

**П.Є. Арданов³, С.В. Лященко², О.В. Подоліч¹,
В.Б. Рязанцев², І.Є. Заєць¹, Н.О. Козировська¹**

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Інститут картоплярства УААН, Немішаєве, Київської обл.

³ Університет м. Оулу, Фінляндія

ЗАСТОСУВАННЯ ЕНДОФІТНИХ БАКТЕРІЙ ДЛЯ АДАПТАЦІЇ РОСЛИН КАРТОПЛІ *IN VITRO* ДО УМОВ *EX VITRO* З МЕТОЮ ЗАХИСТУ ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ФІТОПАТОГЕНІВ



Закладено наукову основу для розробки біотехнології адаптації рослин картоплі *in vitro* і праймування її природної імунності ендоефітними бактеріями. Бактеризація оздоровленої картоплі штамми *Methylobacterium radiotolerans* ІМБГ290 та *Pseudomonas putida* ІМБГ294 при переведенні до умов *ex vitro* дала можливість підвищити приживлення рослин і сформувати повноцінну розсаду, а також уникнути обов'язкового застосування високоартісних пестицидів. Урожайність мінібульб у розсади, отриманої від оброблених бактеріями живців, перевищила контрольні більш ніж на 50 %. Крім того, зросла кількість і маса бульб. Праймуючий потенціал *M. radiotolerans* ІМБГ290 проти патогенів картоплі з різними стратегіями враження є сортоспецифічним. Позитивний ефект від праймування рослин, отриманий після обробки живців при мікророзмноженні, зберігається у наступному поколінні.

Ключові слова: ендоефітні бактерії, картопля *in vitro*, адаптація *ex vitro*, захист картоплі.

ЕКОЛОГІЧНО БЕЗПЕЧНІ СПОСОБИ ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ПАТОГЕННОЇ МІКРОФЛОРИ ПРИ АДАПТАЦІЇ ДО УМОВ *EX VITRO*

За оцінками Організації з питань продовольства та сільського господарства при ООН у світі щорічно виробляється більше 300 млн. т картоплі (www.fao.org). Останнім часом досить широко використовують розмноження та оздоровлення рослин в умовах *in vitro*. Обсяги виробництва оздоровленої розсади картоплі тільки в окремих технологічних центрах сягають мільйонів рослин на рік (www.redbio.org), також зростає і виробництво мінібульб (<http://www.minitubers.co.za>). Подібні технології потребують розробки екологіч-

но безпечних способів захисту рослин від патогенної мікрофлори при адаптації до умов *ex vitro*, щоб запобігти значній втраті рослин під час перенесення у відкритий ґрунт.

Окрім фізіологічних та анатомічних відхилень, які з'являються під час культивування в асептичних умовах, пробіркові рослини практично втрачають механізми стійкості до фітопатогенів, що ускладнює їх виживання у відкритих ґрунтах [1]. Використання бактерій для індукування системної стійкості рослин як альтернативи агрохімічним засобам має низку очевидних переваг. Зокрема, маніпуляція зі структурою ризосферної асоціації бактерій за рахунок інтродукції корисних штамів бактерій є дієвим інструментом впливу як на стійкість рослин до фітопатогенних мікроорганізмів та інших стресорів, так і на їхній роз-

виток у цілому завдяки покращенню живлення та активування клітинного метаболізму.

Збільшення обсягів розмноження рослин в умовах *in vitro* стимулювало розвиток нових методів, які дають можливість отримувати стійкі асоціації між рослинами та корисними бактеріями для подолання трансплантаційного стресу у пробіркових рослин [2, 3].

У наших роботах, які проводяться із середини 90-х рр. минулого століття, показано, що бактерії родів *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium* позитивно впливають на розвиток живців тююну [4], пшениці [3], картоплі [1, 5].

