УДК 58.01/.07, 581.143, 612.017.2

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS MIGULA*
ПРИ АДАПТАЦИИ К НЕСТЕРИЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ
РАСТЕНИЙ *RUBUS OCCIDENTALIS CUMBERLAND*,
ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ *IN VITRO***

Тохтарь Людмила Анатольевна

к.б.н., зав. лабораторией биотехнологии растений

Третьяков Михаил Юрьевич

к.б.н., зав. лабораторией генетики и селекции растений

Жиляева Наталья Васильевна

инженер лаборатории биотехнологии растений

НОЦ «Ботанический сад НИУ «БелГУ»

Аннотация: В статье приводятся данные по влиянию некоторых штаммов *Pseudomonas Migula* на адаптацию растений *Rubus occidentalis* Cumberland, полученных методом *in vitro*, к условиям внешней среды. Выявлено положительное влияние обработки торфяного субстрата перед высадкой растений малины на адаптацию суспензией, содержащей штаммы бактерий *Pseudomonas* в разведении 1:5 на длину корней и высоту растений. Среди изученных штаммов штамм *Pseudomonas putida* P82 в разведении 1:5 и *Pseudomonas protegens* P4-2 в разведении 1:10 выступают в качестве ингибиторов образования количества междоузлий и длины корней.

Ключевые слова: Адаптация, *in vitro*, *Rubus occidentalis* Cumberland., штаммы *Pseudomonas Migula*.

**USE OF *PSEUDOMONAS MIGULA* STRAINS WHEN ADAPTING
TO NON-STERILE CONDITIONS *RUBUS OCCIDENTALIS*
CUMBERLAND PLANTS, OBTAINED BY *IN VITRO* METHOD**

Tokhtar Lyudmila Anatolyevna

Tretyakov Mikhail Yurievich

Zhilyaeva Natalia Vasilievna

Abstract: The article provides data on the effect of some *Pseudomonas* Migula strains on the adaptation of *Rubus occidentalis* Cumberland plants obtained by the *in vitro* method to environmental conditions. The positive effect of peat substrate treatment before planting raspberry plants on adaptation with a suspension containing *Pseudomonas* bacteria strains at a dilution of 1: 5 on root length and plant height was revealed. Among the strains studied, the *Pseudomonas putida* P82 strain at a 1: 5 dilution and *Pseudomonas protegens* P4-2 at a 1:10 dilution act as inhibitors of the formation of the number of internodes and root length.

Key words: adaptation, *in vitro*, *Rubus occidentalis* Cumberland, *Pseudomonas* strains.

Для быстрого размножения различных видов растений широкое применение в практике питомниководства нашел метод клонального микроразмножения. Этот метод стал промышленным для многих культур, в том числе и для малины [1].

Эффективность клонального микроразмножения растений рода *Rubus* L. во многом зависит от генотипических факторов, влияние которых проявляется в способности к росту меристем, размножению и укоренению [2, 3]. По мнению большинства исследователей, одним из наиболее трудоемких и уязвимых этапов клонального микроразмножения является адаптация регенерантов к нестерильным условиям: гибель пробирочных растений может быть весьма существенной и достигать 50% и более [4, 5]. Высокая чувствительность микрорастений к стрессам и большие потери при адаптации заставляют искать пути увеличения их приживаемости в стрессовых условиях [7, 8] и активизации ростовых процессов на ранних этапах дорастивания, именно поэтому успешный перенос растений в нестерильные условия делает возможным промышленное микроклональное размножение [9, 10, 11].

В опытах ряда исследователей было показано, что внесение комплексных микробных препаратов позитивно влияет на физиологическое состояние и метаболизм растений и обеспечивает снижение стрессовой нагрузки на регенеранты в период адаптации [12]. Это в свою очередь позитивно сказывается на процессах роста, интенсивности укоренения и проценте выхода стандартных саженцев. Бактерии *Pseudomonas chlororaphis* согласно литературным данным известны благодаря ингибированию развития

фитопатогенных грибов [13]. *Pseudomonas protegens* рассматриваются в качестве бактерий, продуцирующих биологические активные вещества, тормозящие развитие патогенной микрофлоры [14]. *Pseudomonas putida* в литературе рассматривается в качестве микроорганизма симбионта синтезирующего предшественники гормонов растений, тем самым способствуя мобилизации питательных веществ и продуцирующего антибиотики [15]. Таким образом, применение препаратов, содержащих штаммы бактерий рода *Pseudomonas* Migula, могут облегчить переход регенерантов *Rubus occidentalis* Cumberland к самостоятельному минеральному питанию и фотосинтезу в асептических условиях, сократить потери микрорастений и вместе с тем ускорить их рост после пересадки *ex vitro*.

