

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБОУ ВО «САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ, ФИЦ
«САРАТОВСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РАН»



ПРИМЕНЕНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ КАРТОФЕЛЯ

Методические рекомендации

УДК 615.012.6
ББК 28.4

Составители:
Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Загоруйко М.В., Бурыгин Г.Л.

Применение ризосферных бактерий при микроклональном размножении картофеля. Методические рекомендации / Составители: О.В. Ткаченко, Н.В. Евсеева, Загоруйко М.В., Г.Л. Бурыгин, – Саратов: Амирит, 2021. – 44 с.

ISBN 978-5-00140-925-0

Методические рекомендации составлены по результатам анализа научной литературы и собственных исследований авторов по применению ризосферных рост-стимулирующих бактерий при микроклональном размножении картофеля. В состав рекомендаций включены методики культивирования растений картофеля и ризосферных бактерий, создания активных растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro*, контроля содержания бактерий и их активности в отношении микрорастений. Материал ориентирован на научных работников, аспирантов и студентов биологических и сельскохозяйственных направлений подготовки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-016-00116.

УДК 615.012.6
ББК 28.4

Материалы изданы в авторской редакции

ISBN 978-5-00140-925-0

© Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Загоруйко М.В., Бурыгин Г.Л. 2021

Содержание

	Стр.
Введение	4
1. Микрклональное размножение растений: основы метода	5
1.1 Основы метода, способы и этапы культивирования	5
1.2 Способы создания асептических условий	8
1.3 Приготовление питательных сред для культивирования клеток и тканей <i>in vitro</i>	9
1.4 Вычленение апикальных меристем и регенерация растений	13
1.5 Микрочеренкование стерильных проростков	14
1.6 Укоренение микропобегов и адаптация к почвенным условиям	15
1.7 Выращивание растений до получения конечной продукции (мини-клубней)....	17
1.8 Определение физиолого-морфологических параметров микрорастений на ста- дии <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i>	19
1.9 Определение физиолого-морфологических параметров растений на стадиях бу- тонизации и цветения. Оценка урожайности растений	21
2. Создание и определение активности растительно-микробных ассоциаций	22
2.1 Выделение бактериальных штаммов с поверхности и внутренних тканей расте- ний	22
2.2 Характеристика физиолого-биохимических свойств бактериальных культур ...	24
2.3 Оценка гидрофобности поверхности бактериальных клеток. Метод солевой аг- регации. Метод адгезии в углеводородах	29
2.4 Инокуляция микрорастений бактериальной суспензией	30
2.5 Измерение физиолого-биохимических показателей растений	31
2.6 Выявление бактерий в различных частях растений (корни, стебли, листья) и в среде культивирования	36
2.7 Иммунохимическая детекция бактерий и их количества в среде и на растениях..	37
Заключение	41
Список используемой и рекомендуемой литературы	43

ВВЕДЕНИЕ

Микроклональное размножение – одно из направлений агробιοтехнологии, имеющее наибольшее коммерческое применение в настоящее время. Десятки отечественных и сотни иностранных компаний производят посадочный материал многих вегетативно размножаемых культур. Обязательным этапом современного семеноводства картофеля является получение оздоровленного посадочного материала биотехнологическим методом в культуре *in vitro*. ГОСТом 33996-2016 предусматривается категория семенного картофеля – «оригинальный семенной картофель», которая включает оздоровленный исходный материал, в том числе микрорастения, микроклубни и мини-клубни, полученные в культуре *in vitro*.

Основы метода микроклонального размножения были заложены французским учёным Жоржем Морелем в конце 50-х годов XX столетия. Значительный вклад в активное развитие метода вложили отечественные ученые Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН под руководством чл.-корр. РАН, академика РАСХН Бутенко Р.Г. Сейчас технологии микроклонального размножения *in vitro* на лабораторном уровне разработаны более чем для 2400 видов растений.

Важнейшим условием культивирования растений в культуре *in vitro* считается создание асептических условий. На этапе введения в культуру *in vitro* значительные усилия прилагаются для стерилизации исходных эксплантов. Освобождение от всех видов микрофлоры и вирусов позволяет оздоравливать посадочный материал. При этом на этапе высадки полученных микрорастений в почву возникает ряд проблем, в том числе воздействие на растения естественного почвенного микроценоза.

Для решения данной проблемы предлагается проводить инокуляцию микрорастений перед высадкой в нестерильные условия ризобактериями или грибами. В том числе для этой цели могут быть использованы ризосферные бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, получившие название PGPR (от *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* – ризобактерии, способствующие росту растений). Nowak (1998) предложил термин «бактеризация» для обозначения приема инокуляции эксплантов *in vitro* и микрорастений, подчеркнув преимущества роста микрорастений, инокулированных ризобактериями. Ризосферные бактерии в составе растительно-микробных ассоциаций способны стимулировать рост микрорастений на этапе культивирования *in vitro*, а также повышать их адаптационную способность при посадке в почву (*ex vitro*) и способствовать повышению продуктивности растений.

Далеко не все рост-стимулирующие бактерии могут быть с успехом применены для создания растительно-микробных ассоциаций *in vitro*. Круг видов ризосферных бактерий, пригодных для биотизации *in vitro*, достаточно узок, что объясняется слабой разработанностью методических приемов метода. Представляемые рекомендации по применению ризосферных бактерий при микроклональном размножении растений содержат как известные, так и оригинальные методики культивирования растений картофеля и ризосферных бактерий, создания активных растительно-микробных ассоциаций в культуре *in vitro*, контроля содержания бактерий и их активности в отношении микрорастений.

1. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

1.1 ОСНОВЫ МЕТОДА, СПОСОБЫ И ЭТАПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Свое название технология микрোকлонального размножения получила от термина «клон» (от др. греч. *κλών* – веточка, побег, отпрыск), который предложил Веббер в 1903 г. Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов XX столетия и связаны с именем французского ученого Готре. С 60-х годов прошлого века были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и многих других растений, разработаны промышленные технологии, активно внедряемые в практику современного сельского хозяйства.

Микрোকлональное размножение *in vitro* основано на естественной способности клеток растений восстанавливать целостность организма из одной клетки, названное Хаберландом свойством тотипотентности. Культивирование растительных эксплантов (органов или частей исходных растений) на искусственных питательных средах в асептических условиях позволяет не только получать отдельные регенеранты, но и массово размножать их в условиях *in vitro*.

Основными преимуществами метода являются: возможность массового ускоренного размножения генетически идентичных копий ценных генотипов (до 100 тыс. – 1 млн. клонов); оздоровление посадочного материала; ювенилизация донорных особей; отсутствие сезонности; автоматизация процессов.

Однако не все разработанные в сугубо лабораторных условиях методики применимы непосредственно в производстве. Часто требуется решение отдельных узловых моментов для конкретных видов растений. Сложным этапом выращивания для большинства культур является адаптация полученных микрোকлонов к естественным условиям выращивания, что объясняется особенностями анатомо-морфологического строения микрорастений и их гнотобионтным статусом. Немаловажным является и вопрос экономической эффективности метода.

Для разных видов растений разработаны специальные методы микрোকлонального размножения (рис. 1).

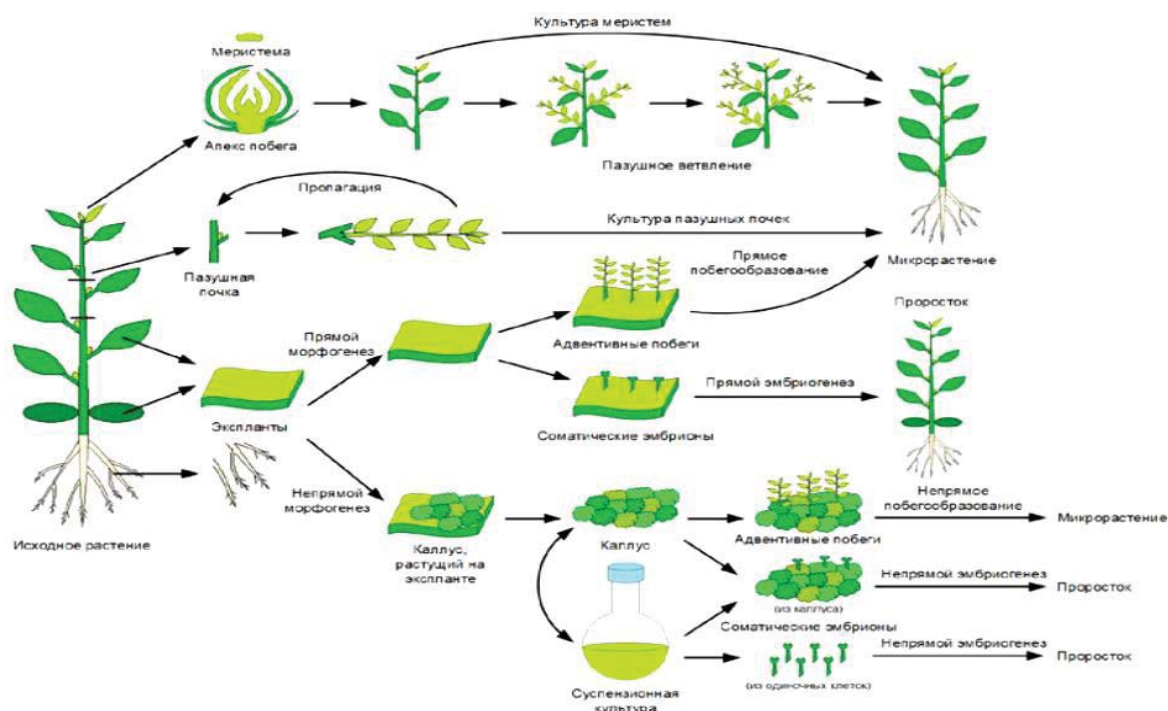


Рисунок 1. Методы микрোকлонального размножения растений (Демчик В. с соавт. Наука и инновации. 2019. №6)

Наиболее широко используется метод активирования уже существующих в растениях меристем из верхушечной или пазушных почек побега. Под действием фитогормонов непосредственно в тканях экспланта (листа или побега) могут быть вновь сформированы адвентивные почки. При использовании обоих методов из почек формируются побеги, которые далее микрочеренкуются (рис. 2) или провоцируется формирование множества новых почек. Первый метод применяется, например, для картофеля, а второй – для земляники.

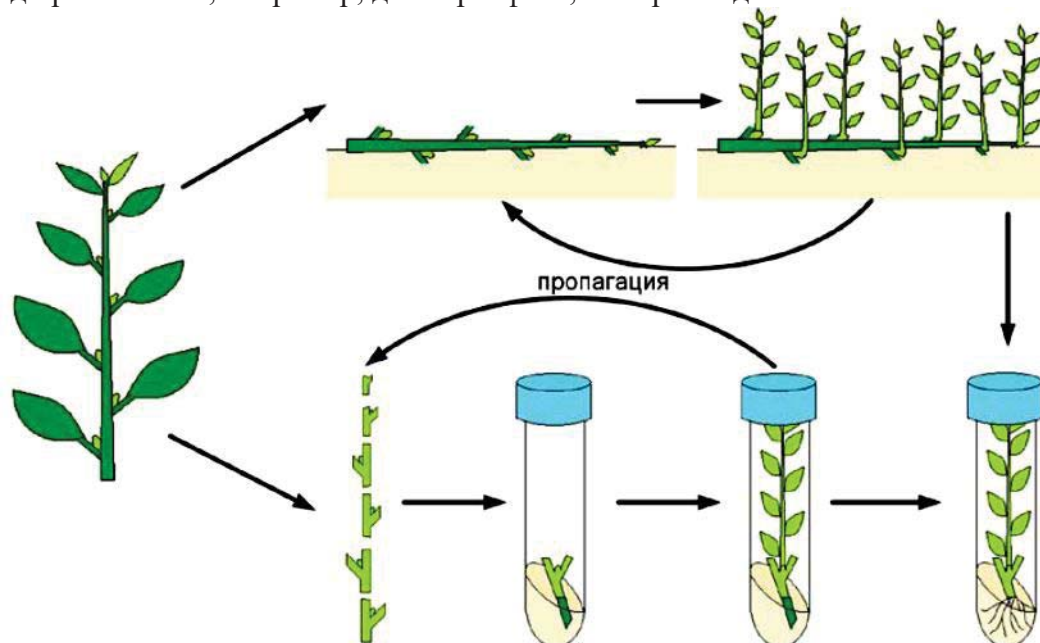


Рисунок 2. Пролиферация побегов путем снятия апикального доминирования и микрочеренкования побегов (Демчик В. с соавт. Наука и инновации. 2019. №6)

Для некоторых видов растений такие методы микроклонального размножения не подходят (например, для однодольных, в том числе злаков). В этом случае микроразмножения добиваются путем соматического эмбриогенеза, при котором из отдельных инициальных клеток добиваются формирования зародышеподобных структур (эмбриоидов) (прямой эмбриогенез) или получения из тканей экспланта каллуса – дедифференцированной ткани, в которой формируются эмбриоиды (непрямой эмбриогенез) или меристематические очаги, дающие начало почкам и побегам (органогенез).

Процесс микроклонального размножения можно разделить на четыре этапа:

- выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества микроклонов;
- укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°, +10 °С);
- выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Для успешного микроклонального размножения важным этапом является создание активно растущей культуры *in vitro*. На этапе введения в культуру *in vitro* значительные усилия прилагаются для получения асептической культуры. Разработаны различные протоколы стерилизации исходных эксплантов, включающие: предварительную очистку и мытье частей растений, из которых будут вычленены экспланты; подбор стерилизующих растворов, их концентрации и времени экспозиции; промывку дистиллированной водой для удаления стерилизующих агентов.

Максимального коэффициента размножения добиваются выбором оптимального способа культивирования и применением высоких доз фитогормонов ауксинов и цитокининов, а также некоторых органических компонентов, способных стимулировать рост микропобегов (аминокислот, гидролизата казеина, инозита и др.).

На этапе укоренения обычно применяются фитогормоны ряда ауксинов (индолилуксусная, индолилмасляная, нафтилуксусная кислоты и др.). Для некоторых видов растений этап укоренения может быть сложным и в значительной степени зависящим от генотипа сорта.

Этап адаптации, как уже отмечалось, может быть сопряжен с существенными трудностями. Необходимо тщательно подбирать почвенный субстрат, поддерживать условия повышенной влажности, не допускать резкой контаминации микроорганизмами окружающей среды. Адаптация разных видов растений может занимать от нескольких дней до нескольких недель. Эффективность приживаемости микрорастений может оказать существенное влияние на рентабельность всего процесса.

Все описанные этапы культивирования растений в культуре *in vitro* проводятся в условиях строгого соблюдения асептических условий. Проникновение в культуральные сосуды спор плесневых грибов или бактерий приводит к активному росту микроорганизмов и контаминации культуры. Грибы и бактерии, способные потреблять компоненты питательной среды, активно растут и размножаются, образуя плотные пленки, выделяя в среду культивирования продукты обмена и оказывая фитотоксичное влияние на клетки и ткани растений. Обычно это приводит к угнетению и гибели растений.