У процесі клонального мікророзмноження кількість ендемних бактерій всередині тканини картоплі зменшується у вегетативних поколіннях, тому живці стають більш вразливими в умовах *ex vitro* [1]. Кількістю ендofітів рослини можна керувати за допомогою введення бактерій у культуру рослини. Так, праймування картоплі *in vitro* штамми *Pseudomonas* sp. ІМБГ163 або *Methylobacterium* sp. ІМБГ294 збільшує різноманіття ендofітних бактерій у регенерантах, що корелює із підвищеною стійкістю регенерованої рослини до трансплантаційного стресу [6, 7]. Не менше 30 % ізолятів ендofітних бактерій картоплі, активованих штамом ІМБГ163 *in vitro*, виявляють антагоністичну активність до бактерійних патогенів *Pectobacterium atrosepticum* та *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [6]. Ендofіти картоплі індують системну стійкість рослин та оптимізують їхнє мінеральне живлення [8].

На основі отриманих результатів обробки картоплі *in vitro* ендofітними та ризобактеріями при розмноженні клонуванням було запропоновано модифікацію схеми процесу одержання насінневого матеріалу картоплі введенням стадії біопраймування [5]. Використання бактерій *Pseudomonas* sp. ІМБГ163, *Pseudomonas* sp. ІМБГ287, *Methylobacterium* sp. ІМБГ290 та ін. дає змогу пристосувати рослини, отримані в умовах клонального мікророзмноження, до умов *ex vitro*.

У даному проекті приділено увагу розробці біотехнології адаптації рослин картоплі *in vitro*

і праймування за допомогою ендofітних бактерій картоплі її природної імунності, яка послаблюється у процесі клонального мікророзмноження.

КОРЕЛЮВАННЯ МІЖ ОБРОБКОЮ ЖИВЦІВ ЕНДОФІТАМИ ТА ЇХНІМ ВИЖИВАННЯМ В УМОВАХ *EX VITRO*

Рослини картоплі в умовах *in vitro* легко уражаються фітопатогенами та шкідниками після перенесення їх у нестерильний субстрат у теплиці. Звичайною практикою є використання протруйників для супресії патогенів у субстраті при акліматизації живців в умовах *ex vitro*. Замість хімічних пестицидів, які традиційно використовують для попередження зараження і розмноження мікробіоти ззовні, застосовують інокулювання субстрату непатогенними бактеріями або комерційним бакпрепаратом [5]. У цьому проекті при трансплантації живців у нестерильний субстрат не вносили нічого: бактеріями обробляли рослину у процесі живцювання за 2 місяці до перенесення в тепличні умови.

Для інокуляції картоплі сорту Повінь нами було відібрано два штами ендofітних бактерій, виділених з картоплі, — *P. putida* ІМБГ294 та *M. radiotolerans* ІМБГ290 [1, 6]. Пробіркові рослини даного сорту, які попередньо пройшли оздоровлення від вірусів в інституті картоплярства УНААН, обробляли суспензією бактерій при клональному мікророзмноженні. Отримані інокульовані та неінокульовані рослини-регенеранти картоплі через два місяці було використано для живцювання і висаджено у вермикуліт для адаптації. Контрольні рослини були або оброблені комерційним бактеріальним препаратом КЛЕПС® (позитивний контроль) або залишені без будь-якої обробки (негативний контроль). Варто також підкреслити, що попередньо оброблені експланти не обробляли перед висадкою у ґрунт.

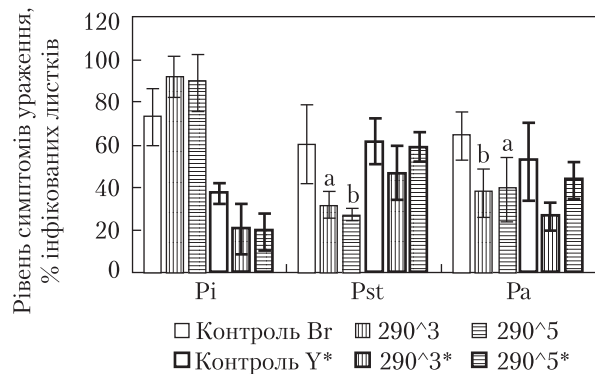
Приживлення живців картоплі, отриманих з рослин картоплі в умовах *in vitro*, після обробки різними препаратами становило: *M. radiotolerans* ІМБГ290 – 94 %, *P. putida* ІМБГ294 –

