

УДК 581.6:579.64

## Использование *Azospirillum brasilense* Sp245 для повышения эффективности микроклонального размножения смолевки меловой (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng.)

© 2017 г. Т.А. КРИЦКАЯ<sup>1,\*</sup>, Н.В. ЕВСЕЕВА<sup>2,\*\*</sup>, Г.Л. БУРЫГИН<sup>2</sup>, А.С. КАШИН<sup>1</sup>, С.Ю. ЩЕГОЛЕВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов, 410012

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российская академия наук, Саратов, 410049

\*e-mail: kriteckaiata@gmail.com,

\*\*e-mail: evseeva\_n@ibppm.ru

Поступила в редакцию 28.10.2016

Принята в печать 01.11.2016

Впервые применена инокуляция ризобактериями *Azospirillum brasilense* Sp245 растения кальцефильного вида – смолевки меловой (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng.) – с целью оптимизации его микроклонального размножения. Методами иммуноферментного анализа, флуоресцентной микроскопии и бактериологического посева подтверждена колонизация бактериями корней эксплантов *in vitro* и выявлены сопутствующие морфологические признаки колонизации. Установлено, что инокуляция растений ростстимулирующими ризобактериями *A. brasilense* Sp245 на стадии культивирования *in vitro* оказывает значительный положительный эффект на адаптацию регенерантов *ex vitro* (приживаемость увеличивается до 90% и более), повышая тем самым эффективность всего процесса микроклонального размножения *S. cretacea*.

**Ключевые слова:** адаптация *ex vitro*, микроклональное размножение, *Azospirillum brasilense* Sp245, *Caryophyllaceae*, *Silene cretacea*.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-1-72-79

Смолевка меловая (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng.) – эндемичный кальцефильный полукустарник, принадлежащий семейству Caryophyllaceae. Этот редкий вид занесен в Красную книгу Российской Федерации и включен в Приложение I Бернской конвенции [1]. На территории Саратовской области единственная популяция *S. cretacea* обнаружена в 2008 г.; до этого данный вид не отмечался в регионе более 150 лет [2]. В этой связи представляется чрезвычайно важным восстановление численности популяций смолевки меловой.

В прикладном аспекте *S. cretacea* интересна тем, что является перспективным источником веществ из класса фитоэкдистероидов – полигидроксированных стероидов, структурно идентичных и близких гормонам линьки насекомых. Доказано, что фитоэкдистероиды обладают противогрибковым, анаболическим, гипогликемическим, гепатопротекторным и тонизирующим действи-

ем, отличаясь при этом малой токсичностью и отсутствием гормонального воздействия на млекопитающих [3, 4].

Ранее нами были оптимизированы этапы стерилизации и микроразмножения культуры *S. cretacea* [5, 6]. При этом, однако, отмечался низкий уровень приживаемости растений *S. cretacea* в открытом грунте (не более 20%), что делало производство посадочного материала этой культуры данным методом неэффективным.

Перспективным путем повышения эффективности адаптации растений к условиям *ex vitro* представляется использование ростстимулирующих ризобактерий (PGPR), которые могут улучшить ростовые параметры микроклонов *in vitro* [7, 8]. Одним из широко используемых родов среди PGPR является *Azospirillum* – свободноживущие граммотрицательные подвижные бактерии, взаимодействующие со многими видами растений, в том числе и с представителями семейства

Список сокращений: ИФА – иммуноферментный анализ; КЖ – культуральная жидкость; ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Analysis) – ИФА с использованием иммуносорбента; IgG – иммуноглобулин G; MSM (Malate-Salt Medium) – малатно-солевая среда; PBS (Phosphate-Buffered Saline) – фосфатно-солевой буфер; PGPR (Plant-Growth-Promoting *Rhizobacteria*) – ризобактерии, стимулирующие рост растений.

Caryophyllaceae [9], и снабжающие их азотом, минеральными веществами, фитогормонами и витаминами. В результате увеличивается абсорбционная поверхность корней и улучшается интенсивность минерального питания растений [10]. Было показано [11], например, что бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 активируют развитие корневой системы микроклонов картофеля *in vitro*, стимулируют адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также способствуют увеличению урожая миниклубней.