Тем не менее, было обнаружено, что некоторые штаммы бактерий не только не угнетают, но способны стимулировать рост микрорастений. Существенного повышения адаптационного потенциала микроклонов можно добиться путем создания растительно-микробных ассоциаций между микрорастениями и ризосферными стимулирующими рост растений бактериями (PGPR) еще на этапе культивирования *in vitro*.

Это направление биотехнологии растений относительно недавно было предложено мировым научным сообществом и до настоящего времени недостаточно развито. Подбор оптимальных штаммов позволяет проводить инокуляцию микроклонов еще в условиях *in vitro*. В результате повышаются темпы роста микроклонов, а также формируются защитные системы растений к абиотическим и биотическим стрессовым факторам внешней среды. Данный подход является перспективным, но сравнительно мало изученным, как для технологий культивирования посадочного материала *in vitro*, как при тепличном выращивании, так и в условиях аэропоники.

Первым обнаружил положительное влияние штаммов *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida* на укоренение и акклиматизацию микропобегов Digat с соавторами (1987). Последующие сообщения показали положительный эффект бактерий рода *Pseudomonas* в предотвращении гиперводненности (витрификации) культур орегано и малины (Shetty et al., 1995; Ueno et al., 1998). Nowak (1998) ввел термин «бактеризация» для обозначения приема инокуляции эксплантов *in vitro* и микрорастений и охарактеризовал ряд полезных эффектов, вызываемых некоторыми бактериями на культуры *in vitro*, подчеркнув преимущества роста микрорастений и после культивирования *in vitro*.

Эндофитные бактерии могут оказывать положительное влияние на растения за счет различных механизмов. Выделяют три направления положительного воздействия эндофитов на растения: улучшение условий питания (азотификсация, повышение доступности фосфора и микроэлементов), синтез стимуляторов роста (гормонов, ферментов и других органических соединений), подавление патогенов (производство сидерофоров, антибиотиков, ферментов, повышение системной устойчивости растений). Защита от абиотического стресса может быть вызвана воздействием веществ, которые модифицируют реакции на стресс или стимулируют растение активировать метаболические реакции, связанные с толерантностью к стрессу, такие как синтез осмопротекторов, например, глицин-бетаина или пролина (Dimkpa et al., 2009; Grover et al., 2011; Van Oosten et al., 2017).

Установлено, что бактерии рода *Azospirillum* способны улучшать акклиматизацию фруктовых растений к условиям *ex vitro* (Vettori et al. 2010). Нашими исследованиями также было показано, что азоспириллы активизируют развитие корневой системы микроклонов картофеля *in vitro*, стимулируют адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также способствуют увеличению урожая мини клубней (Tkachenko et al., 2015). Было обнаружено, что некоторые микроорганизмы могут быть полезны для растений в культуре *in vitro*, в горшечной культуре *ex vitro*, а также в дальнейшем в естественных условиях выращивания. Некоторые ризосферные бактерии положительно влияют на продуктивность мини-клубней картофеля при тепличном и аэропонном выращивании (Oswald, Calvo, 2009). Вероятно, предпочтительным может быть использование консорциумов микроорганизмов, которые будут имитировать, по крайней мере, частично, природный растительный микробиом, который является многочисленным, мультитиповым и многофункциональным (Owen et al., 2015).

1.2 СПОСОБЫ СОЗДАНИЯ АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

Основным условием работ с культурами клеток и тканей *in vitro* – является соблюдение абсолютной стерильности. Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводят в стерильных (асептических) условиях в стерильном боксе или ламинар-боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах, со стерильными растительными эксплантатами. В случае нарушения стерильности на средах развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Чаще всего для стерилизации помещений (боксов для пересадки тканей, культуральных комнат) используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5-2 часов (в зависимости от площади помещения). Работы в облученном помещении начинают через 15-20 минут после отключения бактерицидных ламп, так как под действием ультрафиолетового излучения двухатомный кислород воздуха становится трехатомным озоном – газом, токсичным для человека. Для достижения максимальной стерильности перед обработкой УФ все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ, поверхности ламинар-бокса обрабатывают 96 % этиловым спиртом.

Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1-2 атмосферы и температурой 120°C в течение 20-60 мин, в зависимости от объема стерилизуемого материала. Колбы, штативы со средой, вату, бумагу, халаты перед автоклавированием заворачивают в целлофановую бумагу, либо помещают в биксы.

Металлические инструменты автоклавировать нельзя, так как под действием пара образуется ржавчина. Поэтому их стерилизуют сухим жаром в термостатах с температурой 170-250°C в течение 1-2 часов.

Растительные объекты перед введением в культуру *in vitro* также тщательно стерилизуют. Предварительно части стеблей, корней, листья или корнеплоды тщательно отмывают проточной водой, иногда с моющими средствами, очищают от лишних тканей. С корнеплодов и корней снимают кожуру, с побегов – кору, с почек – кроющие чешуи.

Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащими активный хлор (хлорамином, гипохлоритом Са и Na, сулемой), бром (бромной водой), перекись водорода, спирт, нитрат серебра, диацид, антибиотики. Этиловый спирт часто применяют для предварительной стерилизации, протирая им поверхность материала или погружая материал на несколько секунд в абсолютный спирт. Иногда такой стерилизации достаточно, ее используют при работе с плодами, семенами, побегами, завязями.

Гипохлорит кальция (хлорная известь) используется в виде 5-7 % раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение 5-8 минут. Гипохлорит натрия используется в виде 0,5-5 % раствора для обработки любых эксплантов в течение 1-20 минут. Это вещество является клеточным ядом, поэтому время стерилизации и концентрацию подбирают

экспериментально. Например, для изолированных зародышей используют 2-3 % раствор в течение 10-15 минут, а для сухих семян 3-5 % раствор в течение 1 часа. Остатки гипохлорита натрия сначала удаляют 0,01 н HCl, а затем 8 раз промывают автоклавированной дистиллированной водой. Хлорамин применяют в концентрации 1-6 %. Пыльники и молодые зародыши обрабатывают в течение 1-3 минут, сухие семена – 30-60 минут, затем промывают стерильной дистиллированной водой 2-3 раза. Сулема – токсичное вещество и требует особой тщательности, как при хранении, так и при подборе концентрации для отдельных объектов. Для стерилизации зародышей используют 0,1 % раствор в течение 1-3 минут, для корне- и клубнеплодов – до 10-20 минут. Растворы, содержащие активный хлор используются 1 раз и готовят их непосредственно перед работой. Диацид используется в 0,2 % растворе для стерилизации корнеплодов, семян, кусочков, тканей, верхушечных меристем, изолированных зародышей, пыльников. Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этилмеркурхлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (330 мл), затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80; хранят в плотно закрытой колбе в темноте.

Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, инфицированного бактериями. Наиболее часто применяют стрептомицин и тетрацилин 10-80 мг/л, ампициллин 200-400 мг/л, левомецетин, канамицин и другие.

1.3 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ *IN VITRO*

Современные искусственные питательные среды для выращивания растительных клеток и тканей являются синтетическими и многокомпонентными. В состав сред входит 6 основных групп компонентов: макроэлементы, микроэлементы, источники железа, витамины, источники углерода, фитогормоны.

Основой для всех питательных сред, используемых для культивирования растительных эксплантов, является смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимых солей K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Азот, фосфор, сера входят в состав органических соединений клеток: белков, жиров, нуклеиновых кислот.

Железо используется в виде хелатов $[FeSO_4$ или $Fe_2O_3 + ЭДТА$ (этилендиаминтетрауксусная кислота) или её натриевая соль $Na_2-ЭДТА$ (трилон Б)] – в наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями. Железо, цинк, марганец, молибден, кобальт в сочетании с порфиринами образуют макромолекулы пигментов фотосинтеза (хлорофилла), окислительно-восстановительных ферментов (каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы). В то же время ионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ необходимы для регуляции pH среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

В качестве источника углерода для биологических макромолекул, а также при культивировании гетеротрофных тканей (каллусов и суспензий) в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20-60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза, мальтоза), моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза; пентозы: ксилоза и другие). Полисахариды в питательных средах практически не используются.

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют биологические катализаторы – витамины группы В (В1, В6, В12), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит. Тиамин (В1) входит в состав пируватдекарбоксилазы, участвует в превращениях углеводов. Тиаминпирофосфат входит в состав ферментов окислительного декарбоксилирования кетокислот (пировиноградной и кетоглутаровой), является ко-ферментом транскетолазы. Пиридоксин (В6) в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот. Никотиновая кислота (РР) в виде амида входит в состав дегидрогеназ НАД и НАДФ, катализирующих донорно-акцепторную цепь H^+ (отнятие H^+ от молекул органических веществ).

Для управления процессами формообразования в культуре тканей необходимы биологические регуляторы роста и развития – фитогормоны. Эти вещества влияют на дифференциацию и дедифференциацию клеток и тканей, инициируют гистогенез, индуцируют деление и растяжение клеток, участвуют в процессах старения и созревания, либо стимулируют, либо ингибируют рост и развитие клеточных культур, обуславливают формирование пола. В биотехнологических исследованиях чаще используют гормоны, стимулирующие рост и развитие: ауксины, цитокинины, гиббереллины. Ауксины: ИУК – β -индолил-3-уксусная кислота, ИМК – индолил-3-масляная кислота, НУК – α -нафтилуксусная кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота. Цитокинины: кинетин – 6-фурфуриламинопурин, зеатин, NN-дифенилмочевина, 6-БАП – 6-бензиламинопурин. Гиббереллины: гибберелловая кислота.

В качестве биологических добавок для индукции первичного каллуса можно использовать растительные экстракты (10-15 % от общего объёма среды): кокосовое молоко (жидкий эндосперм кокосового ореха), вытяжки из незрелых зерновок кукурузы (лучше в период молочной спелости), которые содержат цитокинины – кинетин и зеатин (6-ти замещенные аминопурины) и NN-дифенилмочевину.

В культуре *in vitro* применяют жидкие и агаризованные (плотные, твердые) среды. Жидкие среды используются для культивирования суспензий, каллусов, изолированных органов и тканей, растений-регенерантов. При этом для поддержания эксплантов в пробирки со средой помещают специальные мостики-поддержки из фильтровальной бумаги или синтетических пористых материалов. Агаризованные среды готовят на основе агар-агара – полисахарида, входящего в состав морских водорослей, который образует с водой гель при pH 5,6-6,0. иногда в качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогеи) P10 и P200.

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее и используют многократно. Это маточные (концентрированные) растворы. Их хранят в специальных условиях: макро- и микросоли в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при 0...+4°C; витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты – при -20°C в небольших по 5-10 мл сосудах с пробками. Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10-40 раз, микросолей – в 100-1000 раз, витаминов – в 1000 раз. Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед работой со средами.

Маточные растворы хлористого кальция и хелата железа (серноокисное железо + ЭДТА, либо Na₂-ЭДТА – трилон Б) готовят и хранят отдельно от других солей.

Для приготовления маточного раствора макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем сливают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь микросолей последним добавляют раствор солей молибдена, а в макросоли – раствор солей магния (для предотвращения выпадения осадка).

Концентрированные растворы витаминов готовят следующим образом: 10-кратные навески растворяют в 10 мл дистиллированной воды каждый отдельно.

Фитогормоны – это вещества, которые плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 100 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5-2,0 мл) спирта (ауксины, гиббереллины), 0,5-1 н HCl или KOH (цитокинины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до 100 мл объема (1 мл содержит 1 мг вещества).

Для микроклонального размножения чаще всего используется питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (1968). В таблицах 1-5 приведены состав компонентов для приготовления маточных растворов макро- и микросолей среды Мурасиге-Скуга, а также рекомендованные модификации среды для отдельных этапов культивирования тканей.

Таблица 1. Приготовление маточных растворов для среды Мурасиге-Скуга

№ п.п.	Компонент среды	Количество вещества
	Маточный раствор макросолей (г на 1 л маточного раствора)	
1.	KNO ₃	38
2.	NH ₄ NO ₃	33
3.	KH ₂ PO ₄	3,4
4.	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,4
	или MgSO ₄ безводный	3,6
5.	CaCl ₂ · 2H ₂ O	8,8
	или CaCl ₂ безводный	6,65
	Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)	
6.	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25
7.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5
8.	H ₃ BO ₃	620
9.	MnSO ₄ · 5H ₂ O	2410
	или MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230
10.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860
11.	KJ	83
12.	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5
13.	FeSO ₄	557
	Na ₂ ЭДТА	745

Таблица 2. Среда Мурасиге-Скуга (МС) для клеточных и тканевых культур

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	0,1 мг/л
Пиридоксин-HCl	0,5 мг/л
Никотиновая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Глицин	2 мг/л
Сахароза	30 г/л
pH 5,6-5,8	

Таблица 3. Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для культивирования апикальных меристем картофеля

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	1 мг/л
Витамин B ₁₂	0,015 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Фолиевая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Гидролизат казеина	1 г/л
Аденин	40 мг/л
Пантотенат Ca	10 мг/л
Рибофлавин	0,5 мг/л
Биотин	1 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
ГК	2 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Сахароза	20 г/л
Глюкоза	20 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,7-5,8	

Таблица 4. Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для микроразмножения картофеля черенкованием побегов

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	1 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Аденин	40 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Гибберелловая кислота	2 мг/л
Пантотенат Ca	10 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
Сахароза	30 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,8	

Таблица 5. Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для клубнеобразования у картофеля

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	0,5 мг/л
Никотиновая кислота	0,5 мг/л
Аскорбиновая кислота	1 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Сахароза	50 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,8-6,0	

1.4 ВЫЧЛЕНЕНИЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ

В культуре тканей можно размножать растения и получать оздоровленный (безвирусный) посадочный материал. Для оздоровления растений используют культуру апексов или культуру апикальных меристем, так как в стеблевой апекс вирусы проникают медленнее, чем в другие части растений. При культивировании апексов размножение вирусов подавляется реакцией растительного организма на травму, вызванную отсечением верхушки. Обычно на питательные среды высаживают небольшую часть меристемы до 0,5 мм.

В целом закономерность такова: чем меньше величина меристемы, тем больше вероятность получения безвирусных растений.

Биотехнология позволяет получать безвирусный оздоровленный посадочный материал практически всех сельскохозяйственных культур. Наиболее полно разработана технология получения безвирусного картофеля. Система первичного семеноводства и оздоровления посадочного материала картофеля включает следующие этапы: подготовка клубней для вычленения апикальных меристем, вычленение апикальных меристем, регенерация растений из меристем, адаптация растений-регенерантов в защищенном грунте, получение первой продукции безвирусного материала в открытом грунте, выращивание безвирусного посадочного материала в первичных звеньях семеноводства, сохранение коллекции сортов.

В культуре тканей используются апексы верхушечных и боковых почек. Чтобы исключить влияние метаболитов клубня на проростки и повысить регенерационную способность исходного материала из средней части клубня вырезают глазки с частью паренхимы (1,5 x 1,5 см). Глазки проращивают на песке, предварительно обработанном сухим жаром. Этиолированные проростки выращивают в темноте при температуре 25 + 2°C, влажности воздуха 70-80 %. Песок дважды в день увлажняют, через 7-10 дней проводят подкормку раствором Кнопа.