92 %, протруйник – 91 %, контроль – 25 %. Відповідно вихід повноцінної розсади становив для *M. radiotolerans* ІМБГ290 – 91 %, для *P. putida* ІМБГ294 – 90 %, протруйник – 89 %, контроль – 0 %. Отже, бактеризація оздоровленої картоплі на стадії переведення до умов *ex vitro* штамми *M. radiotolerans* ІМБГ290 та *P. putida* ІМБГ294 дала можливість підвищити приживлення рослин і сформувати повноцінну розсаду, а також уникнути обов'язкового застосування високовартісних хімічних пестицидів, котрі шкодять здоров'ю людей, знижують різноманітність природних популяцій бактерій та порушують екологічну рівновагу.

Іншим важливим висновком є те, що рослини, оброблені ендоситами у процесі живцювання, набули стійкості до трансплантаційного стресу. Набуття стійкості до абіотичних стресорів є відомою ознакою окремих бактерій, які індукують у рослин стійкість до високого вмісту солей, посухи, осмотичного тиску тощо [10, 11]. У нашому дослідженні таку ознаку мали ендосити картоплі.

ЕНДОФІТНА БАКТЕРІЯ *METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS* ІМБГ290 МАЄ СОРТОСПЕЦИФІЧНИЙ МЕХАНІЗМ ПРАЙМУВАННЯ

Залежно від стратегії взаємодії з рослиною (некротрофія, біотрофія) бактерія виробляє механізм захисту [12]. З огляду на це праймуючий потенціал *Methylobacterium* sp. ІМБГ290 проти патогенів картоплі з різними стратегіями ураження (*Pectobacterium artrosepticum*, *Pa*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000, *Pst*, *Phytophthora in-*



Прояв симптомів хвороб у живців картоплі сортів Біла Роза та Явір, інокульованих *Methylobacterium* sp, ІМБГ290 (290) при концентраціях 10^3 (290³) та 10^5 (290⁵) ККО г⁻¹ після обробки *Phytophthora infestans* (*Pi*) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) та *Pectobacterium artrosepticum* (*Pa*), 8 (*Pi*) та 5 (*Pst*, *Pa*) діб після інфікування ($M \pm m, n = 5$). Контроль – необроблені рослини. Літерами *a* та *b* позначено достовірну різницю між обробленим та контрольним варіантами, визначену за допомогою критерію Стьюдента ($a < 0,05$; $b < 0,01$).

festans, *Pi*) досліджували на двох сортах Біла Роза та Явір у тепличних умовах (рисунок).

Штам ІМБГ290 не впливає суттєво на формування стійкості у картоплі до *Pi*. Проте стійкість до *Pst* та *Pa* була помітною у сорту Біла Роза незалежно від концентрації клітин в інокуляті, але не виявлялася у сорту Явір. Набута стійкість до бактерійних патогенів могла бути зумовленою високою швидкістю колонізації рослини метилобактерією. Займаючи ті самі ніші на рослині, що й фітопатогени, бактерія попереджає хворобу рослини-хазяїна, проте

Урожайність мінібульб картоплі сорту Повінь після обробки живців бактеріями

Варіант	Розмір бульб, мм						Урожай, г/м ²
	>60		30–60		<30		
	Кількість, шт	Маса, г	Кількість, шт	Маса, г	Кількість, шт	Маса, г	
Контроль (без обробки)	15	158	22	77	20	23	258
<i>P. putida</i> ІМБГ294	25	336	36	228	17	25	589
<i>M. radiotolerans</i> ІМБГ290	22	345	35	224	9	7	576
НІР ₀₅	1,95	6,01	3,45	8,57	2,46	2,88	13,96

ця активність є сортоспецифічною і залежить або від генотипу рослин, або від структури резидентної ендоефітної спільноти. Варто зазначити, що вибіркова здатність впливати на рослини одного виду з по-дібним генотипом (сортоспецифічність) тим чи іншим чинником відома і для інших ендоефітних бактерій [13].

Експерименти у теплиці підтвердили наші попередні дані про формування стійкості у картоплі до патогену *Ra* в умовах *in vitro*. У попередніх експериментах в агаризованому середовищі формування захисної реакції рослини залежало від розміру популяції бактерії під час інокулювання. У тепличних умовах, коли рослина росте у субстраті вермікуліті, активність системи *рослина–бактерія* не залежить від титру інокулянту, і відносини складаються більш природнім шляхом, ніж у пробірці.