В работе [12] сообщалось, что при инокуляции микропобегов плодовых деревьев р. *Prunus* бактерии *A. brasilense* Sp245 улучшают образование корней и качество микропобегов *in vitro*, при этом сокращая время культивирования. Опытный материал отличался большим размером стеблей и количеством междоузлий относительно контроля на 75% и 65%, соответственно. Было также показано, что *A. brasilense* Sp245 регулирует численность патогенных микроорганизмов *Rhizoctonia* ssp., которые являются наиболее частой причиной гибели регенерантов на этапе адаптации [13].

Исходя из вышеизложенного, цель нашего исследования состояла в повышении эффективности клонального микроразмножения *S. cretacea* за счет оптимизации процесса укоренения и последующей адаптации полученных регенерантов к условиям *ex vitro* путем использования ростстимулирующих ризобактерий *A. brasilense* Sp245.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Методика биотехнологических исследований основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурами тканей и органов растений при соблюдении условий асептики [14]. В качестве базовой культуральной среды использовали WPM [15] (Sigma-Aldrich, Германия) без фитогормонов, содержащую 0,6% агар-агара (AppliChem-Panreac, Великобритания), с pH 5,9–6,1. Для эксплантации на питательную среду использовали сегменты побегов растений-регенерантов высотой  $16,1 \pm 0,8$  мм и узлами  $2,4 \pm 0,2$ , полученных на этапе микроразмножения.

Все эксперименты выполняли в трех повторностях. Для результатов, отраженных в табл. 1, в каждой повторности отбирали 20 эксплантов. Общее число растений в экспериментах, результаты которых приведены в табл. 2, составило 180. В табл. 1 представлены средние арифметические значения и доверительные интервалы при уровне значимости  $P = 0,05$  (и доверительной вероятности 95%), рассчитанные по стандартным отклоне-

ниям с использованием пакета программ Statistica for Windows, v.6. Статистическую обработку результатов определения доли укорененных эксплантов (см. табл. 1) и приживаемости растений-регенерантов (см. табл. 2) проводили по формулам для двояковозможной изменчивости [16] при  $P = 0,05$ .

## Укоренение и бактериализация

Экспланты высаживали в пластиковые контейнеры объемом 350 мл, содержащие 50 мл питательной среды, по 10 штук в один контейнер. Расстояние между эксплантами составляло  $17,3 \pm 1,0$  мм. Для изучения влияния PGPR на растения-регенеранты была проведена инокуляция последних ризобактериями *Azospirillum brasilense* штамма Sp245. Бактерии были получены из коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов). Культуру выращивали при 28°C на ротационном шейкере ES-20/60 (BioSan, Латвия) с интенсивным перемешиванием (120 об/мин) до окончания экспоненциальной фазы роста (18 ч) на жидкой малатно-солевой среде (MSM) следующего состава, г/л: Na-малат – 5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4; NaCl – 0,1;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,002;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1 (pH 6,8–7,0). Клетки осаждали центрифугированием при 3000 г и суспендировали в 0,12 М фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем следующие компоненты, г/л:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,43;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1,68; NaCl – 7,2 (pH 7,2). Для отмывки бактерий от остатков КЖ проводили еще два повторных центрифугирования в стерильном растворе PBS.

Для инокуляции смолевки бактериями за основу была взята методика Tkachenko et al. [11]. Бактериальную суспензию добавляли в контейнеры методом штрихов до конечной концентрации в питательной среде  $10^5$ ,  $10^6$  и  $10^7$  кл/мл сразу после того, как экспланты помещали на питательную среду. Контролем служили неинокулированные экспланты. Контейнеры с эксплантами выдерживали в ростовой камере KBW-400 (Binder, Германия) с температурой 25°C, освещением 2–3 тыс. лк и фотопериодом 16/8 ч (день/ночь) в течение 15 сут.