Целью настоящего исследования было изучить влияние подготовки субстрата с использованием суспензий, содержащих различные штаммы бактерий *Pseudomonas* Migula. – *Pseudomonas chlororaphis* 16Н, *Pseudomonas protegens* P4-2 и *Pseudomonas putida* P82, на ростовые процессы *in vitro* растений *Rubus occidentalis* Cumberland на этапе адаптации.

Для адаптации к нестерильным условиям укорененные *in vitro* растения малины высаживались в рассадные кассеты с объемом ячейки 50 мл, заполненные минерализованным торфяным субстратом. Перед высадкой растений, субстрат в рассадных кассетах проливали до полного смачивания растворами, содержащими штаммы бактерий *Pseudomonas chlororaphis* 16Н, *Pseudomonas protegens* P4-2 и *Pseudomonas putida* P82 в разведениях с водой 1:5 и 1:10. В качестве контроля выступали растения, обработанные после высадки в субстрат водой без добавок. Кассеты с высаженными растениями размещались в парниках. В течение 30 дней влажность в парниках плавно снижали. После завершения процесса адаптации проводили оценку некоторых морфометрических параметров растений.

Полученные данные по влиянию обработки субстратов различными штаммами *Pseudomonas* Migula на морфометрические показатели надземной и подземной частей растений *Rubus occidentalis* Cumberland представлены на рисунках 1, 2.

Рис. 1. Влияние обработки субстрата штаммами *Pseudomonas Migula* на морфометрические показатели надземной части растений *Rubus occidentalis* Cumberland при адаптации к условиям *ex vitro*

Растения, полученные методом *in vitro*, до адаптации имели разное количество междоузлий и отличались по средним значениям высоты растений. После завершения адаптации у растений, высаженных в субстрат обработанный суспензией содержащей изученные штаммы *Pseudomonas Migula*, количество междоузлий оказалось выше, чем у контрольных растений во всех вариантах, за исключением обработки субстрата *Pseudomonas putida* P82 в разведении 1:5. Несмотря на неравномерность длины побегов малины в начале эксперимента можно с уверенностью констатировать, что процент приростов при использовании всех изученных штаммов *Pseudomonas Migula* и при всех разведениях был выше чем в контроле, где прирост составил 62,7%, а при использовании обработки штаммами минимальный прирост составил 68,75%

при использовании штамма *Pseudomonas chlororaphis* 16Н и разведении 1:10 и максимальный прирост 169,9% при использовании штамма *Pseudomonas protegens* P4-2 в разведении 1:5. Использование при обработки субстратов изученных штаммов *Pseudomonas* в разведение культур к 1:5 давало большие приросты, по сравнению с разведением 1:10.

Рис. 2. Влияние обработки субстрата штаммами *Pseudomonas* Migula на развитие корневой системы растений *Rubus occidentalis* Cumberland при адаптации к условиям *ex vitro*

На рисунке 2 видно, что количество корней увеличивается при обработки всеми штаммами *Pseudomonas*, за исключением *Pseudomonas protegens* P4-2. Обработка субстратов также приводит и к увеличению длины корней *Rubus occidentalis* Cumberland в разведении 1:5 по сравнению с контролем, а в разведении 1:10 со всеми штаммами длина корней оказалась ниже, чем в

контроле, при этом наиболее сильным ингибитором выступали бактерии *Pseudomonas protegens* P4-2.

Проведенное исследование позволило установить, что на этапе адаптации растений *Rubus occidentalis* Cumberland полученных методом *in vitro* к нестерильным условиям, обработка субстрата штаммами бактерий *Pseudomonas* в разведении 1:5 достоверно увеличивает длину корней и высоту растений. В качестве ингибитора образования междоузлий выступил штамм *Pseudomonas putida* P82 в разведении 1:5, а ингибитора образования и роста корней *Pseudomonas protegens* P4-2 в разведении 1:10.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания по теме «Разработка и внедрение в практику комплексных физико-химических методов оценки состояния растений для решения задач направленного формирования устойчивых культурфитоценозов различного функционального назначения в условиях промышленных и аграрных предприятий» для создания лаборатории физико-химических методов исследования растений.