ЗБЕРЕЖЕННЯ НАСЛІДКІВ ПРАЙМУВАННЯ ЖИВЦІВ ЕНДОФІТНИМИ БАКТЕРІЯМИ У НАСТУПНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ПОКОЛІННЯХ

Сформовану у тепличних касетах розсаду висаджували у польовий ґрунт для формування мінібульб, при цьому її не обробляли повторно бактеріями, сподіваючись на залишковий ефект від інокулювання живців. Після висадки отриманої розсади у ґрунт урожайність мінібульб була вищою у тих варіантах, де живці попередньо обробляли бактеріями у пробірках (таблиця) і становила для *M. radiotolerans* ІМБГ290 – 576 г/м², для *P. putida* ІМБГ294 – 589 г/м², що на 50 % більше порівняно з відповідними контрольними. Як видно з даних таблиці, у варіантах з бактеріями зростає кількість і маса бульб першої фракції. Таким чином, позитивний вплив бактерій на розсаду сприяє збільшенню врожаю мінібульб з мінімальними витратами, без застосування протруйників і будь-якої обробки посадкового матеріалу.

З наведених даних можна зробити висновок, що ефект від праймування рослин, отриманий після обробки живців при мікророзмноженні, зберігається у наступному поколінні. Такий ефект можливий при епігенетичному

наслідуванні набутих характеристик у рослин. Наразі відомо, що рослини у стресовому стані успадковують епігенетичні зміни [14, 15].

Отже, експериментально встановлено, що інокуляція рослинного матеріалу ендоефітними бактеріями *M. radiotolerans* ІМБГ290 і *P. putida* ІМБГ294 сприяє адаптації пробіркових рослин картоплі до умов *ex vitro* без застосування агрохімікатів, а також дає можливість зберегти до 90 % повноцінної розсади картоплі. Показано, що інокуляція живців картоплі *M. radiotolerans* ІМБГ290 і *P. putida* ІМБГ294 збільшує урожай мінібульб до 50 %. Позитивний ефект праймування рослин, отриманий після обробки живців при мікророзмноженні, зберігається у наступному поколінні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Подоліч О.В., Литвиненко Т.Л., Вознюк Т.М. та ін. Виявлення угруповань ендоефітних бактерій в асептичних рослинах картоплі після інокуляції *Pseudomonas* sp. ІМБГ 163 // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. – 2006. – № 18. – С. 165–170.
2. Frommel M.I., Novac J., Lazarovits G. Growth enhancement and developmental modifications *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. // Plant Physiol. – 1991. – **96**. – P. 928–936.
3. Петак А., Туряница А., Козыровская Н. Изучение влияния бактерий рода *Klebsiella* на регенерационные процессы // Физиология и биохимия культурных растений. – 1998. – **28**, N 4. – С. 240–246.
4. Kozyrovska N., Petak A., Belavska N., et al. Interrelationships of *Klebsiella* with the plant: early events // Abstract Book 10th International Congress on Nitrogen Fixation (28 May – 3 June). – S. Petersburg, Russia, 1995. – P. 134.
5. Ковальчук М.В., Рязанцев В.Б., Костюк І.І., Козыровська Н.О. Праймування корисними бактеріями в технологічному процесі клонального мікророзмноження картоплі // Вісн. аграр. науки. – 2005. – N 7. – С. 43–45.
6. Podolich O.V., Ardanov P.E., Voznyuk T.M., et al. Endophytic bacteria from potato *in vitro* activated by exogenic non-pathogenic bacteria // Biopolymers and Cell. – 2007. – **23**, N 1. – P. 21–28.
7. Podolich O., Laschevskyy V., Ovcharenko L., et al. *Methylobacterium* sp. resides in unculturable state in potato tissues *in vitro* and becomes culturable after induction by *Pseudomonas fluorescens* IMGB163 // J. Appl. Microbiol. – 2009. – 116. – P. 728–739.