## Иммунофлуоресцентное микроскопическое выявление бактерий на корнях растений

Фрагменты корней растений-регенерантов помещали на 30 мин. сначала в 2%-ный водный раствор казеина («ДиаМ», Россия), затем на 30 мин

в раствор А (PBS, 0,02%-ный твин-20 (Panreac, Испания), 0,2%-ный казеин), содержащий антитела к бактериальным клеткам *A. brasilense* Sp245, полученные, как описано в [18]. Затем корни отмывали четырехкратно по 10 мин от несвязавшихся антител раствором Б (PBS, 0,02%-ный твин-20) и переносили на 30 мин в раствор А, содержащий козий антикроличий IgG (Alexa Fluor® 532 (H+L), Invitrogen, США) в рабочем разведении 1:500. После четырехкратного по 5 мин промывания от несвязавшихся антител раствором Б, корни исследовали с помощью микроскопа-лазерного диссектора Leica LMD 7000 (Leica Microsystems, Германия) под разным увеличением ( $\times 50$ – $\times 400$ ) с использованием светофильтра N21.

### Иммуноферментное выявление бактерий на корнях растений

Определение количества бактерий на колонизированных корнях проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Корни контрольных и опытных растений (фрагменты по 3 см, инокуляция бактериями из расчета  $10^5$  кл/мл) гомогенизировали и ресуспендировали в 0,5 мл PBS. Гомогенаты вносили в лунки полистирольного планшета и делали двукратные разведения в PBS, после чего был проведен иммуноферментный анализ (вариант ELISA), как описано в работе [17], со специфическими антителами к клеткам *Azospirillum brasilense* Sp245, полученными в работе [18].

### Микробиологическое тестирование

Данный анализ проводили для установления наличия жизнеспособных клеток *A. brasilense* Sp245, ассоциированных с корнями 15-суточных растений смолевки. Для этого из разных зон придаточных корней опытных и контрольных вариантов были вырезаны фрагменты длиной около 10 мм и помещены на MSM, содержащую 1,5% агар-агара. Образцы культивировали в термостате 3 сут при 30°C. После этого из зон обрастания проводили посев на MSM для последующего иммунодиффузионного анализа со штаммоспецифическими антителами против *A. brasilense* Sp245, полученными, как описано ранее [18].

### Иммунодиффузионный анализ

Двойную иммунодиффузию в агарозном геле бактериальных препаратов с антителами к клеткам *A. brasilense* Sp245 проводили по стан-

дартной методике [19]. Для получения препаратов клетки отмывали PBS, осаждали центрифугированием и обрабатывали в течение 30 мин при комнатной температуре экстрагирующим буфером (pH 8,5) следующего состава: 0,1 М трис-HCl («Хеликон», Россия), 10 мМ ЭДТА (0,05 ммоль на 1 г влажных клеток) (AnalaR, Великобритания), 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид («Хеликон»), 1% тритона X-100 (Serva, Германия). Экстракт освобождали от клеток центрифугированием. Реакцию преципитации проводили на стеклянных пластинах 9×9 см (ЛКВ, Швеция) в 1%-ном агарозном геле (ЛКВ), приготовленном на PBS. Результаты опытов оценивали через 1-2 сут. При этом пластины высушивали, окрашивали в растворе кумасси бриллиантового синего R-250 (ЛКВ) и обесцвечивали в водном растворе, содержащем 45% этилового спирта (ООО «Кировский биохимический завод», Россия) и 10% уксусной кислоты (ЗАО «НПО Экрос», Россия).

### Подсчет КОЕ в среде культивирования и на корнях растений

50 мг агаризованной среды или корней растений помещали в 0,5 мл PBS, гомогенизировали в фарфоровой ступке при комнатной температуре и затем готовили серию разведений  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  в PBS. Из каждого разведения аликвоту в 0,01 мл наносили на поверхность твердой MSM с добавлением 1,5% агар-агара («Хеликон») в чашках Петри (ООО «МиниМед», Россия) и растирали стерильным шпателем. Посевы проводили в 4 повторностях. Чашки инкубировали при 30°C в течение 3 сут, после чего проводили подсчет бактериальных колоний. Учитывая массу образцов и кратность их разведения буфером, рассчитывали число КОЕ на 1 г образца и доверительные интервалы при  $P = 0,05$  и доверительной вероятности 95%.

