

УДК 631.52;630.165.3;577.21

СОХРАНЕНИЕ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ У ЭЛИСИТОРНОГО БИОПРЕПАРАТА СПОСОБНОСТИ ИНДУЦИРОВАТЬ СИСТЕМНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ

И. А. ГРИНЕВА¹⁾, Ю. М. КУЛЕШОВА¹⁾, В. А. ЛОМОНОСОВА¹⁾, Д. В. МАСЛАК¹⁾,
Л. Е. САДОВСКАЯ¹⁾, Т. Л. СКАКУН¹⁾, И. Н. ФЕКЛИСТОВА¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Установлено, что хранение при комнатной температуре в течение 6 месяцев элиситорного препарата на основе бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *Bacillus subtilis* 494 не снижает его способности индуцировать системную устойчивость растений. Это проявляется в достоверном увеличении морфологических параметров обработанных препаратом проростков рапса в экспериментальных условиях действия засоления.

Ключевые слова: *Pseudomonas*; *Bacillus*; элиситоры; растения рапса; засоление.

Образец цитирования:

Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Скакун Т. Л., Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Сохранение в процессе хранения у элиситорного биопрепарата способности индуцировать системную устойчивость // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 63–67.

For citation:

Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., Maslak D. V., Sadovskaya L. E., Skakun T. L., Feklistova I. N., Maximova N. P. The elicitor preparation retains the ability to induce systemic resistance during storage. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 63–67 (in Russ.).

Авторы:

Ирина Александровна Гринева – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Юлия Михайловна Кулешова – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Вероника Александровна Ломоносова – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Диана Викторовна Маслак – заведующий сектором молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов кафедры генетики биологического факультета.

Людмила Евгеньевна Садовская – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Татьяна Леонидовна Скакун – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Николаевна Феклистова – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

Authors:

Irina A. Grineva, senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

grineva_ia@mail.ru

Yuliya M. Kuleshova, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

yuliakuleshova@yahoo.co.uk

Veronica A. Lomonosova, researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

nikaglad@gmail.com

Diana V. Maslak, head of the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the department of genetics, faculty of biology.

diana-maslak@yandex.ru

Ludmila E. Sadovskaya, senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

ludmilasadovskaya@rambler.ru

Tatyana L. Skakun, senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

stanyisik@yandex.ru

Irina N. Feklistova, PhD (biology); head of the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

feklistova_iren@rambler.ru

Natalia P. Maximova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

nataliamaximova@yahoo.com

THE ELICITOR PREPARATION RETAINS THE ABILITY TO INDUCE SYSTEMIC RESISTANCE DURING STORAGE

I. A. GRINEVA^a, Y. M. KULESHOVA^a, V. A. LOMONOSOVA^a, D. V. MASLAK^a,
L. E. SADOVSKAYA^a, T. L. SKAKUN^a, I. N. FEKLISTOVA^a, N. P. MAXIMOVA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: I. A. Grineva (grineva_ia@mail.ru)

It was established that the elicitor preparation based on bacteria *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 and *Bacillus subtilis* 494 retains the ability to induce systemic resistance for six months at room temperature, and increases reliably the morphological parameters of preparation-processed rapeseed plants under the salinity conditions.

Key words: *Pseudomonas*; *Bacillus*; elicitors; rape plants; salinization.

В научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ в рамках государственной программы «Научные технологии и техника» на 2016–2020 гг. разрабатывается биопрепарат, принадлежащий к новой группе средств защиты растений на основе элиситоров, которые являются более совершенными по сравнению с традиционными химическими средствами. В результате действия такого препарата у растений повышается способность противостоять неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам окружающей среды с помощью собственных метаболитов [1]. Разрабатываемый элиситорный препарат создан на основе культуральных жидкостей PGPR-бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *Bacillus subtilis* 494, может быть использован в низких концентрациях, которые достаточны для индукции иммунного отклика растений, что приводит к более полной реализации защитного генетического потенциала растений [2; 3]. Токсико-гигиеническая безопасность элиситорного препарата подтверждена заключением РУП «Научно-практический центр гигиены».