8. Zaetz I. E., Kozzyrovska N.O. Effect of a bacterial consortium on oxidative stress in soybean plants in cadmium-contaminated soil // *Biopolymers and Cell*. — 2008. — 24, N 3. — P. 246–253.
9. Ковальчук М.В., Рязанцев В.Б., Костюк І.І., Козировська Н.О. Біопраймування у технологічному процесі клонального мікророзмноження картоплі (*Solanum tuberosum* L.) // Вісник аграрної академії наук. — 2005. — N 7. — С. 43–45.
10. Sziderics A.H., Rasche F., Trognitz F., et al. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) // *Can. J. Microbiol.* — 2007. — 53. — P. 1195–1202.
11. Yang J., Klopper J.W., Rye C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress // *Trends in Plant Science*. — 2009. — 14. — P. 1–4.
12. Spoel S.H., Johnson J.S., Dong X. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles // *Proc Natl Acad Sci. USA*. — 2007. — 104. — P. 18842–18847.
13. Trognitz F., Scherwinski K., Fekete A., et al. Schmitt-Kopplin P., Trognitz B., Sessitsch A. Interaction between potato and the endophyte *Burkholderia phytofirmans* // *Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*. — 2008. — P. 63–66.
14. Molinier J., Ries G., Zipfel C., Hohn B. Transgenerational memory of stress in plants // *Nature*. — 2006. — 442. — P. 1046–1049.
15. Boyko A., Kathiria K., Zemp F.J., et al. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — 35. — P. 1714–1725.

П.Е. Арданов, С.В. Лященко, О.В. Подолич,
В.Б. Рязанцев, И.Е. Заец, Н.А. Козыровская

ПРИМЕНЕНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ
ДЛЯ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ
IN VITRO К УСЛОВИЯМ EX VITRO
С ЦЕЛЬЮ ЗАЩИТЫ ПОСАДОЧНОГО
МАТЕРИАЛА ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ

Заложено научную основу для разработки биотехнологии адаптации растений картофеля *in vitro* и праймирования их естественной иммунности эндофитными бактериями картофеля. Бактеризация оздоровленного кар-

тофеля штаммами *Methylobacterium radiotolerans* ИМБГ290 и *Pseudomonas putida* ИМБГ294 при переводе в условия *ex vitro* позволила повысить приживление растений и сформировать полноценную рассаду, а также избежать обязательного применения дорогостоящих пестицидов. Урожайность миниклубней у рассады, полученной от обработанных бактериями черенков, превысила контроль более чем на 50 %. Кроме того, возросло количество и масса клубней. Праймирующий потенциал *M. radiotolerans* ИМБГ290 против патогенов картофеля с различными стратегиями поражения является сорто-специфическим. Положительный эффект от праймирования растений, полученный после обработки черенков при микроразмножении, сохраняется в следующем поколении.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, картофель *in vitro*, адаптация *ex vitro*, защита картофеля.

P.Eu. Ardanov, S.V. Lyastchenko, O.V. Podolich,
V.B. Ryazantsev, I.Eu. Zaets, N.J. Kozzyrovska

USE ENDOPHYTIC BACTERIA FOR ADAPTATION
OF IN VITRO-GROWN POTATO PLANTS
TO EX VITRO CONDITIONS AND PROTECTION
OF PLANTING MATERIAL
FROM PHYTOPATHOGENS

A scientific approval for the development of biotechnology for adaptation of potato plants *in vitro* and their natural immunity priming by potato endophytic bacteria has been founded. Bacterization of healed potato by strains *Methylobacterium radiotolerans* IMBG290 and *Pseudomonas putida* IMBG294 at transferring to *ex vitro* conditions' allowed to increase the plants engraftment and forming of valuable seedlings, and to avoid mandatory use of expensive pesticides. Minituber yield of seedlings obtained from inoculated cuttings exceeded control more than 50 %. In addition, the number and weight of tubers increased. Priming potential of *M. radiotolerans* IMBG290 against potato pathogens with different strategies is a sort-specific. The positive effects of plant priming obtained after cuttings treatment during micropropagation preserved in the next generation.

Keywords: endophytic bacteria, *in vitro*-grown potato, *ex vitro* adaptation, potato protection.

Надійшла до редакції 01.04.10