Апикальные меристемы проростков изолируют на 12-13 пластохроне (пластохрон – промежуток времени между инициациями двух листовых бугорков.) Изолированные меристемы культивируют в асептических условиях на питательных средах с богатым содержанием макро- и микросолей, с повышенной концентрацией цитокининов (6-БАП 2 мг/л). В культуральной комнате с кондиционированным воздухом поддерживают температуру 25 + 2°C, влажность воздуха 70 %, освещенность 5000 лк и фотопериод 16 часов.

В среднем от посадки меристемы на среду до формирования проростков с 5-6 листочками проходит 30-45 дней, в некоторых случаях от 2 до 8 месяцев. Среда по мере истощения обновляют, и проростки периодически пересаживают на новые среды в стерильных условиях.

В случае заражения посадочного материала вирусами предварительно применяют термотерапию. Клубни без бактериальных и грибковых инфекций тестируют ИФА (иммуноферментным анализом). Затем их размещают в кюветах со стерильным песком и проращивают 1-2 недели при температуре 28-30°C, 4 недели при температуре 37-38°C и влажности воздуха 70-80 %. Дважды в день песок увлажняют, через 7-10 дней проводят подкормку раствором Кнопа и микроэлементов по прописи Мурасиге-Скуга: 5 мл маточного раствора на 1 л раствора Кнопа. Клубни жаровыносливых сортов можно сразу выращивать при температуре 37-38°C и влажности воздуха 70 %. Режим тепловой обработки для каждого сорта подбирают экспериментально. В случаях заражения растений мозаичными, веретеновидными, нитевидными, палочковидными вирусами термическая обработка клубней малоэффективна. Поэтому перед термообработкой верхушки растений картофеля срезают и помещают на 5 часов в раствор гетероауксина (50 мг/л). Укорененные проростки помещают в культуральные камеры или комнату с температурой воздуха 37°C, почвы – 30-32°C, с фотопериодом 16 часов на 4-6 недель. Термообработку обычно проводят осенью и зимой. Весной из растений вычленивают апикальные меристемы от 0,3 до 1 мм и высаживают на питательные среды (МС без гормонов, pH 5,7).

Для химиотерапии используют специальные вещества-ингибиторы вирусов: ферменты, влияющие на нуклеиновые кислоты (РНК-азы). Непосредственную обработку клубней ферментом можно проводить методом инфильтрации в вакуумной камере в течение 20 минут, что приводит к большому расходу вещества. Поэтому эффективнее добавлять РНК-азы в питательные среды для культивирования апексов. РНК-аза стимулирует рост и развитие растений из апексов и ингибирует развитие вирусов. В результате применения такой технологии выращивания на 10-35 % повышается приживаемость меристем на питательных средах, на 30-40 % больше образуется растений-регенерантов.

1.5 МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЕ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОРОСТКОВ

Микрочлониальное размножение пробирочных растений осуществляют с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги. Растения, сформировавшие 5-6 листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и разрезают на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки высаживают на глубину междоузлия в питательные среды либо без гормонов, либо с добавлением ауксинов (рис. 3).

Черенки культивируют в тех же условиях, что и меристемы: при температуре 24-25°C днем и 19-20°C ночью, освещенности 5-6 клк и продолжительности фотопериода 16 часов.

Рост стебля и корней начинается на 3-4 день после посадки на питательную среду, а полностью растения формируются через 12-15 дней.

Каждое последующее черенкование проводят через 14-20 дней. Из одного растения можно получить 5-8 черенков, а через 2-3 месяца – 3-5 тыс. черенков.

Нижнюю часть растения используют для ИФА или ПЦР-тестирования на содержание вирусов. Растения, зараженные вирусами, бракуют, а здоровые дают начало мериклонам (меристематическим клонам).

Если почки или черенки высадить на питательные среды с высоким содержанием цитокининов, то образуется конгломерат почек и побегов. Полученные побеги легко отделяются друг от друга, их можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования.



Рисунок 3. Микрочеренкование побегов картофеля

1.6 УКОРЕНЕНИЕ МИКРОПОБЕГОВ И АДАПТАЦИЯ К ПОЧВЕННЫМ УСЛОВИЯМ

Для укоренения растений, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укореняются на средах с обедненным составом минеральных солей (среда Уайта, Мурасиге-Скуга, разбавленная вдвое), либо на средах с добавлением ауксинов: ИУК, НУК, ИМК.

Картофель и некоторые другие виды растений достаточно хорошо укореняются на питательной среде для микрочеренкования и не требуют дополнительного этапа укоренения. Для других видов этот этап может быть наиболее трудоемким, и от него может зависеть успех всего микроразмножения. На этапе укоренения и высадки в грунт обычно изменяют основной состав среды. Уменьшают количество солей и углеводов, исключают цитокинины и добавляют ауксины. Выбор концентрации ауксинов, необходимых для нормального укоренения по-

бегов зависит от ряда причин. Среди них назовем наследственную предрасположенность побегов к укоренению, обусловленную видовыми и сортовыми особенностями родительских растений, тип используемого ауксина, а также концентрацию и соотношение фитогормонов на этапе размножения побегов. Эффективность ауксинов при укоренении побегов в значительной мере уменьшается под влиянием высоких доз цитокининов, вносимых в питательную среду на первом и втором этапах микроразмножения. Вероятно, целесообразно при культивировании на первых этапах использовать среды сначала с более высокими, а затем – низкими концентрациями цитокининов. В некоторых случаях корнеобразование стимулируется добавлением хлорогеновой или феруловой кислот. Можно также рекомендовать обработку базальной части побегов, извлеченных из пробирок, растворами стимуляторов ауксинового типа в более высоких концентрациях в течение 3 – 6 ч, а затем укоренение их в безгормональной агаризованной среде или *ex vitro* в подходящем субстрате. Этот метод в ряде случаев предпочтительнее, чем постоянное присутствие ауксинов в среде.

Часто для стимулирования всасывающей способности корней и повышения механической прочности побегов микрорастения извлекают из пробирок и выдерживают 1-5 суток в сосудах с дистиллированной водой, накрывая полиэтиленом для повышения влажности воздуха.

Далее микрорастения высаживают в сосуды с почвенной смесью (рис. 4). Растения с листьями и развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетами. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85-90 °С в течение 1-2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют смеси в следующих соотношениях: торф : песок (3:1); торф : дерновая земля : перлит (1:1:1); торф : песок : перлит (1:1:1). Пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты, заполняют заранее приготовленным почвенным субстратом.

Известно, что относительная влажность воздуха при культивировании побегов в сосуде достигает 100%. Поэтому основной задачей акклиматизации *ex vitro* регенерированных растений является создание относительно высокой влажности воздуха в первые дни после пересадки, поскольку значительные потери воды могут привести к гибели микроклонов. Для постепенной адаптации микрорастений к условиям пониженной влажности воздуха в последние дни культивирования *in vitro* начинают открывать сосуды с растениями на несколько часов. После высадки для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают полиэтиленовыми пакетами. Без создания условий с повышенной влажностью наблюдается очень быстрое увядание листьев у регенерантов и последующая гибель растений. Возможно, что одной из причин, вызывающей гибель растений, является водный дефицит, создаваемый высокой транспирационной активностью листьев и низкой поглотительной способностью корней. Кроме того, излишние потери воды могут быть связаны с отсутствием кутикулярного воска на побегах, культивируемых *in vitro*. Для повышения выживаемости высаженных в грунт растений, проводят их закаливание: в течение 1-1,5 недель увеличивают продолжительность пребывания их на открытом воздухе. В некоторых случаях рекомендуют опрыскивать 50%-ным водным раствором глицерина или смесью парафина (жира) и диэтилового эфира (1:1). Применение этого метода помогает избежать длинных и затруднительных процессов закаливания пробирочных растений и обеспечивает 100% выживаемость.



Рисунок 4. Высадка микрорастений картофеля в сосуды с почвенной смесью

Через 20 – 30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают солями Кнудсона, Мурасиге и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста микроклонов их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания данного вида растений в теплице или в открытом грунте.

1.7 ВЫРАЩИВАНИЕ РАСТЕНИЙ ДО ПОЛУЧЕНИЯ КОНЕЧНОЙ ПРОДУКЦИИ (МИНИ-КЛУБНЕЙ)

Адаптированные растения высаживают в открытый или закрытый грунт. Для получения оздоровленного посадочного материала картофеля рекомендуются обеспечить защиту растений от переносчиков вирусов и другой инфекции. Поэтому рекомендуется использовать для доращивания растений теплицы, в том числе летние каркасные теплицы с укрывным материалом (рис. 5). Другим вариантом выращивания может служить безсубстратная система выращивания в гидропонных или аэропонных установках.



Рисунок 5. Выращивание картофеля в летних каркасных теплицах.

Перед высадкой растений в теплице мелко нарезают борозды с междурядьем 45 или 55 см. Эти борозды предварительно поливают. На предварительно политые борозды растения высаживают так, чтобы на поверхности оказалась верхушка растений с 2-3 листочками. Схема посадки в теплицу может составлять 40 x 40, 45 x 40 или 55 x 20 см. Последующие поливы производят в зависимости от высыхания почвы. Если отопление подпочвенное, то из-за быстрого испарения почва подсыхает регулярно. Когда нет необходимости на отопление (при ясной погоде солнечная радиация дает необходимое тепло для поддержания оптимальной температуры воздуха в теплице) растения не требуют частых поливов, так как теплица изолирована от внешних воздействий ветров. Через 20 дней после высадки пробирочных растений для лучшего роста производят подкормку азотным удобрением из расчета 30 кг/га д.в. Для лучшей аэрации почву необходимо рыхлить после каждого полива, совмещая с прополкой против сорняков.

Перед клубнеобразованием картофеля проводится окучивание почвы вокруг растений картофеля. Из-за изоляции от внешних вредителей применение инсектицидов исключается. При жаркой погоде открываются люки предварительно закрывая их москитными сетками, которые препятствуют проникновению тлей и др. вредителей. При необходимости может проводиться обработка инсектицидами.

Температуру воздуха необходимо поддерживать днем 25-26°C, ночью 17-18°C, при относительной влажности воздуха 70-80%. Световой день 13-14 часов можно регулировать лампами 500 Вт.

В теплицах стационарного типа при наличии отопления и дополнительного освещения мини-клубни можно получать два раза за сезон с дальнейшим их размножением в этом же году в полевых условиях. Первая посадка растений в теплицу производится в сентябре месяце и вторая уже в конце декабря или в начале января сразу же после уборки клубней. Клубни, полученные с первой посадки, проходят естественный период покоя, успевают пробудиться до высадки в открытый грунт и не требуют специальных дополнительных условий для хранения. Клубни, полученные со второй посадки для дальнейшего его размножения в полевых условиях, требуют искусственного пробуждения. Искусственное пробуждение клубней картофеля заключается в дальнейшем уходе и поливах созревших растений в теплице, не убирая их до полного пробуждения, и после отмирания ботвы. При этом способе можно не применять специальные стимуляторы роста (тиомочевину или гибберелловую кислоту).

1.8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИКРОРАСТЕНИЙ НА СТАДИИ *IN VITRO*, *EX VITRO*

Для оценки влияния факторов культивирования, в том числе ризосферных бактерий, на рост микрорастений в первую очередь проводится оценка морфометрических параметров побегов и корней. Для микрорастений картофеля имеет значение оценка длины побега, количества узлов на побеге, количества корней и длины корней. Для растений с укороченным стеблем (например, земляники) измеряют количество побегов, диаметр розетки листьев, длину большего листа.

Необходимо учитывать, что морфометрические параметры являются сильно варьирующими признаками. Для обеспечения точности определения параметров необходимо использовать не менее 30 растений, которые разбивают на 6 повторностей по 5 растений или 3 повторности по 10 растений. Это позволит провести статистическую оценку достоверности различий между вариантами опыта, используя методы вариативной статистики или дисперсионного анализа. Иногда после микрочеренкования может происходить инфицирование единичных пробирок с растениями, нарушение роста микрочеренка из-за ошибок оператора. Поэтому, при закладке эксперимента следует высаживать не менее 40 микрочеренков для отбраковки отдельных растений, значительно уклоняющихся от средних показателей выборки до начала эксперимента.

Морфометрические параметры измеряются по окончании пассажа, обычно на 30 сутки культивирования (рис. 6). Растения достают из пробирки, корни отмывают от агара. По линейке определяют длину побега от начала роста из пазушного листа исходного черенка до верхушки побега. При определении количества узлов на побеге верхушку, включая несколько сближенных листьев, без междоузлия считают за один узел. При подсчете количества корней необходимо считать корни первого порядка (без ветвления), поэтому следует внимательно определить место образования корня на микрочеренке. Длина корней определяется для каждого корня, а затем рассчитывается средняя длина корня (как среднее арифметическое длин всех корней) или суммарная длина корней (как сумма длин всех корней). При необходимости можно оценить максимальную длину корня.



Рисунок 6. Измерение морфометрических параметров микрорастений

Для оценки динамики роста микрорастений в течении пассажа морфометрические параметры могут быть измерены на 5, 10, 15, 20, 25 или на 7, 14, 21, 28 сутки культивирования. В этом случае для предотвращения потери стерильности культуры измерения могут проводиться без непосредственного контакта с растением через стекло пробирки. Следует учитывать, что такое измерение приводит к погрешностям измерения и увеличению ошибки. При таком измерении пробирки следует пронумеровать, и вносить результаты измерения под соответствующими номерами растений.

Важными показателями роста растений являются масса побегов и корней. Сырую массу определяют взвешиванием навесок побегов, корней или листьев на весах с погрешностью измерения до 0,001г. Абсолютно сухая масса определяется также взвешиванием, но после высушивания навески в термостате при температуре 105 ± 2 °С до постоянной массы в условиях, при которых полностью удаляется вода и летучие вещества. Высушивание проводится при достижении постоянного веса навески. Навеску помещают в предварительно высушенный при 150 °С и взвешенный бюкс или заворачивают во взвешенную фольгу и помещают в нагретый термостат. Высушивание проводится 6 часов, после этого навески остужают в эксикаторе и взвешивают. Затем снова проводят высушивание в течении 1-2 часов. Навески повторно остужают и взвешивают. Циклы высушивания повторяют до тех пор, пока масса не станет постоянной и разница между взвешиваниями составит менее 0,002-0,003 г. Сухую массу рассчитывают по формуле:

$$X = (c - a) / (b - a) * 100,$$

где: а - масса пустого бюкса (фольги), г; b - масса бюкса (фольги) с исходной навеской растительного материала, г; с - масса бюкса (фольги) с образцом после высушивания, г.

Наличие показателей сырой и сухой массы микрорастений позволяет рассчитать оводненность органов по формуле:

$$X = (a - b) / a * 100,$$

где: а - сырая масса; b - абсолютно сухая масса.

После высадки микрорастений в сосуды с почвой для оценки эффективности адаптации к условиям *ex vitro* важнейшим показателем является приживаемость растений через 10-20 суток, определяемая как отношение количества прижившихся растений, приступивших к росту и сформировавших новые листья, к общему количеству высаженных растений. Для сравнения эффективности роста растений в различных вариантах опыта в конце этапа адаптации и перед высадкой растений в постоянные условия выращивания (в теплицу или открытый грунт) определяют морфометрические параметры: длина побега, количество узлов на побеге, количество вновь образованных листьев, площадь вновь образованных или всех листьев (рис. 7). На первых этапах роста после высадки микрорастений картофеля листья простые овальной формы. Поэтому площадь листьев можно приблизительно рассчитать по формуле площади эллипса:

$$S = \pi * D/2 * d/2,$$

где D, d - оси эллипса, π - 3,14.