Список литературы

1. Акимова С.В., Аладина О.Н., Викулина А.Н. Особенности роста и развития двухлетних ex-vitro растений рода *Rubus* L. в зависимости от сроков адаптации и подготовки растений к доращиванию // Вестник ландшафтной архитектуры. 2013. № 2. С. 16-22.
2. Райков И.А. Совершенствование клонального микроразмножения межвидовых форм смородины чёрной и малины ремонтантного типа: дисс. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05. Брянск, 2011. 132 с.
3. Сковородников Д.Н. Особенности клонального микроразмножения in vitro и ускорение селекции новых ремонтантных форм малины: автореф. дисс. ... канд. с.-х.: 06.01.05, 03.00.12. Брянск, 2004. 20 с.
4. Деменко В.И., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Адаптация растений, полученных in vitro, к нестерильным условиям // Известия ТСХА. 2010. Вып. 1. С. 73–85.
5. Gresshoff P. Syndicate. Methods employed in planting aut Tissue culture. The horizons of tissue culture propagation // A seminar directed by Dr. R.A. de Fossard for the N.S.W. association of Nurserymen Ltd. At the University of Sydney. 3-4 Desember. Sydney (Australia):University of Sydney, 1977. Pp. 106–108.

6. Акимова С.В., Аладина О.Н., Киркач В.В., Викулина А.Н., Глинушкин А.П. Эффективность применения модификаций препарата суперстим в малых дозах на этапе индукции ризогенеза растений рода *Rubus* L. с учетом последствий на этапе адаптации // Достижения науки и техники АПК. 2017. Т. 31. № 2. С. 39-44.
7. Акимова С.В., Викулина А.Н., Деменко В.И., Аладина О.Н. Влияние хитозансодержащих препаратов на рост и развитие *ex vitro* растений рода *Rubus* L. на этапах адаптации и дорастивания // Плодоводство и ягодоводство России. 2016. Т. 46. С. 25-28.
8. Викулина А.Н. Адаптация растений рода *Rubus* L., размноженных *in vitro*, и оценка их последующего развития автореферат дис. ... кандидата сельскохозяйственных наук / Российский государственный аграрный университет-Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева. Москва, 2016 24 с.
9. Preece, J.E. (2002). The most tricky part of micropropagation: establishing plants in greenhouses and fields. Comb. Proc. Intern. Plant Propagators' Soc., vol. 51, pp. 300–303.
10. Муратова С.А. Размножение ягодных культур *in vitro* / Муратова С.А., Янковская М.Б., Соловых Н.В., Тюленев В.М. //Плодоводство. Ин-т плодоводства Нац. акад. наук Беларуси. Самохваловичи. 2004. Т. 15. С. 232-236.
11. Ван-Ункан Н.Ю. Регенерация растений колонновидных слаборослых генотипов яблони из эксплантов различного происхождения автореф. дисс. ... канд. с.-х.: 06.01.05. Мичуринск-наукоград РФ. 24 с.
12. Chizhik O.V., Filipenya V.L., Reshetnikov V.N. Optimization of Agrobacterial Transformation Methods for Woody Plant Crops // Биологически активные вещества растений - изучение и использование : Материалы Международной научной конференции. Беларусь, Минск, 29-31 мая 2013. Минск: ЦБС НАН Беларуси. - 2013. - С.352-353.
13. Eva Arrebola, Sandra Tienda, Carmen Vida, Antonio de Vicente and Francisco M. Cazorla Fitness Features Involved in the Biocontrol Interaction of *Pseudomonas chlororaphis* With Host Plants: The Case Study of PcPCL1606 // Front. Microbiol., 10 April 2019 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00719>.
14. Alban Ramette, Michele Frapolli, Marion Fischer-LeSaux, C. Gruffaz, Jean-Marie Meyer, Geneviève Défago, Laurent Sutra, Yvan Moëgne-Loccoz *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin // Systematic and

Applied Microbiology Volume 34, Issue 3, May 2011, Pages 180-188.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.005>.

15. Lázaro Molina, Ana Segura, Estrella Duque, Juan-Luis Ramos Chapter Four - The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment // Advances in Applied Microbiology Volume 110, 2020, Pages 149-180.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.12.002>.