Выдвинуто предположение, что элиситорный препарат на основе инактивированных бактерий будет сохранять свои фитопротекторные свойства длительное время при хранении в условиях комнатной температуры.

Материалы и методы исследований

В работе использован штамм бактерий *Pseudomonas* флуоресцирующей группы из коллекции биологического факультета БГУ – *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* 162, а также штамм *B. subtilis* 494.

Посевной материал бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 получали при индивидуальном культивировании. Дальнейшее совместное культивирование бактерий указанных штаммов осуществляли в колбах Эрленмейера с 50 мл среды на основе солевого концентрата М9 с мелассой (0,2 %); общее количество посевного материала составляло 5 %, соотношение штаммов в посевном материале равнялось 1 : 1; культивирование проводили при 28 °С в течение 4 ч, затем – при 35 °С до 48 ч; титр каждого штамма бактерий в образцах был не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ.

Для получения элиситорного препарата культивированную вышеописанным методом бактериальную суспензию термически обрабатывали при 100 °С в течение 15 мин, хранили при комнатной температуре в герметично и стерильно закупоренных стеклянных сосудах.

Для изучения сохранения способности индуцировать устойчивость к засолению образцами элиситорных препаратов семена рапса сорта Зорный проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри с 5 мл раствора NaCl (концентрация составляла 150 ммоль/л) и элиситорным препаратом, разведенным в 1000 раз. Результаты экспериментов оценивали по изменениям параметров роста семидневных проростков.

Результаты исследований и их обсуждение

Полученный элиситорный препарат сразу после приготовления был протестирован на способность индуцировать системную устойчивость у растений. Установлено, что применение элиситорного препарата повышало устойчивость растений рапса в условиях засоления (раствор NaCl в концентрации 150 ммоль/л), что проявилось в достоверном увеличении длины стебля на 41,54 % и длины корня – на 77,98 % по сравнению с контролем (рис. 1 и 2, а).

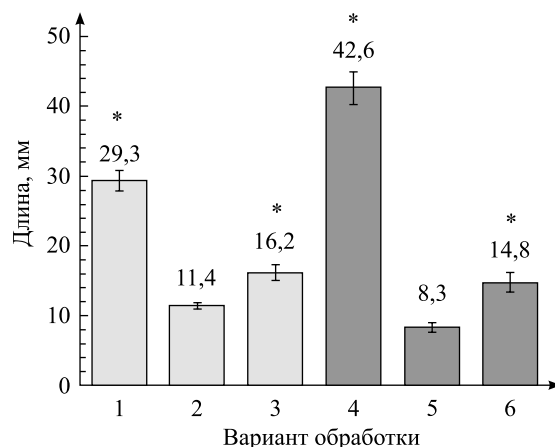


Рис. 1. Длина побегов (□) и корней (■) растений рапса в случае засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л при использовании свежеприготовленного образца элиситорного препарата:
1 и 4 – обработка водой (контроль);
2 и 5 – обработка водой, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л (контроль);
3 и 6 – обработка элиситорным препаратом, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л;
*выборки статистически значимо различаются при $p < 0,05$

Fig. 1. Length of shoots (□) and roots (■) of rape plants treated with a freshly prepared elicitor preparation under salinity conditions (150 mmol/l NaCl):
1 and 4 – water treatment (control);
2 and 5 – water treatment, salinity 150 mmol/l NaCl (control);
3 and 6 – treatment with elicitor preparation, salinity 150 mmol/l NaCl;
*samples are statistically significantly different at $p < 0.05$