Рисунок 7. Микрорастения картофеля в сосудах с почвой на этапе адаптации к условиям *ex vitro*

Для сложных листьев необходимо определять площадь каждой доли листа.

Более точное определение площади листьев весовым методом или методом высечек часто бывает невозможно, так как приводит к потере растений и невозможности оценки дальнейших параметров их роста. Данные методы могут применяться предварительно для более точного определения коэффициента пересчета площади с учетом отклонения от формы эллипса.

По этой же причине практически не проводится измерение развития корневой системы микрорастений на этапе адаптации. Если дизайн эксперимента не предусматривает дальнейшего выращивания микрорастений в почве или при достаточном количестве растений корни растений могут быть отмыты от почвы и проведено измерение количества и длины корней, а также объема корневой системы по объему вытесняемой жидкости после погружения корней в цилиндр с водой.

В последние годы активно развиваются методы фенотипирования с использованием машинного зрения и компьютерных программ. Созданы датчики для прижизненного бесконтактного измерения площади листьев методом, например, сканеры компании LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA). Более сложные программы позволяют проводить определение морфометрических параметров растений бесконтактно и без потери растений, причем с построением 3D моделей и динамического контроля (Демидчик и др., 2020). Программное и аппаратное обеспечение разрабатываются на платформах LemnaTec (Аахен, Германия), Photon Systems Instruments (Драсов, Чехия), Phenospex (Маастрихт, Нидерланды), CropDesign (Гент, Бельгия), Optimalog (Тур, Франция), SMO и VIB (Экло, Гент, Бельгия), PHENOSCOPE (Хеерлен, Нидерланды) и другие. Пока в большинстве случаев достоверные измерения проводятся в лабораторных условиях на горшечных растениях с небольшой биомассой. С развитием метода стоит ожидать развития технологии.

1.9 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РАСТЕНИЙ НА СТАДИЯХ БУТОНИЗАЦИИ И ЦВЕТЕНИЯ. ОЦЕНКА УРОЖАЙНОСТИ РАСТЕНИЙ

В процессе вегетации растений, высаженных в почву, до получения конечной продукции, например, мини-клубней картофеля, проводят учеты фенологических фаз и морфометрических параметров. Наступление фенологических фаз (для картофеля: бутонизации, цветения, увядания ботвы) отмечают при появлении признаков фазы у 70-80 % растений. Продолжительность межфазных периодов измеряют в сутках.

Для определения морфометрических параметров у растений важнейшей фазой является фаза бутонизации-цветения, так как в это время достигается максимальное развитие надземной биомассы растений. Далее количество и размер листьев уменьшается, а новых побегов не образуется. Для оценки развития куста определяют количество побегов второго порядка, длину побегов, количество и площадь листьев (см. п. 1.8).

После начала увядания ботвы выкапывают мини-клубни и определяют параметры продуктивности: количество клубней с одного растения, диаметр каждого клубня, масса каждого клубня. Затем проводится пересчет количества клубней с 1 м², с делянки или с 1 га. Вычисляется средний диаметр и средняя масса клубней, а также процентное соотношение клубней разных фракций. Урожайность растений оценивается как масса клубней с 1 растения, а урожай – как масса клубней с единицы площади (м² или га). Проводится контроль зараженности клубней болезнями, так как для данной категории семян (оригинальный семена) зараженность всеми видами инфекций не допустима.

2. СОЗДАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ

2.1 ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ

Корни растений в природной среде тесно связаны с жизнедеятельностью бактерий. Условно можно разделить три зоны нахождения микроорганизмов на корнях растений, и, соответственно, три группы ризобактерий. Первая группа – ризосферные бактерии – находятся в прилегающей к корням почве, в частицах почвы, контактирующих с корневой системой растений, а также бактерии, соприкасающиеся с поверхностью корней, но не прикрепленные к ней. Такие бактерии могут быть удалены с корней во время процедур отмывания растений от почвы. Вторая группа ризобактерий – эпифитные бактерии – находятся на поверхности корней растений (так называемого "ризоплана"), прочно связаны с ней, часто образуют биопленки, и не могут быть удалены при механической отмывке корней. Третья группы - эндофиты - ризобактерии, живущие во внутренних тканях растений, чаще всего в межклетниках, но могут также проникать и в проводящие сосуды растений. Эндофиты, в основном, обладают ферментативными системами (целлюлолитическими, пектолитическими и протолитическими), способствующими их активному проникновению через поверхностный слой клеток корней. Для каждой из этих трёх групп ризобактерий имеются специфические приёмы выделения.

Выделение ризосферных бактерий

В направлении от почвы к корню растений видовой состав микроорганизмов существенно меняется. Это связано с тем, что растения выделяют в почву органические вещества (корневые экссудаты), способность использовать которые создаёт конкурентные преимущества некоторым группам бактерий. Кроме того, растения выделяют в почву также и сигнальные молекулы (например, флавоноиды), способствующие направленному движению определённых микроорганизмов в сторону корневой системы. В связи с этим, на разных этапах отмывания ризосферной почвы, будут выделяться разные микроорганизмы.

Для выделения ризосферных микроорганизмов готовят десять (10) 250-мл колб Эрленмейра, содержащих по 100 мл дистиллированной воды (рис. 8). Колбы с водой автоклавируют в течение 30 минут при 121 °С. Колбы нумеруют от 1 до 10. В качестве растительного объекта готовят корни, из которых планируется выделение бактерий. Корневая система растения должна быть предварительно отмыта от почвы, с сохранением микрочастиц почвы. Подготовленные таким образом корни последовательно отмываются в колбах от 1 до 10 по 15 минут в каждой на качалке (120 об/мин). Перенос корней из одной колбы в другую осуществляется стерильным пинцетом в стерильной зоне (в ламинаре и/или рядом с горелкой). В колбы 8-10 рекомендуется перед автоклавированием добавить стеклянный песок для интенсификация механического отмывания почвы и бактерий. Из каждой из 10 колб берётся 1 мл раствора, из которого в стерильных пробирках делается серия 10-кратных разведений в стерильной воде (или в физиологическом растворе). Из каждого приготовленного разведения 100 мкл наносится и растирается стерильным шпателем на поверхности агаризованной питательной среды (выбор среды зависит от целей эксперимента, это могут быть среда LB (для подсчёта общего количества микроорганизмов) или среда Эшби (для высева азотфиксирующих бактерий и т.д.) в чашках Петри.

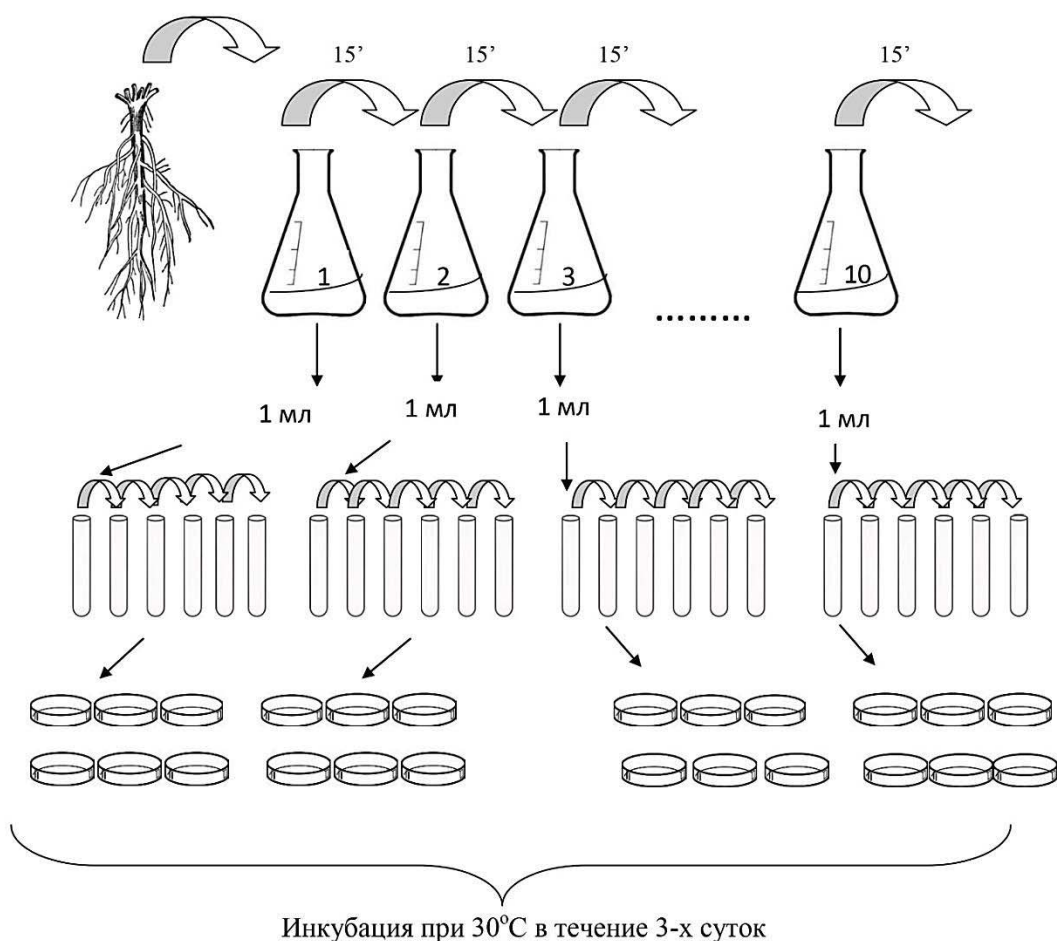


Рисунок 8. Выделение ризосферных бактерий при отмывании корней

Чашки инкубируются в термостате при 28-37 °C в течение 3 суток. Отдельные выросшие колонии микроорганизмов пересеваются на отдельную чашку Петри с питательной средой для дальнейшего анализа и характеристики бактерий. Опыт показывает, что первые колбы при отмывании корней от почвы содержат много бактериальных клеток, но видовое разнообразие их низкое (в основном, грамположительные аэробные палочки, бациллы). Затем в колбах 4-7 количество бактерий значительно и неуклонно снижается. А в колбах 8-10 начинает возрастать. Одновременно, в последних колбах увеличивается и видовое разнообразие ризобактерий: начинают преобладать грамотрицательные палочки и спироиллы.

Выделение ризобактерий с корней растений

Тщательно отмытые (на предыдущем этапе) стерильной водой корни растений стерильно гомогенизируются в ступке. Гомогенат растворяется в 1-2 мл стерильного физиологического раствора. Из полученного раствора также делается серия 10-кратных разведений, из которых 100 мкл наносится и растирается стерильным шпателем на поверхности агаризованной питательной среды в чашках Петри. Чашки инкубируются в термостате при 28-37 °C в течение 3 суток. Отдельные выросшие колонии микроорганизмов пересеваются на отдельную чашку Петри с питательной средой для дальнейшего анализа и характеристики бактерий.

Выделенные таким образом бактерии будут содержать как эпифитные, так и эндофитные бактерии. Для выделения только эндофитных бактерий отмытые стерильной водой корни дополнительно поверхностно стерилизуются. Для этого их полностью погружают на 2 минуты

в 1%-ный раствор гипохлорита натрия, затем на 30 секунд 70% этанола и промывают стерильной водой. После чего из корней также делают гомогенат, растворяют его в стерильном физрастворе, делают серию разведений, из которых высевает на питательную среду для получения отдельных бактериальных колоний.

Полученные бактериальные колонии пересеваются в отдельную чашку Петри или пробирку с питательной средой для поддержания в культуре.

2.2 ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Для оценки совместимости культивирования ризобактерий с растениями бактериальные штаммы (полученные из коллекций микроорганизмов или при выделении бактерий как описано выше) должны быть изучены и описаны на предмет их биохимической активности и физиологических свойств. Наиболее важными биохимическими свойствами штаммов с микробиологической точки зрения являются способность (или неспособность) использовать те или иные соединения в качестве единственных источников углерода и азота. Эти биохимические свойства являются определяющими для подбора оптимальной среды и условий культивирования бактериальных штаммов и будут полезны при необходимости масштабного наращивания биомассы с целью использования в качестве биоудобрения.

Определения биохимической активности бактерий в потреблении органических соединений в качестве единственного источника углерода

Готовится 200 мл 0,1% водного раствора пептона. Пептон выступает в качестве универсального источника всех микроэлементов и витаминов. При этом использование 1 г/л этого субстрата недостаточно для оптимального роста большинства бактериальных культур. Приготовленный раствор разливается по 20 мл в десять 50-мл колб. В девять колб добавляются и растворяются по 0,2 г различные органические соединения: глюкоза, галактоза, манноза, сахароза, мальтоза, лактоза, глицерин, яблочная кислота, лимонная кислота или какие-нибудь другие [Внимание!!! При добавлении кислот pH раствора будет снижаться, поэтому дополнительно требуется восстановить нейтральность pH 0,1 М раствором гидроксида натрия, контролируя значения pH индикаторной бумагой]. Десятая колба оставляется без дополнительных источников углерода, и будет служить отрицательным контролем. Колбы подписываются, закрываются ватно-марлевыми пробками и автоклавируются 30 мин при 0,5 атм.

После остывания колб в них вносится равный объем (100 мкл) исследуемой бактериальной культуры. Для этого в стерильных условиях бактериологической петлей собирается биомасса с чашки Петри с поддерживаемой бактериальной культурой. Биомасса помещается в 1 мл стерильного физраствора, растворяется в ней и используется для внесения во все 10 колб. После засева колбы инкубируются в термостатируемом шейкере при 28-37 °C в течение 18-24 часов. После этого производится измерение оптической плотности культур на спектрофотометре при 600 нм. За отрицательный результат (неспособность использовать вещество в качестве источника углерода) принимаются оптические плотности культур равные или близкие оптической плотности культуры, выращенной на 0,1% пептоне без дополнительных источников углерода. Превышение этих значений оптических плотностей свидетельствует о способности бактерий использовать органическое вещество в качестве источников углерода и энергии. Культура с максимальным значением оптической плотности показывает, какое соединение из используемых в эксперименте является оптимальным для данного бактериального штамма источником углерода.

Для использования ризобактерий в технологии микроклонального размножения растений наиболее важным является определение способности бактерий к росту на среде с сахарозой, так как именно этот углевод входит в состав питательных сред для культивирования растений. Поэтому бактериальные штаммы, которыми предполагается инокулировать растения в условиях *in vitro*, обязательно должны быть проверены на способность утилизировать сахарозу.

