10-50TS2, выделенных из кернов ММП при бурении скважин в районе Тарко-Сале (Россия, Ямало-Ненецкий автономный округ, Пуровский район) и 9-08-CH9, выделенный из образцов ММП береговых обнажений р. Чара (Россия, Забайкальский край, Каларский район, посёлок Новая Чара). Штаммы идентифицированы по 16S rDNA и депонированы в ВКПМ ФГУП ГосНИИГенетика (Москва): 875TS (B-12242) - *Bacillus cereus*; 9-08-CH9 (B-12401) - *Bacillus cereus*; 10-50TS2 (B-12405) – *Achromobacter spanius*. Культивирование штаммов бактерий осуществляли по описанной ниже методике. Штаммы бактерий высевали в пробирки на приготовленный стандартным методом скошенный питательный агар (ГРМ-агар, г. Оболенск, ТУ 9398-020-78095326-2006) и культивировали в термостате 48 часа при $t=26^{\circ}\text{C}$. Затем производили смыв микроорганизмов из каждой пробирки 5 мл дистиллированной воды. Концентрацию микроорганизмов определяли культуральным методом серийных разведений по количеству КОЕ на агаризованной питательной среде в чашках Петри [4]. После определения количества клеток бактерий в исходной маточной суспензии плотность культур доводили до рабочей концентрации в 1×10^9 микробных клеток в 1 мл дистиллированной воды. Затем суспензию клеток замораживали на 8 часов при $t -5^{\circ}\text{C}$, после чего её оттаивали при $t +22^{\circ}\text{C}$ в течение 16 часов. Масса пептидных комплексов определялась биуретовым методом [5] и методом жидкостной препаративной хроматографии на хроматографе фирмы «Gilson» [6].

Стерильный раствор метаболитов получали путём фильтрования бактериальных суспензий через фильтры фирмы «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм (Durapore membrane filters, type 0.22 mm GV). Для проведения исследований по изучению влияния метаболитов бактерий на развитие меристемных растений *Solanum tuberosum* L, метаболиты в количестве (дозе) 250 мкл. (50 мкг по пептидным комплексам) распыляли (наносили) на поверхность питательной среды Мурасиге-Скуга, разлитую в пробирки по 5 мл. В контрольном варианте, в том же объёме, добавляли отфильтрованный смыв с поверхности питательного агара для культивирования микроорганизмов. Через 60 минут в эти пробирки начинали высаживать микрочеренки меристемных растений картофеля. Размножение растений картофеля *in vitro* методом микроклонального черенкования проводили в стерильном боксе. Пробирки с посаженными растениями помещали в специальное помещение с температурой $20-22^{\circ}\text{C}$ и освещенностью 5000-8000 люкс с фотопериодом 16 часов.

На 30 день, меристемные растения картофеля высаживали в защищенный грунт (теплица) для получения мини-клубней. В качестве субстрата использовали низинный торф (pH = 6,5). Мероприятия по уходу за растениями картофеля включали полив, прополку и рыхление. Через 60 дней при уборке каждое растение выкапывали вручную, и каждое гнездо индивидуально оценивали по продуктивности (количество и общая масса клубней, средняя масса одного клубня). Статистическая обработка результатов исследования проводилась согласно международным требованиям, при помощи программы для персональных компьютеров «SPSS 11,5 for Windows».

Результаты и их обсуждение

Традиционным способом получения качественного семенного материала картофеля является метод размножения чистого безвирусного пробирочного материала в теплице. По разным источникам отечественных и зарубежных исследователей, этот метод дает урожайность обычно от 5 до 10 миниклубней с одного растения [7]. Оценка продуктивности меристемных растений картофеля, обработанных вторичными метаболитами бактерий приведена в таблице.

Продуктивность меристемных растений картофеля, обработанных вторичными метаболитами бактерий

Вариант	Количество клубней, шт./куст	Масса клубней, г/куст	Масса одного клубня, г	Количество клубней, шт./м ²
Контроль	7,60±0,60	273,00±20,98	37,40±3,67	50,60±3,99
9-08-CH9	9,60±1,08*	254,00±8,84	30,00±3,77	63,90±7,17*
10-50TS2	9,40±0,87*	370,00±26,33*	42,70±5,36	62,60±5,81*
875TS	7,40±0,99	287,00±21,66	42,90±4,42	49,30±6,60

Примечание: * - достоверные различия при $p < 0,05$ с контролем

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что количество клубней картофеля достоверно ($p < 0,05$) выше контрольных показателей, под влиянием вторичных метаболитов бактерий *Bacillus cereus* 9-08-CH9 и *Achromobacter spanius* 10-50TS2. Максимальное количество клубней с одного растения получено при обработке вторичными метаболитами штамма *Bacillus cereus* 9-08-CH9. По показателю массы клубней с одного куста достоверное ($p < 0,05$) различие относительно контроля и остальных вариантов опыта показали вторичные метаболиты штамма бактерий *Achromobacter spanius* 10-50TS2. Между остальными вариантами достоверных ($p < 0,05$) различий не выявлено. Статистически достоверно ($p < 0,05$) выявлено положительное влияние вторичных метаболитов бактерий *Bacillus cereus* 9-08-CH9 и *Achromobacter spanius* 10-50TS2 на количество клубней на м². Достоверного ($p < 0,05$) влияния вторичных метаболитов штамма бактерий *Bacillus cereus* 875TS на данный показатель не было.

Выводы

Наиболее высокие показатели урожайности при выращивании из меристемных культур в условиях защищённого грунта показали растения, обработанные вторичными метаболитами бактерий *Bacillus cereus* 9-08-CH9 и *Achromobacter spanius* 10-50TS2.

Библиографические ссылки

1. George, E.F. Микропроизводство: использование и методы / E.F. George, P.C. Debergh // Размножение растений тканевой культурой / под ред. Э.Ф. Джордж, М.А. Холл, Г.Дж. Де Клерк. – Дордрехт: Springer, 2008. – С. 29–64. doi: 10.1007 / 978-1-4020-5005-3_2.
2. Assessment of sustainability of spring wheat treated with bacteria isolated from permafrost, to low temperature conditions / M.V. Narushko [et al.] // International Conference “Permafrost in XXI Century: basic and applied researches”, Pushchino, Russia, September 27 – October 1, 2015. – Pushchino, 2015. – P. 106–107.
3. Influence of permafrost microorganisms on morphophysiological indicators of spring wheat / A.M. Subbotin [et al.] // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2016. – № 20(5). – P. 666-672. DOI 10.18699/VJ16.119.
4. Gerhardt, P., Manual of methods for general bacteriology / P. Gerhardt. – American Society for Microbiology, 1981. – P. 443-445.
5. Data for Biochemical Research / Eds.: R. M. C. Dawson [et al.]. – Oxford: Oxford Science Publications, OUP, 1986. – 580 p.
6. Wellburn, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution / A.R. Wellburn. – J. Plant. Physiol. – 1994. – Vol. –144(3). – P.307–313.
7. Технология производства оригинального, элитного и репродукционного семенного картофеля на среднем Урале / М.Ю. Карпухин [и др.]. - Екатеринбург: Уральское ГАУ, 2019. – 92 с.