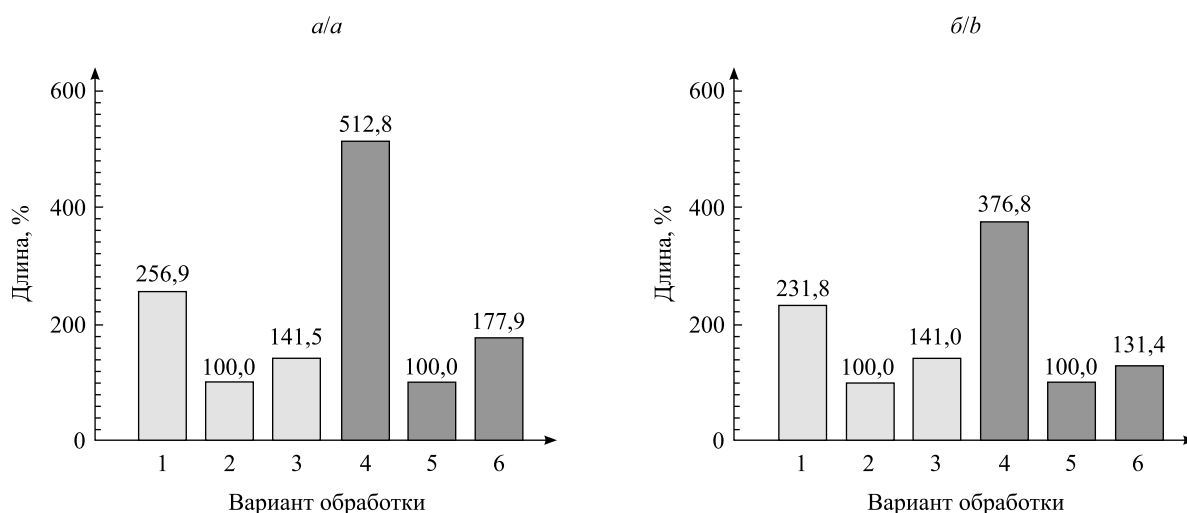


Рис. 2. Длина побегов (□) и корней (■) растений рапса в случае засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л при использовании образцов элиситорного препарата, %:
а – обработка свежеприготовленным элиситорным препаратом;
б – обработка элиситорным препаратом, хранившимся 6 месяцев;
1 и 4 – обработка водой (контроль);
2 и 5 – обработка водой, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л (контроль);
3 и 6 – обработка элиситорным препаратом, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л

Fig. 2. Length of shoots (□) and roots (■) of rape plants (in %) treated with samples of the elicitor preparation under salinity conditions (150 mmol/l NaCl):
а – treatment with freshly prepared elicitor preparation;
б – treatment with elicitor preparation, stored for 6 months;
1 and 4 – water treatment (control);
2 and 5 – water treatment, salinity 150 mmol/l NaCl (control);
3 and 6 – treatment with elicitor preparation, salinity 150 mmol/l NaCl

После тестирования элиситорный препарат стерильно укупорили в стеклянную тару и хранили при комнатной температуре 6 месяцев. Затем был проведен повторный эксперимент по обработке элиситорным препаратом растений рапса того же сорта в условиях засоления.

Установлено, что применение элиситорного препарата, хранившегося в течение 6 месяцев, также положительно повлияло на устойчивость растений рапса в условиях засоления (раствор NaCl в концентрации 150 ммоль/л), что проявилось в достоверном увеличении длины стебля на 41,03 % и длины корня – на 31,36 % (рис. 2, б, и 3).

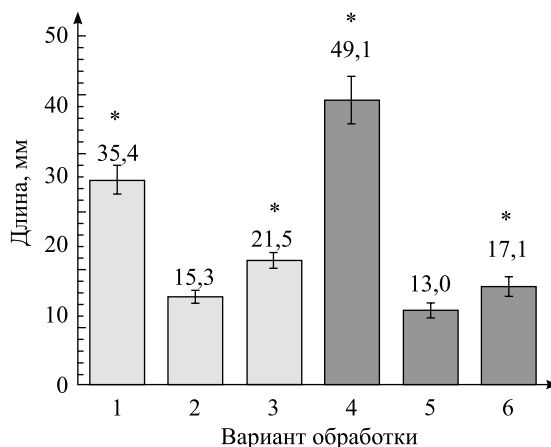


Рис. 3. Длина побегов (□) и корней (■) растений рапса в случае засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л при использовании образца элиситорного препарата после 6-месячного хранения при комнатной температуре:

- 1 и 4 – обработка водой (контроль);
2 и 5 – обработка водой, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л (контроль);
3 и 6 – обработка элиситорным препаратом, засоление NaCl в концентрации 150 ммоль/л;
*выборки статистически значимо различаются при $p < 0,05$