Определения способности бактерий к росту на различных источниках азота

Азот является необходимым для жизни клетки макроэлементом, без которого не может полноценно реализовываться биосинтез ни одного из классов макромолекул, в особенности белков и нуклеиновых кислот. Поэтому зачастую именно азот является лимитирующим фактором увеличения биомассы в природных средах. В природе соединения азота могут быть в виде как органических, так и неорганических соединений. Наиболее удобными для включения в метаболизм являются органическая и аммонийная формы азота. В то время как использование живыми организмами окисленных форм азота (нитраты, нитриты) и атмосферного азота требует предварительного восстановления до иона аммония. При этом только некоторые бактерии обладают уникальным свойством в живой природе – фиксацией инертного атмосферного азота (N_2) и восстановлением его с помощью фермента нитрогеназы в аммонийную форму.

Для определения оптимального источника азота для бактерий можно использовать среду Эшби, содержащую подходящий для исследуемого штамма источник углерода и минимальный солевой состав:

источник углерода (маннит, сахароза или глюкоза) – 10,0 г/л,
калий сернокислый – 0,2 г/л,
калий фосфорнокислый двузамещенный – 0,2 г/л,
магний сернокислый – 0,2 г/л,
натрий хлористый – 0,2 г/л,
натрий молибденовокислый – 0,002 г/л
железо (II) сернокислое – 0,02 г/л (в хелатной форме).

При отсутствии в среде источника азота, на ней могут вырасти только азотфиксирующие бактерии, восстанавливающие атмосферный азот. В качестве источника нитратного азота в среду может быть добавлен калия нитрат (1 г/л). А в качестве аммонийного азота - аммоний хлористый или натрия глутамат (1 г/л). Для более удобного анализа результатов используют агаризованные среды. В этом случае в питательную среду добавляют кальций углекислый (5,0 г/л) и агар-агар (15,0 г/л).

Исследуемый бактериальный штамм высевается на среды с различными источниками азота (и без него) и культивируется в течение 3-5 сут. при 30°C. Анализируют результаты на наличие бактериальных колоний на средах (рис. 9). Если бактериальный рост присутствует на всех средах (в том числе и на безазотистой среде) делают вывод о способности данных бактерий к фиксации атмосферного азота. Если рост выявлен только на средах с нитратным и аммонийным азотом, то данный бактериальный штамм способен к нитрат-редукции. А в случае выявления бактериальных колоний только на среде с аммонийной формой азота, можно сделать вывод о том, что исследуемый штамм не способен ни к азотфиксации, ни к использованию в качестве источника азота нитрат-ионов. Для культивирования таких бактерий в питательной среде обязательно должна присутствовать аммонийная форма азота.



Рисунок 9. Пример бактериального роста азотфиксатора на безазотистой среде Эшби. Вокруг колоний видны крупные зоны просветления среды, обусловленные растворением карбоната кальция секретлируемыми бактериальными метаболитами.

Внимание!!! Рост бактерий на безазотистой среде не всегда является однозначным свидетельством азотфиксации, так как в реактивах, используемых для приготовления среды, могут содержаться примеси соединений азота. Некоторым бактериям для роста нужно относительно небольшая концентрация азота в среде – это, так называемые "олигонитрофилы". Поэтому азотфиксация должна быть проверена другими независимыми методами. Например, газовой хроматографией воздушной фазы культуры, в которую был добавлен ацетилен, - метод оценки активности ацетилен-редукции. Метод основан на том, что нитрогеназа (основной фермент азотфиксации) способна восстанавливать ацетилен до этилена.

Фосфат-солюбилизация

Ещё одним важным и полезным для растений свойством ризосферных бактерий является их способность растворять (солюбилизовать) находящиеся в почве нерастворимые формы фосфора, переводя их в доступные для растений фосфат-ионы. Это свойство бактерий важно ещё и потому, что при использовании фосфатных удобрений в агробиотехнологии доступными для растений из них оказывается всего около 10%. Для оценки способности исследуемого бактериального штамма солюбилизовать соединения фосфора в лаборатории используют среду Муромцева следующего состава:

источник углерода (маннит, сахароза или глюкоза) – 5,0 г/л,
калий сернокислый – 0,2 г/л,
магний сернокислый – 0,2 г/л,
аспарагин – 1,0 г/л,
кальций хлористый – 2,2 г/л,
натрий фосфорнокислый – 3,8 г/л,
агар-агар – 15,0 г/л

При смешивании в растворе растворимых солей хлорида кальция и фосфата натрия образуется нерастворимая соль фосфата кальция, придающая питательной среде интенсивно белую окраску. Среда перестаёт быть прозрачной. При разлитии среды в чашки Петри необходимо следить, чтобы осадок фосфата кальция находился в виде равномерно распределенной взвеси.

Исследуемый штамм высевают на чашки Петри со средой Муромцева и культивируют в течение 5 сут. при 30 °С. При анализе результатов определяют присутствие бактериального роста на питательной среде, при наличии которого измеряют ширину зон просветления среды,

связанных с растворением фосфата кальция метаболитами бактерий. Если культура бактерий растёт на среде Муромцева с образованием широких зон просветления среды, делают вывод о присутствии у исследуемого штамма фосфат-солубилизирующей активности.

Определение бактериальной продукции ауксина

Многие ризосферные бактерии способны влиять на фитогормональный статус растений продукцией и разрушением фитогормонов или их метаболитических предшественников. Наиболее важным в растительно-микробном взаимодействии и наиболее изученным является фитогормон ауксин - индолил-3-уксусная кислота (ИУК). И растения, и бактерии синтезируют ауксин в основном из протеиногенной аминокислоты триптофана. Но если растения осуществляют биосинтез фитогормона для регуляции своего развития, то у ризобактерий зачастую ауксин является продуктом детоксикации триптофана – триптофан-зависимый путь биосинтеза. Поэтому при оценке способности ризобактерий синтезировать ИУК в среду культивирования добавляют триптофан в концентрациях 100-200 мкг/мл. В качестве среды культивирования может быть использована любая жидкая минимальная среда, на которой исследуемые бактерии активно наращивают биомассу.

Триптофан – труднорастворимая в воде аминокислота (11,4 г/л при 25 °С, 27,95 г/л при 75 °С). Поэтому для добавления в среду культивирования отдельно готовят сток-раствор необходимого объёма с концентрацией 10 г/л (растворяют при нагревании с помешиванием). Сток-раствор автоклавируют отдельно от среды культивирования при 0,5 атм в течение 30 минут, и стерильно добавляют в колбы с питательной средой перед засевом бактерий до концентрации триптофана 100-200 мкг/мл. Колбы инкубируют на качалке 120 об/мин при 30 °С в течение 5 сут. После культивирования бактериальные клетки осаждают центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), а культуральную жидкость анализируют на присутствие в ней ауксина с помощью реактива Сальковского (2 мл 0,5М раствора FeCl_3 +100 мл 37%-ной HClO_4). Для этого к 1 мл реактива Сальковского добавляют 1 мл культуральной жидкости и инкубируют в темноте при 30 °С в течение 30 мин. При наличии в анализируемом растворе индольных соединений, кроме триптофана, образуются окрашенные соединения (рис. 10). Оптическую плотность окрашенных проб измеряют на спектрофотометре при 536 нм. В качестве холостой пробы используют смесь реактива Сальковского (1 мл) с питательной средой (1 мл), в которой не были засеяны бактерии. Концентрацию ИУК определяют по калибровочному графику, построенному в диапазоне концентраций вещества 10-8-10-2 г/л.



Рисунок 10. Окрашивание индольных соединений реактивом Сальковского

Определение оптимальных для роста бактерий значений температуры, pH и концентрации хлорида натрия

В современном мире сельскохозяйственные культуры возделываются в агроценозах с сильно различающимися климатическими условиями (температура и влажность) и на почвах с различными кислотностью и засоленностью. В связи с этим штаммы ризобактерий, предполагаемые для использования в качестве биоудобрений, должны быть проверены на устойчивость к физическим и химическим факторам окружающей среды.

Определение оптимальных для роста бактерий значений температуры

Для определения оптимальной температуры роста бактериальной культуры готовят 15 колб со средой, содержащей оптимальный для исследуемого штамма бактерий состав источников углерода, азота, макро- и микроэлементов. Колбы со средой автоклавируют и вносят в них одинаковый объем инокулята (посевной дозы) исследуемых бактерий. Инокулят готовят из предварительно выращенной жидкой культуры бактерий или ресуспендированных в стерильном физрастворе бактериальных колоний с плотной среды. Засеянные колбы инкубируют в течение 1 суток при температурах 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C и 45 °C (по 3 колбы на каждый из вариантов). После культивирования на фотометре измеряют оптическую плотность бактериальных суспензий при 600 нм. Вариант термостатирования культуры, при котором наблюдается наибольшее среднее значение оптической плотности указывает оптимальную температуру культивирования исследуемых бактерий. Если в каких-либо вариантах термостатирования среднее значение оптической плотности оказалось близкое к нулю, это означает, что использованная температура находится за пределами диапазона температур жизнедеятельности микроорганизмов. И, следовательно, исследуемый штамм не может быть использован в экспериментах или в биотехнологических процессах с культивированием при данной температуре.

Определение оптимальных для роста бактерий значений pH

Для определения оптимального значения pH роста бактериальной культуры готовят 15 колб со средой, содержащей оптимальный для исследуемого штамма бактерий состав источников углерода, азота, макро- и микроэлементов. Значение pH среды титруют до значений 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 и 9,0 (по 3 колбы на каждый из вариантов). Колбы со средой автоклавируют и вносят в них одинаковый объем инокулята (посевной дозы) исследуемых бактерий. Инокулят готовят из предварительно выращенной жидкой культуры бактерий или ресуспендированных в стерильном физрастворе бактериальных колоний с плотной среды. Засеянные колбы инкубируют в течение 1 суток при температуре 30 °C. После культивирования на фотометре измеряют оптическую плотность бактериальных суспензий при 600 нм. Вариант культуры, при котором наблюдается наибольшее среднее значение оптической плотности указывает оптимальное значение pH культивирования исследуемых бактерий. Если в каких-либо вариантах среднее значение оптической плотности оказалось близкое к нулю, это означает, что использованный pH среды находится за пределами диапазона жизнедеятельности микроорганизмов. И, следовательно, исследуемый штамм не может быть использован в экспериментах или в биотехнологических процессах с культивированием при данном значении pH.

Для определения оптимальной концентрации хлорида натрия для бактериальной культуры готовят 15 колб со средой, содержащей оптимальный для исследуемого штамма бактерий состав источников углерода, азота, макро- и микроэлементов. Дополнительно в колбы со средой вносят хлорид натрия до конечных концентрация 1%, 3%, 5%, 10% и 15% (по 3 колбы на каждый из вариантов). Колбы со средой автоклавируют и вносят в них одинаковый объём инокулята (посевной дозы) исследуемых бактерий. Инокулят готовят из предварительно выращенной жидкой культуры бактерий или ресуспендированных в стерильном физрастворе бактериальных колоний с плотной среды. Засеянные колбы инкубируют в течение 1 суток при температуре 28 °С. После культивирования на фотометре измеряют оптическую плотность бактериальных суспензий при 600 нм. Вариант культуры, при котором наблюдается наибольшее среднее значение оптической плотности указывает оптимальную концентрацию хлорида натрия для культивирования исследуемых бактерий. Если в каких-либо вариантах термостатирования среднее значение оптической плотности оказалось близкое к нулю, это означает, что использованная концентрация хлорида натрия находится за пределами диапазона температур жизнедеятельности микроорганизмов. И, следовательно, исследуемый штамм не может быть использован в экспериментах или в биотехнологических процессах с культивированием при данной концентрации хлорида натрия.

2.3 ОЦЕНКА ГИДРОФОБНОСТИ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК. МЕТОД СОЛЕВОЙ АГРЕГАЦИИ. МЕТОД АДГЕЗИИ В УГЛЕВОДОРОДАХ

Гидрофобность микробной поверхности играет решающую роль в прикреплении бактерий к поверхностям различных материалов. Гидрофобность поверхности позволяет бактериям взаимодействовать с живыми/неживыми клетками животных или растений выживать в организме хозяина. Это свойство является первым шагом к колонизации бактериями растений.

Адгезия бактерий в углеводородах

Адгезивная активность микроорганизмов определяется свойствами клеточной поверхности, прежде всего степенью ее гидрофобности, на которую значительное влияние оказывают условия культивирования. Бактериальное прилипание к углеводородам простой и удобный метод для измерения бактериальной гидрофобности. Согласно этому методу, отмытые бактериальные суспензии смешивались при контролируемых условиях с алифатическими (гексадекан) или ароматическими (ксилен) жидкими углеводородами. Высоко гидрофобные бактерии адгезируются на масляных капельках после смешивания.

Методика выполнения эксперимента:

1. Выросшие бактерии перелить в центрифужные пробирки (эппендорфы).
2. Центрифугировать 10000 об/мин в течение 8 минут.
3. Выпавший осадок разбить в 10 мл PBS.
4. Центрифугировать 10000 об/мин в течение 8 минут.
5. Добавить PBS до оптической плотность 0,5 при длине волны 600 нм.
6. Бактериальные суспензии (4мл), приготовленные в PBS (рН 7,2), покрыть 400 мкл *n*-гексадекана.
7. Интенсивно перемешать в течение 1 минут.
8. Дать разделиться фазам в течение 15 минут при 20-22 °С.
9. Измерить оптическую плотность бактериальных суспензий при 600 нм.

10. Рассчитать индекс гидрофобности поверхности бактериальных клеток через процент микробной адгезии в углеводороде (MATH) по формуле:

$$\text{MATH} = \frac{\text{OD 600 (исходная бактериальная суспензия)} - \text{OD 600 (водная фаза)}}{\text{OD 600 (исходная бактериальная суспензия)}} \times 100\%$$

Каждое значение представляет собой среднее значение трех определений. Штаммы считаются сильно гидрофобными, когда полученные значения составляют >50%; как умеренно гидрофобные, когда значения находятся в диапазоне 20-50%; и как гидрофильные, когда значения <20%.

Солевой агрегационный метод

О гидрофобности поверхности клеток судят по наименьшей концентрации сульфата аммония, которая дает визуально определяемые агрегаты клеток. Провоцирование клеточной флуккуляции происходит за счет повышения концентрации соли. Порядок концентраций сульфата аммония, при котором наблюдается преципитация клеток, есть мера их гидрофобности. Самые гидрофобные преципитируют при низкой концентрации соли, а гидрофильные осаждаются при высоких.

Методика выполнения эксперимента:

1. Приготовить различные (от 0,5 М до 4 М с интервалом 0,5 М) концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 0,001 М натрий фосфатном буфере.
2. В полистирольный планшет внести растворы $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ начиная от более к менее концентрированному с шагом 0,5 по 100 мкл.
3. В последний ряд внести 100 мкл PBS.
4. Внести бактериальные суспензии в планшет по 100 мкл.
5. На 10-15 минут поставить планшет в шейкер при комнатной температуре.
6. Оставить планшет до появления агрегации бактериальных клеток.

Самая низкая молярность сульфата аммония, дающая видимую агрегацию бактерий, оценивалась как числовое значение гидрофобности бактериальной поверхности, значение SAT. Положительный тест считался для штаммов, показывающих значения $\text{SAT} \leq 2,0$.

2.4 ИНОКУЛЯЦИЯ МИКРОРАСТЕНИЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИЕЙ

Для инокуляции микрорастений бактериями готовится суспензия клеток. Бактериальная культура засеивается в стерильную жидкую питательную среду и инкубируется до поздней экспоненциальной фазы роста (18-20 часов). Культура стерильно центрифугируется при 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок растворяется в стерильном физрастворе до оптической плотности равной 0,1-0,15 при 660 нм, что соответствует для большинства бактериальных штаммов (непигментированных, с размером клеток 1-2 мкм) концентрации 10^9 кл/мл. 1 мл полученной бактериальной суспензии растворяется в 9 мл стерильного физраствора, и после этого используется для инокуляции растений.

При микрочеренковании растений бактериальную суспензию добавляют с расчетом, чтобы итоговая концентрация бактерий в питательной среде составила 10^6 кл/мл, например, по 60 мкл в пробирки с 6 мл питательной среды. Стадия инокуляции определяется в зависимости от свойств штамма. Для картофеля штаммы, не способные к росту на среде с сахарозой, могут быть добавлены в сосуды с растениями на самых ранних этапах (сразу после микрочеренкования). Штаммы, которые могут самостоятельно расти на питательной среде с сахарозой

(например, Мурасиге-Скуга) и вызывать контаминацию культуры, могут быть добавлены на более поздних этапах культивирования микрорастений: на 14 сутки или перед высадкой растений в почву.

Для инокуляции микрорастения могут культивироваться как на жидкой, так и на плотной агаризованной питательной среде. Выбор консистенции питательной среды зависит от подвижности бактерий, способности перемещаться в среде и достигать корней микрорастений. В случае использования жидкой среды без агара для поддержки микрочеренков необходимо использовать мостики из фильтровальной бумаги. Опыт показывает, что использование мостиков из ваты или из других аналогичных материалов затрудняет отделение корней от поддерживающего материала, что мешает проведению измерения параметров корней в случае постановки экспериментов и при высадке растений в почву.

Первичный скрининг штаммов на отсутствия фитотоксичного влияния на микрорастения в культуре *in vitro*, а также на их способности к стимулированию роста побегов и корней проводят в течение 10 суток. Визуально оценивается фитотоксичность и ингибирование по угнетению роста микрорастений. В качестве контроля используются стерильные растения неинокулированные бактериями. В качестве положительного контроля можно использовать инокуляцию штаммами с известной рост-стимулирующей активностью, например, штамм *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Если не наблюдается фитотоксичного влияния, то далее проводится оценка влияния штаммов на морфометрические и физиолого-биохимические параметры микрорастений.

2.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РАСТЕНИЙ

Кроме визуальной оценки влияние ризосферных бактерий на функционирование макросимбионта при микроклональном размножении растений оценивается по ответным реакциям растения-хозяина при оптимальных условиях роста или при действии на растительно-бактериальные ассоциации различных стрессовых факторов. Культура клеток и тканей растений *in vitro* является удобной модельной системой и позволяет исключить непредвиденные воздействия, которые неизбежно присутствуют в почве при выращивании растений в условиях *in vivo*, что делает возможной оценку только целевых факторов в изучаемых системах.

Методика количественного определения фотосинтетических пигментов

Хлорофиллы *a* и *b* – зеленые фотосинтетические пигменты. В реакционных центрах хлорофилла *a* световая энергия преобразуется в энергию химических соединений и именно их содержание в хлоропластах растительных клеток определяет скорость протекания фотосинтетических реакций. В зеленом листе растений, как правило, содержится примерно в 3 раза больше хлорофилла *a* по сравнению с хлорофиллом *b* (Кузнецов, Дмитриева 2011). Ксантофиллы и каротиноиды – не только передают поглощенную световую энергию хлорофиллу *a*, но и выполняют защитную, антиоксидантную функцию, защищая клетки от активных форм кислорода.

Для количественного определения фотосинтетических ферментов из каждого варианта берут по 4 растения – с каждого растения по одному листу. Массу листьев взвешивают на аналитических весах, после чего листочки заливают диметилсульфоксидом в соотношении 20 мкл к 1 мг навески. Образцы инкубируют при 60 °С в течение 30 минут (до полного выхода пигментов из листа в раствор). Содержание зеленых пигментов фотосинтеза – хлорофиллов *a*, *b*, и желтых пигментов – каротиноидов и ксантофиллов, определяют по спектральным характеристикам раствора (рис. 11).

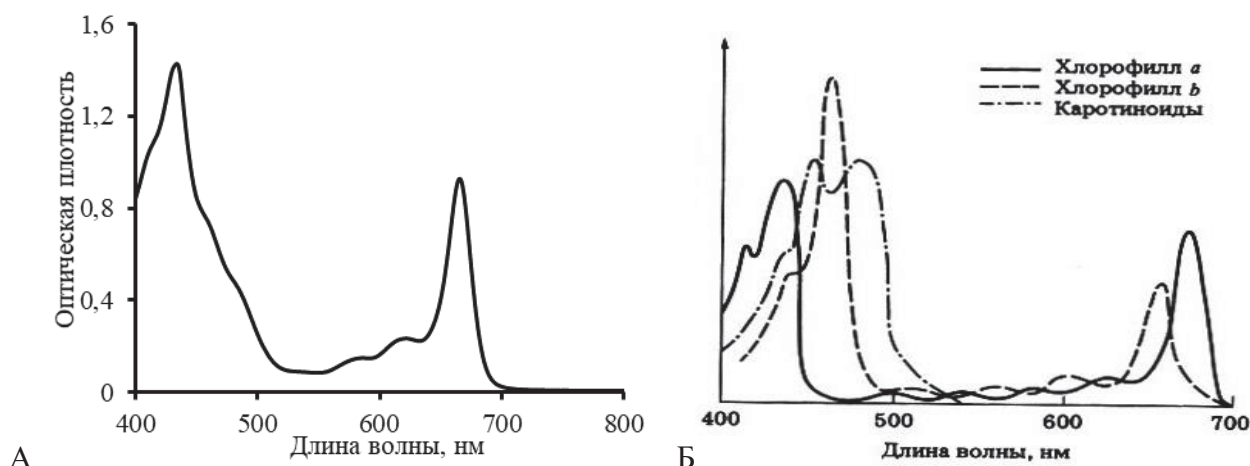


Рисунок 11. Спектрограмма раствора фотосинтетических пигментов: А, спектр раствора в диметилсульфоксиде фотосинтетических пигментов из верхнего листа 30-дневного микрорастения картофеля сорта Невский; Б, индивидуальные спектры фотосинтетических пигментов.

Измеряется оптическая плотность (А) при соответствующей длине волны. При измерении спектра в 1-см кювете концентрация пигментов фотосинтеза рассчитывается по следующим формулам:

$$C_a = 12,19 \times A_{664} - 3,45 \times A_{647};$$

$$C_b = 21,99 \times A_{647} - 5,32 \times A_{664};$$

$$C_{car.} = (1000 \times A_{480} - 2,14 \times C_a - 70,16 \times C_b) / 220,$$

где:

A_{664} – оптическая плотность при 664 нм; A_{647} – оптическая плотность при 647 нм;
 A_{480} – оптическая плотность при 480 нм; C_a – концентрация хлорофилла *a*, мкг/мл;
 C_b – концентрация хлорофилла *b*, мкг/мл; $C_{car.}$ – концентрация каротиноидов и ксантофиллов, мкг/мл.

Обычно в зеленых листьях содержание хлорофиллов колеблется от 0,5 до 3 мг на 1 г сырого веса. Содержание каротиноидов, как правило, варьирует от 0,1 до 0,5 мг/г сырого веса (Титов с соавт, 2013).

Определение белка по Бредфорд (Bradford 1976)

Относительно простым и наиболее точным определением концентрации белка является метод по Бредфорд с использованием красителя Кумасси бриллиантового синего G-250. Для этого строится калибровочный график по стандартному белку, в качестве которого обычно используют бычий сывороточный альбумин (БСА).

Предварительно строится калибровочный график на основе разведений БСА в диапазоне концентраций 0,001-0,05 мг/мл. Готовится ряд разведений исследуемого белка в объеме 1 мл. Затем к пробам добавляют 1 мл красителя. Через 3-5 минут измеряют A_{595} ($\lambda = 595$ нм) на спектрофотометре Specord 250 (Analytik, Йена, Германия), помещая в кювету сравнения пробу со всеми компонентами, в которой раствор белка заменен эквивалентным объемом дистиллированной воды. Количество белка в исследуемом образце определяют по значению $\lambda = 595$ нм, используя калибровочный график, построенный по результатам измерений A_{595} для растворов БСА с известной концентрацией.

Абиотические и биотические стрессовые факторы вызывают у растений окислительный стресс, стимулируя образование в клетках активных форм кислорода (АФК). К АФК относят химически активные молекулы, полученные в результате неполного восстановления кислорода: синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксид-радикал (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксил радикал ($\text{HO}^\bullet$). Активные радикалы образуют гидропероксиды белков, липидов, ДНК. Этот процесс называют перекисным окислением. В частности, перекисное окисление липидов (ПОЛ) является индикаторной реакцией повреждения клеточных мембран. О протекании ПОЛ судят по образованию малонового диальдегида, который является одним из конечных продуктов этого процесса. Повышенное образование МДА является показателем степени повреждающего действия того или иного стрессора.

Растительный материал (100 мг сырых листьев) растирают в ступке с 1,5 мл ТХУ и переливают в пробирки эппендорф (2 мл). Центрифугируют при 10 000 g в течение 15 мин при 4°C. Затем к 0,3 мл супернатанта добавляют 1,2 мл ТБК в 20% ТХУ. Реакционную смесь инкубируют в эппендорфах на термостате типа «Драй-блок» при 95°C, охлаждают и центрифугируют 15 мин при 10 000 g. Оптическую плотность супернатанта определяют на спектрофотометре при E 532 нм и E 600 нм. В качестве контроля используют раствор ТБК в 20% ТХУ. Расчет содержания МДА проводят по формуле:

$$C_x = (E_{532} - E_{600}) V_e V_{\text{кюв.}} / k l (V_a)^2 m,$$

где:

C_x – содержание МДА, мМ на г сырого веса;

E – оптическая плотность раствора;

V_e – объем экстракта, мл;

$V_{\text{кюв.}}$ – объем пробы, помещаемой в кювету;

k – коэффициент молярной экстинкции (для МДА $156 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$);

l – длина оптического пути;

V_a – объем экстракта, взятый для анализа;

m – масса образца для экстракции.

На основании полученных данных делают вывод о влиянии стрессовых факторов, в частности, засухи на содержание МДА и ПОЛ в клетках листьев микроклонов картофеля и защитной роли ризосферных бактерий в этих условиях.

Определение активности антиоксидантных ферментов (Титов с соавт., 2013)

В ликвидации АФК участвуют ферменты-антиоксиданты, важнейшими из которых являются супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, аскорбатпероксидаза и ферменты, включенные в аскорбат-глутатионовый цикл. Они являются обязательными участниками защитного ответа растения при действии различных стрессоров. Эффективность их функционирования во многом определяет степень устойчивости растений.

Пероксидазы – гемсодержащие ферменты, которые восстанавливают перекись водорода до воды. Активность пероксидазы можно определять с использованием различных субстратов. В наших экспериментах активность оценивали по окислению диаминофлюорена (ДАФ). Каталаза подобно пероксидазе относится к Fe-содержащим ферментам. Каталаза участвует в разложении пероксида водорода с выделением молекулярного кислорода.

Для экстракции ферментов растительный материал (0,2 г сырых листьев) растирают на льду в ступке с 3 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH = 7,0). Для измерения активности пероксидазы используют 0,05 М фосфатный буфер (pH = 6,0), а измерения активности каталазы использовали тот же буфер, но с pH = 7,0. Гомогенат центрифугируют при 15 000 g при 4°C. Супернатант переносят в чистую пробирку.

Активность ферментов измеряют на приборе Evolution 60 (Thermo Scientific, USA) (фото) в 1 см кварцевых кюветах. Пероксидазу измеряют при $\lambda = 600$ нм, а каталазу при $\lambda = 240$ нм. За единицу активности принимают количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта реакции в минуту.

Состав пробы для измерения активности пероксидазы (реакционная среда) в мкл: Na-фосфатный буфер (ФБ) – 1590; Фермент – 10; Диаминофлюорен (ДАФ) – 200; H₂O₂ – 200. Общий объем пробы – 2 мл. Используют H₂O₂ в разведении (10 мкл H₂O₂ на 10 мл H₂O)

Состав пробы для измерения активности каталазы (реакционная среда) в мкл:

ФБ – 1600; Фермент – 200; H₂O₂ – 200. Общий объем пробы – 2 мл. Используют H₂O₂ в разведении (30 мкл H₂O₂ на 10 мл H₂O).

Активность ферментов измеряли на приборе Evolution 60 (Thermo Scientific, USA) в 1 см кварцевых кюветах. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта реакции в минуту.

Расчет активности ферментов производят по формуле:

$$A = \Delta E \cdot V / k \cdot m \text{ белка},$$

где:

A – активность фермента (ед. мг белка);

ΔE – изменение оптической плотности за 1 мин;

V – общий объем реакционной среды;

k – коэффициент экстинкции (для H₂O₂ = 0,036 мМ⁻¹см⁻¹; для ДАФ = 51 мМ⁻¹см⁻¹),

m белка – масса белка в пробе, мг. Концентрацию белка определяют по методу Bradford.

Определение количественного содержания пролина в листьях растений (Bates et al., 1973)

Аминокислота пролин является одним из универсальных показателей защитной системы растений. Он может выступать в роли осмопротектора, в роли источника азота, углерода и энергетического субстрата. Проллин обладает также антиоксидантным действием, понижая количество активных форм кислорода. Количественное содержание пролина в клетках растений может служить показателем устойчивости растений к различным стрессовым факторам (Кузнецов, 2016).

Для количественного определения пролина из каждого варианта берут по 4 растения. Анализируют навески (1г) листьев или корней с каждого растения. Для этого листья и корни мелко нарезают, заливают 10 мл 3-ного раствора сульфосалициловой кислоты и растирают в ступках в течение 5 минут для получения однородной массы. Гомогенат фильтруют через капроновый фильтр. Затем к 2 мл фильтрата добавляют 2 мл реагента, который готовят непосредственно перед опытом, растворяя 1,25 г нингидрина в смеси 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл фосфорной кислоты (6 моль/л). Затем в пробирки добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты. После тщательного перемешивания пробы ставят на 1 час в кипящую водяную баню, затем охлаждают под холодной водой. После охлаждения в каждую пробу добавляют 4 мл толуола, взбалтывают 20-30 минут и дают отстояться. Через 10-15 минут верхний слой толуола, в который переходит краситель, отделяют от водной фазы. Окрашивание может быть от слабо-розового до пурпурного в зависимости от содержания пролина. Интенсивность

окраски измеряют на спектрофотометре при $\lambda = 520$ нм против толуола. Концентрацию пролина определяют по калибровочной кривой, для построения которой готовят водные растворы пролина разных концентраций (от 0,0125 до 0,15 мг в 2 мл раствора). Результаты расчета выражают в мМ/г сырого веса.