Fig. 3. Length of shoots (□) and roots (■) of rape plants treated with elicitor preparation after six months of storage at room temperature under salinity conditions (150 mmol/l NaCl):

- 1 and 4 – water treatment (control);
2 and 5 – water treatment, salinity 150 mmol/l NaCl (control);
3 and 6 – treatment with elicitor preparation, salinity 150 mmol/l NaCl;
*samples are statistically significantly different at $p < 0.05$

Следует отметить, что длина корня рапса при использовании свежеприготовленного биопрепарата увеличилась на 77 % по сравнению с контролем, а при применении хранившегося препарата – на 33 %. Это явление может быть связано с сезоном проведения экспериментов (в первом случае – весна, во втором – осень), что подтверждается изменением длины корня контрольных растений, выращиваемых без засоления.

Таким образом, в результате проведенных лабораторных исследований на растениях рапса в условиях засоления (раствор NaCl в концентрации 150 ммоль/л) установлено, что биопрепарат на основе бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 сохраняет свои элиситорные свойства не менее 6 месяцев при хранении в условиях комнатной температуры и способен достоверно увеличивать морфологические параметры обработанных им растений рапса в условиях действия засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л.

Существенным недостатком биопрепаратов в процессе реализации является необходимость их хранения при 4 °C для проявления ими заявленных свойств. Разрабатываемый нами элиситорный препарат лишен этого ограничения. Исследования по проверке сохранения элиситорных свойств препарата, разрабатываемого в БГУ, продолжаются. Можно предположить, что срок хранения элиситорного препарата будет не менее, чем у существующих зарубежных аналогов – Агата-K25 (1,5 года) [4] и Глауксина (3 года) [5].

Данные об индукции устойчивости у растений длительное время хранившимся термически обработанным биопрепаратом согласуются с информацией о том, что элиситорные свойства биологических препаратов связаны с наличием в них фрагментов клеток и метаболитов бактерий [6]. В случае хранения в стерильных условиях при комнатной температуре элиситорные молекулы разрабатываемого биопрепарата в течение 6 месяцев не потеряли способности индуцировать у растений устойчивость к засолению.

Библиографические ссылки

1. Соколов Ю. А. Элиситоры и их применение в растениеводстве. Минск : Беларуская навука, 2016.
2. Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А. и др. Индукция устойчивости у растений рапса к засолению элиситорами – производными бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 38–43.
3. Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А. и др. Индукция устойчивости у растений рапса к засолению элиситорным препаратом на основе бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : тез. докл. X Междунар. науч. конф. (Минск, 5–9 июня 2017 г.). Минск, 2017. С. 130–132.
4. «Агат-25К» – биологический препарат с фунгицидной и ростостимулирующей активностью [Электронный ресурс]. URL: <http://www.agat-25k.ru/agat-25k/> (дата обращения: 20.08.2017).
5. Глауксин (весна) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gardenbio.ru/products/1/> (date of access: 20.08.2017).
6. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore : Springer Science : Business Media, 2016.

References

1. Sokolov Y. A. Elicitors and their application in plant growing. Minsk : Belaruskaja navuka, 2016 (in Russ.).
2. Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., et al. Induction of resistance to salinization in rape plants under the influence of elicitors derived from *Pseudomonas* and *Bacillus* bacteria. *J. Belarus. State Univ.* 2017. No. 1. P. 38–43 (in Russ.).
3. Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., et al. Induction of resistance in plants of rape to salinity with an elicitor preparation based on the bacteria *Pseudomonas* and *Bacillus*. *Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects* : abstr. of the X Int. sci. conf. (Minsk, 5–9 June, 2017). Minsk, 2017. P. 130–132 (in Russ.).
4. «Agat-25K» biological preparation with fungicidal and growth-stimulating activity. URL: <http://www.agat-25k.ru/agat-25k/> (date of access: 20.08.2017) (in Russ.).
5. Glaucin (spring). URL: <http://www.gardenbio.ru/products/1/> (date of access: 20.08.2017) (in Russ.).
6. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore : Springer Science : Business Media, 2016.

Статья поступила в редколлегию 13.09.2017.

Received by editorial board 13.09.2017.