Определения отложения каллозы в листьях и корнях растений

Каллоза – линейный полимер глюкозы (β -1,3-глюкан) и является одним из полисахаридов клеточной стенки растений. Этот полисахарид выполняет защитные функции в ситовидных клетках флоэмы и паренхимных клетках ксилемы. Количество этого полисахарида увеличивается при поранении, действии биотических и некоторых абиотических стрессовых факторов (Горшкова, 2007). Таким образом, каллоза является одним из показателей индуцируемой системной устойчивости растений к различным стрессовым факторам.

Определение каллозы в корнях растений картофеля (Millet et al., 2010)

Используют инокулированные бактериями и неинокулированные корни 30-ти суточных микроклонов картофеля. Сегменты корней (1,5 – 2 см) помещают в фиксатор Карнуа (этанол: уксусная кислота 3: 1) на ночь. Затем корни постепенно регидратируют в 70 %-ном этаноле в течение 2 часов, 50%-ном этаноле в течение дополнительных 2-х часов и воды в течение ночи. После 2-х промываний водой сегменты корней обрабатывают 10% NaOH и помещают при 37° С на 1-2 часа, чтобы ткани стали прозрачными. После трех или четырех промываний водой сегменты корней инкубируют в 150 мМ K_2HPO_4 , pH 9,5 и 0,01% анилинового синего на несколько часов. Затем сегменты корней помещают на предметные стекла, и наблюдают каллозу сразу же на лазерном микродиссекторе Leica LMD 7000 с флуоресцентной приставкой (Millet et al., 2010).

Определение каллозы в листьях растений картофеля

Окрашивание каллозы проводят на сегментах листьев, вырезанных пробойником (диаметр 0,4 см) через 2 дня после бактериализации. Сегменты листьев с 3-х растений картофеля помещают в чашки Петри и обезвоживают абсолютным этанолом в течение 12 часов. Затем их переводят последовательно от 100% этанола до 67 мМ K_2HPO_4 (pH 12,0) через растворы постепенно уменьшающихся концентраций этанола (например, 100%, 75%, 50%, 25% и 0%). Затем листья окрашивают 0,01% (мас./об.) анилиновым синим в 67 мМ K_2HPO_4 (pH 12,0) в течение 1 ч при комнатной температуре. Окрашенный материал переносят на предметные стекла и наблюдают каллозу сразу же на лазерном микродиссекторе Leica LMD 7000 с флуоресцентной приставкой (рис. 12).

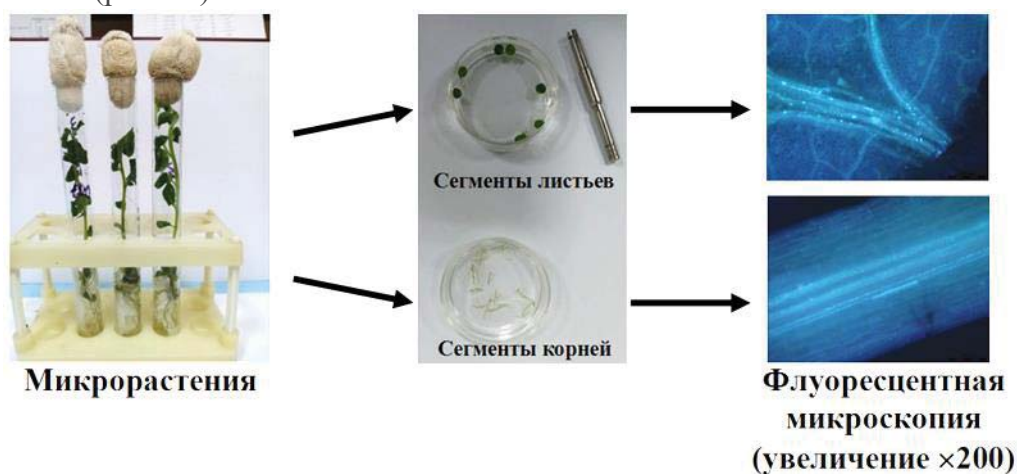


Рисунок 12. Схема опыта по определению каллозы в листьях и корнях микроклонов картофеля

2.6 ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ РАСТЕНИЙ (КОРНИ, СТЕБЛИ, ЛИСТЬЯ) И В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Микрорастения, выращенные после инокуляции, могут содержать бактерии на своей поверхности и во внутренних тканях. В зависимости от мобильности бактерий их клетки могут располагаться не только на корнях микрорастений (место инокуляции), но и на листьях и стеблях. Для оценки бактериализации различных частей микрорастений проводят качественное и количественное выявление бактерий на корнях, стеблях и листьях.

Качественная оценка присутствия ризобактерий в различных частях растений и в среде культивирования

30-ти суточные микрорастения стерильно изымаются из пробирки и промываются стерильным физраствором, после чего производят разделение стерильным пинцетом корней, стеблей и листьев (перед каждым контактом с растением пинцет стерилизуется в пламени горелки). Корни, стебли и листья сегментируются на фрагменты длиной около 1 см с помощью стерильных скальпелей и пинцетов. Полученные сегменты частей микрорастений помещаются на поверхность агаризованной питательной среды в чашках Петри (используется питательная среда оптимальная для роста бактерий) (рис. 13). Также в отдельную чашку Петри с питательной средой вносится среда культивирования микрорастений: 3-5 капель по 10 мкл, если использовалась жидкая среда Мурасиге-Скуга; либо с помощью стерильного пинцета несколько кусочков агаризованной среды. Чашки Петри с фрагментами растений и среды инкубируются в течение 3 суток при 30 °С. После этого анализируется присутствие или отсутствие зон бактериального роста вокруг фрагментов микрорастений или в месте нанесения среды культивирования растений. Отсутствие бактериального роста во всех вариантах свидетельствует о неспособности исследуемых бактерий поддерживать жизнедеятельность клеток в среде Мурасиге-Скуга и формировать симбиотическую (ассоциативную) систему с растением. Факт отсутствия бактерий в среде, но присутствия на фрагментах микрорастений, демонстрирует возможность существования бактерий только благодаря растительным метаболитам. В зависимости от того, на фрагментах каких частей микрорастений (корни, стебли, листья) присутствует бактериальный рост можно судить о способности бактерий перемещаться по растению от корней в побег.

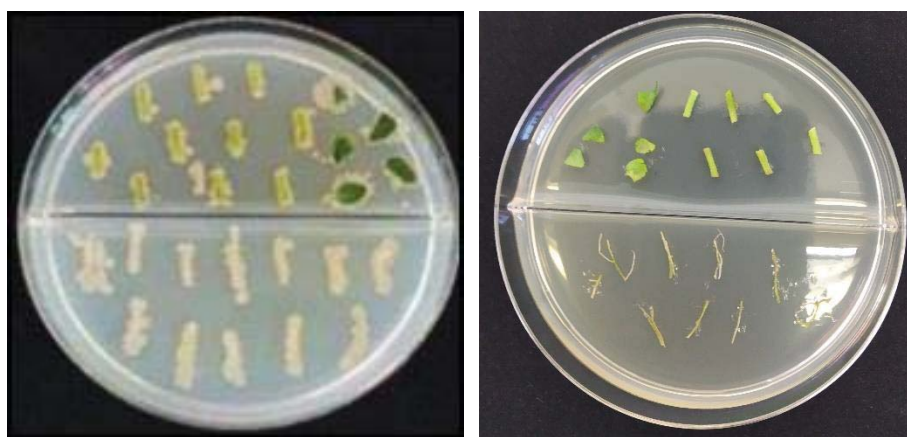


Рисунок 13. Пример бактериального обрастания (слева) фрагментов корней, стеблей и листьев инокулированных микрорастений картофеля. Справа – контроль.

Количественная оценка присутствия ризобактерий в различных частях растений и в среде культивирования

В случае выявления бактерий в разных частях растений и в среде следует провести определение количества микробных клеток в единице массы (1 г) растения и среды. Для этого стерильно отделённые корни, стебли и листья микрорастений, а также среда культивирования взвешиваются и гомогенизируются в 1 мл стерильного физраствора. Из полученных суспензий готовятся серии из восьми 10-кратных разведений. Из каждого разведения делается высеив на агаризованную питательную среду в чашки Петри (рис. 14). Чашки инкубируются в течение 3 суток при 30 °С. После этого проводится подсчёт колониобразующих единиц (КОЕ) для каждого разведения.

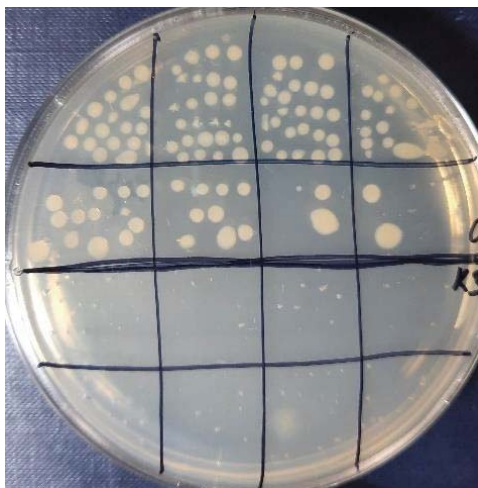


Рисунок 14. Определение колониобразующих единиц (КОЕ)

Значение количества бактерий в растительных образцах и в среде получают по формуле:

$$\text{КОЕ (кл/г)} = \frac{N \times 10^n}{V \times m},$$

где:

N – количество подсчитанных бактериальных колоний для определённого разведения

n – номер 10-ти кратного разведения

V – объём (мл) суспензии, нанесенный на питательную среду

m – масса (г) навески частей растений или среды, использованных для приготовления гомогената

2.7 ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ И ИХ КОЛИЧЕСТВА В СРЕДЕ И НА РАСТЕНИЯХ

Реакция антиген-антитело является основой многих высокочувствительных иммунологических методов анализа. Преимуществом метода является строгая специфичность выработавшихся антител, на определенный антиген. То есть, антитела к определенному веществу (антигену) будут связываться только с этим веществом (антигеном, антигенной детерминантой, эпитопом) и ни с каким другим. Взаимодействие антиген-антитело основано на принципе взаимного узнавания, обусловленного конформационной комплементарностью поверхностей двух молекул.

Двойная радиальная иммунодиффузия или реакция преципитации (от лат. *praecipito* – осаждать) – это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. В основе реакций преципитации лежит образование и выпадение в осадок нерастворимых комплексов антиген-антитело. В реакции, в качестве антигенов, участвуют растворимые биомакромолекулы (биополимеры клеток, тканей, высокомолекулярные органические вещества). Антитела, соединяясь с растворимыми антигенами, вызывают их агрегацию, что проявляется в помутнении или выпадении осадка (нерастворимого иммунного комплекса).

Методика проведения исследования (рис. 15):

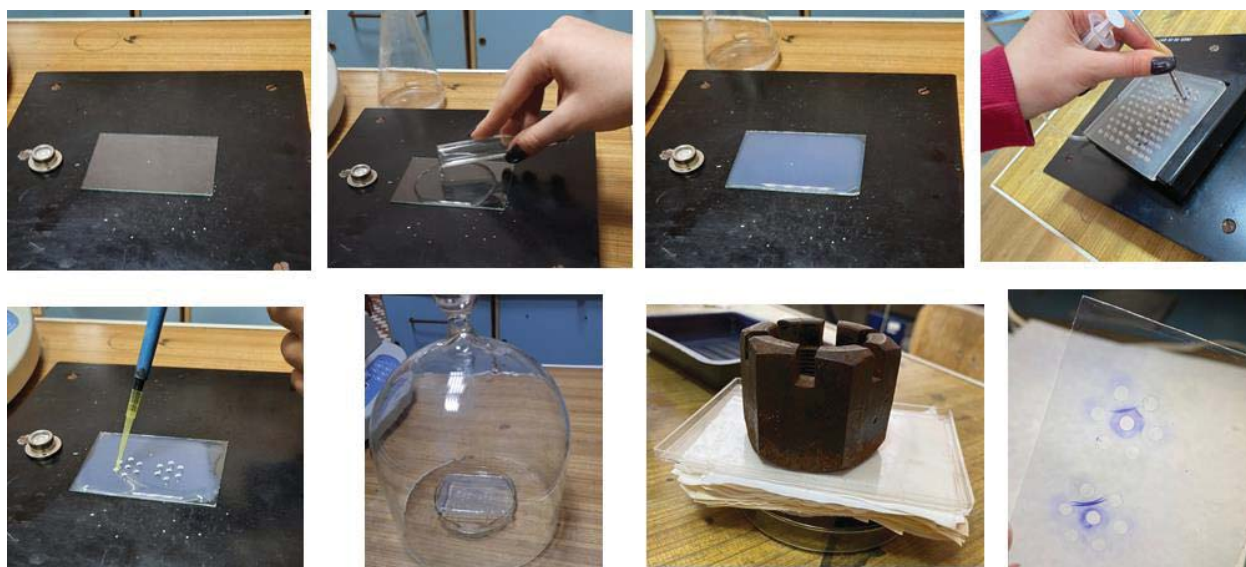


Рисунок 15. Схема проведения иммунодиффузионного анализа

1. Стекло необходимо тщательно промыть и высушить в термостате при температуре 60 °С в течении 10 минут. С помощью мерной пробирки на поверхность стекла, расположенного строго горизонтально, выливают 10 мл расплавленного раствора 1% агарозы так, чтобы получился слой толщиной 1,5 мм.

2. В застывшем агаровом геле по трафарету готовят лунки для реагентов, используя трубки-пробойники. Расстояние между внешними краями лунок должно быть равно 5-6 мм.

3. Лунки заполняют образцами в соответствии со схемой в объеме, не превышающем объем лунки 15-20 мкл.

4. После внесения образцов пластинку помещают во влажную камеру и инкубируют при комнатной температуре в течение 18-24 часов.

5. После завершения процесса иммунодиффузии, при котором антигены и антитела перемещаются навстречу друг другу из лунок с растворами в свободный объем геля с образованием полос преципитации, пластину накрывают листом фильтровальной бумаги равного размера, смоченным в 1 М растворе хлорида натрия.

Поверх него помещают около 20 слоев сухой фильтровальной бумаги и отжимают в течение 15 мин под грузом (1 кг). После этой процедуры гель становится более плотным и прочнее удерживается на стеклянной пластине.

6. После уплотнения геля стеклянную пластину погружают на 20 минут в 1М раствор NaCl, затем 2 раза по 10 минут в дистиллированную воду. Нельзя допускать соскальзывания геля со стеклянной пластины.

7. Гель накрывают листом фильтровальной бумаги, смоченным в дистиллированной воде, на который помещают около 20 слоев сухой фильтровальной бумаги и отжимают в течение 10 минут под грузом (1 кг).

8. Высушивают в термостате при 60 °С до полного высыхания геля.

9. Помещают пластину в красящий раствор на 5 минут.

10. После окрашивания пластинку промывают под водой, а затем в обесцвечивающий раствор на 10 минут, чтобы устранить фоновое окрашивание. При необходимости, процедуру обесцвечивания можно повторить несколько раз.

11. После удаления фонового окрашивания пластину промывают водой и высушивают в термостате при 60 °С до полного высыхания.

При оптимальном соотношении между антигенами и антителами после окончания диффузии полосы преципитации располагается примерно на середине расстояния между лунками. Если один из компонентов реакции присутствует в большем количестве, чем другой, то полоса преципитации сдвигается в сторону лунки с меньшим содержанием реагента. При исследовании двух и более антигенов на предмет их взаимодействия с антителами лунки с антигенами можно расположить рядом, на одном расстоянии от антител. В случае формирования преципитатов обоими растворами антигенов с одними и теми же антителами полосы преципитации пересекаются. Характер взаимодействия двух полос преципитации разных веществ позволяет определить сходство и различия в антигенных свойствах этих веществ. Варианты взаимодействия двух полос преципитации могут быть следующими (рис. 16):

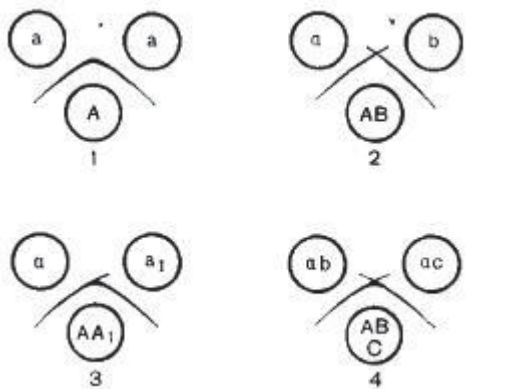


Рисунок 16. Варианты взаимодействия полос преципитации

1. Обе полосы преципитации полностью сливаются. Это говорит об идентичности обоих антигенов.

2. Полосы преципитации пересекаются. Это значит, что реагирующие с антисывороткой детерминанты антигенов не идентичны и, следовательно, сами антигены различны.

3. Одна полоса длиннее и продолжается за другую в виде, так называемой, "шпоры". "Шпора" часто бывает тоньше основной полосы преципитации. Полоса преципитации от второй лунки с антигеном сливается с первой полосой. Это означает, что оба антигена обладают некоторыми общими детерминантами и образуют с соответствующими антителами иммунные комплексы, приводящие к слиянию полос. Кроме того, один из антигенов имеет дополнительные эпитопы, в отличие от второго, что при наличии соответствующих антител в антисыворотке приводит к образованию "шпоры".

4. Обе полосы преципитации перекрещиваются и сливаются одновременно. Это означает, что оба антигена содержат как одинаковые, так и различные детерминанты, которые вступают в реакцию с антителами полиспецифической антисыворотки.

Иммуноферментный анализ (ИФА) в полистирольном планшете – лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов и антител. В основе ИФА лежит принцип специфического взаимодействия между антигеном и соответствующим ему антителом. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием так называемого конъюгата, который представляет собой анти-антитело, соединённое (конъюгированное) с ферментной меткой (обычно используют фермент пероксидазу хрена

или щелочную фосфатазу), позволяющее визуализировать комплексы антиген-антитело в результате взаимодействий ферментов с субстратами, дающие окрашенные продукты. Чтобы обнаружить соединение меченых антител с антигеном, добавляют субстрат (хромоген), разлагаемый присоединенным ферментом, вместе с хромогеном, который окрашивается в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфатаза) цвет.

1. Сорбция и нанесение антигена. В 1 столбик с 1-8 лунку внести 100 мкл антигенов. Во все оставшиеся лунки внести 50 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Инкубация проводится в течении 30 минут при комнатной температуре.

2. Блокировка. Для блокирования свободных связей на полистирольные лунки вносят по 100 мкл раствора ПЭГ-20000 в качестве балластного соединения на 30 минут.

3. Внесение АТ, специфичных к выявляемым бактериям. В пластиковой ванночке смешать 4,5 мл PBS + 0,5 мл ПЭГ-20000 + 50 мкл специфических АТ. Внести в лунки планшета по 50 мкл в каждую лунку и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.

4. Отмывка. Внести в планшет 100 мкл PBS+Твин-20 и инкубировать 12 минут. Повторить отмывку 3 раза.

5. Внесение вторичных антител. В ванночке смешать 9 мл PBS+Твин-20 и 1 мл ПЭГ-20000 + 20 мкл вторичных АТ (конъюгатов анти-антител с пероксидазой). Внести в каждую лунку планшета по 50 мкл. Инкубировать в течение 30 минут.

6. Отмывка. Внести в планшет 100 мкл PBS+TWIN оставить в шейкере на 10 минут повторить 2 раза.

7. Внести по 50 мкл в каждую лунку планшета субстратного раствора, содержащего 0,1 М цитратный буфер + 0,03% орто-фенилендиамина + 0,02% H_2O_2 и оставить до проявления реакции (5-15 минут), затем добавить в лунки по 100 мкл 1н H_2SO_4 для остановки ферментативной реакции.

8. Измерить оптическую плотность растворов в каждой лунке с помощью планшетного фотометра при длине волны 490 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение биотизации на основе создания активно функционирующих растительно-микробных ассоциаций является многообещающим направлением, которое привлекает все большее внимание исследователей в области сельского хозяйства, садоводства и лесного хозяйства. Культура тканей растений является одним из важных методов в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений, в том числе картофеля.

В ряде исследований отечественных и зарубежных авторов показано, что инокуляция растений ризосферными бактериями, в том числе в культуре *in vitro*, приводит к усилению развития побегов и особенно корней, повышению адаптационной способности, устойчивости к патогенам и абиотическим факторам среды и, в конечном итоге, к повышению продуктивности растений.

На рисунке 17 показаны некоторые преимущества оптимизации технологии микроклонального размножения растений с использованием приема биотизации микрорастений *in vitro*.

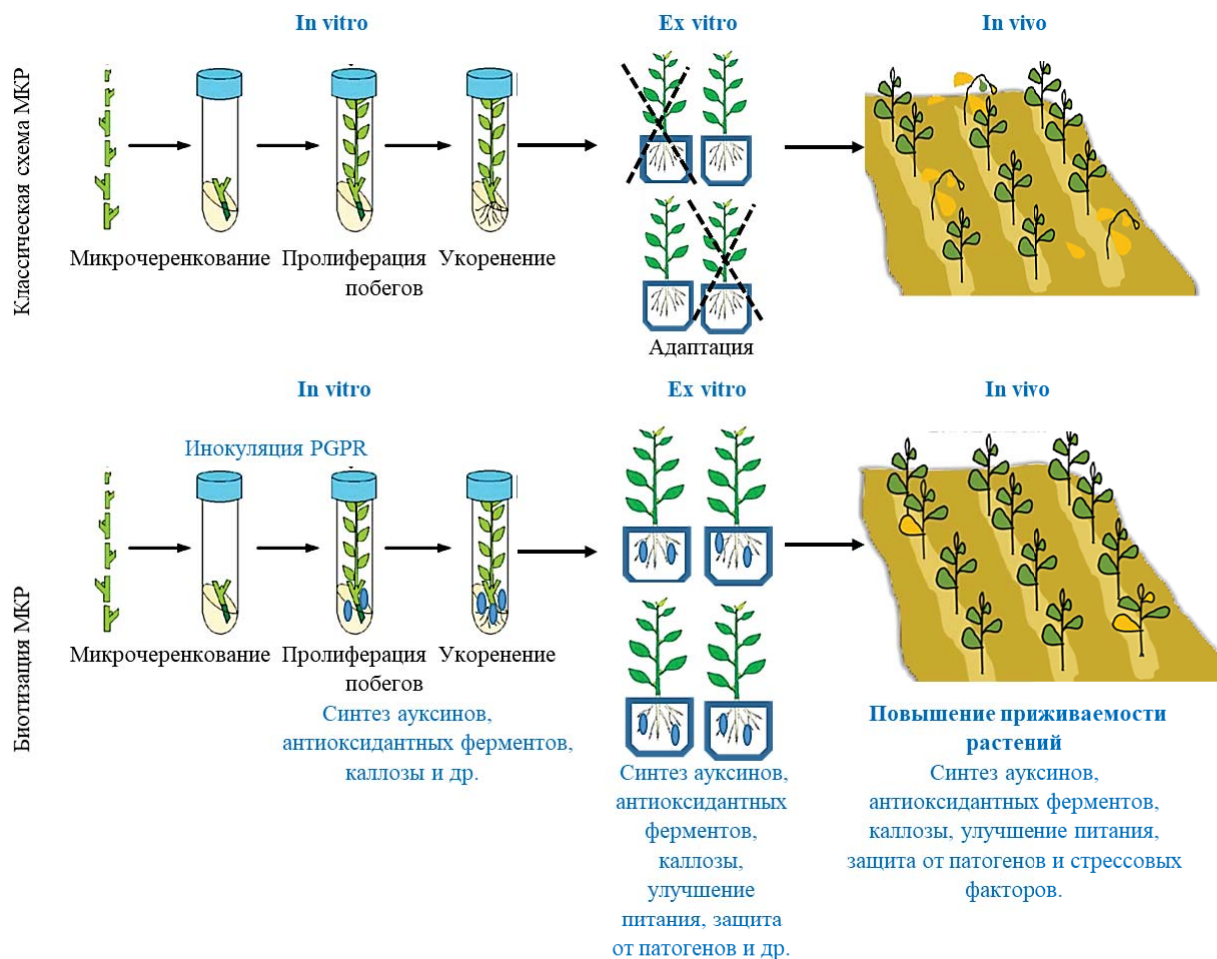


Рисунок 17. Схема преимущества применения ризосферных бактерий (PGPR) при микроклональном размножении (МКР) растений

Несомненным преимуществом использования ризосферных бактерий является низкая стоимость биопрепаратов на основе живых микроорганизмов, что не приведет к существенному удорожанию технологии микроклонального размножения, а в купе с повышением эффективности метода позволит повысить рентабельность производства оздоровленного посадочного материала.

Эффективность использования ризосферных бактерий различных таксономических групп изучена недостаточно. Пока известна рост-стимулирующая активность в культуре тканей небольшого круга бактерий родов *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum* и *Methylobacterium*. Наши исследования позволили выявить положительное влияние на микро-растения картофеля еще нескольких PGPR штаммов: *Azospirillum baldaniorum* Sp245, *Azospirillum brasilense* Sp7, S27, SR80, *Azospirillum lipoferum* SR42, *Azospirillum halopraeferens* Au4, *Ensifer adhaerens* T1Ks14, *Kocuria rosea* T1Ks19, *Acinetobacter guillouiae* K2Kn02 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2.

Знания о поведении PGPR на уровне корней, листьев или всего растения и их функциях в естественной среде все еще ограничены. В будущем потребуются много исследований для отбора эффективных, многофункциональных, стрессоустойчивых микроорганизмов, обладающих экологической пластичностью, пригодных для их использования в культуре тканей растений. Действительно, широкое разнообразие возможных применений полезных микробов в культуре растительных тканей открывает новые возможности для выявления подходящих кандидатов, которые будут использоваться на разных стадиях микроразмножения, с особым вниманием к созданию консорциумов сочетаемых штаммов для обеспечения преимуществ их функциональной взаимодополняемости.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ И РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю., Сигида Е.Н., Щеголев С.Ю. Практические занятия по физико-химическим методам исследования биополимеров: Учебно-методическое пособие. Саратов: Изд-во «Новый ветер». 2013. 54 с. ISBN 978-5-98116-157-5

Бурыгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Евсеева Н.В., Ткаченко О.В. Особенности инокуляции растений ризосферными бактериями как фактор повышения эффективности микроклонального размножения картофеля // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2018. Т. 14, №2. С. 12-16.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. 160 с. ISBN 5-89240-059-х

Генетические основы селекции растений. Том 3 Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия/ Анохина В.С. [и др.] Минск: Белорусская наука, 2012, 490 с. ISBN 978-985-08-1392-3

Демидчик В.В., Черныш М.А., Дитченко Т.И., Спиридович Е.В., Пржевальская Д.А., Падутов В.Е. Микроклональное размножение растений // Наука и инновации. 2019. 6(196). С. 4-11.

Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: Курс лекций. Минск: БГУ. 2007. 102 с.

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

Калинин Ф.Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Метод культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка. 1980. 399 с.

Лутова Л.А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. Изд-во СПбГУ, 2010. 238 с. ISBN 978-5-288-05048-0

Пузанков О.П. Методические указания по оздоровлению семенного картофеля / О.П. Пузанков, А.К. Гришанович и др. Минск «Урожай». 1988 С. 29.

Растительная клеточная стенка как динамичная система / Горшкова Т.А.; [отв.ред. И.А. Тарчевский]; Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН. М.: Наука, 2007. 429 с.

Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства оздоровленного исходного материала в элитном семеноводстве картофеля. М.: ГПУ «Агропрогресс», 2000. С. 23.

Титов, А. Ф., Таланова, В. В., Казнина, Н. М. Практикум по курсу «Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам»: Учебно-методическое пособие. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2013. 63 с.

Физиология растений: Учебник / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева М.: «Абрис», 2011. 783 с.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 1973. Vol. 39. P. 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

Bradford M.N. The rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254.

Burygin G.L., Kargapolova K.Yu., Kryuchkova Ye.V., Avdeeva E.S., Gogoleva N.E., Ponomaryova T.S., Tkachenko O.V. Ochrobactrum cytisi IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35(4). P. 55. DOI: 10.1007/s11274-019-2633-x

Kargapolova, K.Y., Burygin, G.L., Tkachenko, O.V., Evseeva N.V., Pukhalskiy Y.V., Belimov A.A. Effectiveness of inoculation of in vitro-grown potato microplants with rhizo-sphere bacteria of the genus Azospirillum // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2020. 141. P. 351-359. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01791-9>

Millet, Y. A., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D., & Ausubel, F. M. Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell*, 2010. Vol. 22(3). P. 973-990.

Nowak J. Benefits of in vitro “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1998. 34. P. 122-130. doi:10.1007/BF02822776

Orlikowska T., Nowak K., Reed B. Bacteria in the plant tissue culture environment // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2017. 128. P. 487-508. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1144-9>

Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition V. 1. The Background / Edited by E.F. George, M.A. Hall, G-J. De Klerk – Netherlands: Springer. 2008. 504 p. ISBN 978-1-4020-5004-6 (HB). ISBN 978-1-4020-5005-3 (e-book).

Soumare A., Diédhiou A.G., Arora N.K., Al-Ani L.K.T., Ngom M., Fall S., Hafidi M., Ouhdouch Y., Kouisni L., Sy M.O. Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture // *Front. Microbiol*. 2021. Vol. 12. № 649878. doi: 10.3389/fmicb.2021.649878

Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Y., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum*. *Agron. Sustain. Develop*. 2015. 35. P. 1167–1174. DOI 10.1007/s13593-015-0304-3.

Tortora, M. L., Díaz-Ricci, J. C., & Pedraza, R. O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and soil*. 2012. Vol. 356(1). P. 279-290.

Wellburn A.R. The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol*. 1994. Vol. 144. P. 307-313.

Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Загоруйко М.В., Бурыгин Г.Л.

ПРИМЕНЕНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ КАРТОФЕЛЯ

Методические рекомендации

ISBN 978-5-00140-925-0



Подписано в печать 10.12.2021 г.
Формат 60×90 1/16. Гарнитура Times New Roman. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 2,75. Тираж 100 экз. Заказ № 1012-21.

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами
в ООО «Амитит», 410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.
Тел.: 8-800-700-86-33 | (845-2) 24-86-33
E-mail: zakaz@amirit.ru
Сайт: amirit.ru