### Морфометрические параметры эксплантов

На 5, 10 и 15-е сутки после инокуляции бактериями оценивали основные морфометрические параметры микрорастений *S. cretacea*: длину экспланта, количество узлов и корней на одном экспланте, максимальную длину корня и долю укорененных эксплантов (см. табл. 1). Длину измеряли с помощью электронного штангенциркуля (Finch Industrial Tools, Канада).

**Морфометрические показатели опытных (инокулированных бактериями) и контрольных (неинокулированных) эксплантов *S. cretacea*****Morphometric characteristics of experimental (bacteria-inoculated) and control (non-inoculated) *S. cretacea* explants**

Концентрация бактериального инокулята в питательной среде, кл/мл	Доля укорененных эксплантов*, %	Количество узлов**	Длина побега**, мм	Количество корней**	Максимальная длина корня**, мм
<i>5-е сутки после инокуляции</i>					
0 (контроль)	36,9 ± 12,5	2,4 ± 0,2	16,1 ± 0,8	2,5 ± 0,2	2,0 ± 0,1
10 <sup>5</sup>	71,2 ± 11,7	3,3 ± 0,2	16,7 ± 1,1	3,1 ± 0,3	3,3 ± 0,2
10 <sup>6</sup>	47,0 ± 12,9	3,4 ± 0,3	19,8 ± 1,6	3,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2
10 <sup>7</sup>	24,3 ± 11,1	3,0 ± 0,2	15,3 ± 0,7	2,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1
<i>10-е сутки после инокуляции</i>					
0 (контроль)	91,3 ± 7,3	4,4 ± 0,3	22,3 ± 1,7	3,7 ± 0,3	3,9 ± 0,2
10 <sup>5</sup>	83,4 ± 9,6	5,1 ± 0,3	22,6 ± 1,8	3,8 ± 0,3	6,8 ± 0,5
10 <sup>6</sup>	90,9 ± 7,4	5,2 ± 0,4	23,3 ± 1,9	3,7 ± 0,3	5,0 ± 0,4
10 <sup>7</sup>	55,9 ± 12,8	4,2 ± 0,3	18,8 ± 1,7	3,1 ± 0,2	4,6 ± 0,4
<i>15-е сутки после инокуляции</i>					
0 (контроль)	100,0	7,4 ± 0,6	30,7 ± 2,3	6,5 ± 0,5	6,2 ± 0,6
10 <sup>5</sup>	94,0 ± 6,1	7,1 ± 0,6	25,6 ± 2,4	6,8 ± 0,6	9,6 ± 0,8
10 <sup>6</sup>	100,0	6,3 ± 0,5	23,7 ± 1,7	6,5 ± 0,6	7,8 ± 0,6
10 <sup>7</sup>	90,4 ± 7,6	4,9 ± 0,4	22,1 ± 2,0	4,2 ± 0,3	6,0 ± 0,5

\*Доля растений, имеющих указанный признак, ± половина доверительного интервала, рассчитанного по формулам работы [16] при  $P = 0,05$  и  $n = 60$ .

\*\*Среднее значение ± половина доверительного интервала, рассчитанного по стандартному отклонению при  $P = 0,05$ .

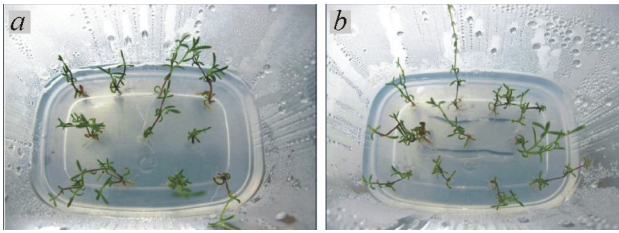
**Адаптация растений-регенерантов к нестерильным условиям**

Адаптацию укорененных растений-регенерантов проводили по методике [20]. Растения высаживали в пластиковые контейнеры объемом 300–500 мл, содержащие неперотравленный почвенный субстрат, состоящий из нейтрализованного торфяного грунта или перлита, или обоих компонентов в различных соотношениях. Растения поливали водой, а затем в качестве комплексного удобрения четырехкратно разбавленным водным раствором минеральных солей WPM (см. выше) (1,0–1,5 мл). Каждый контейнер накрывали полиэтиленовой пленкой и переносили в теплицу с теми же температурой и освещением, что и в рос-

товой камере (25°C, 2–3 тыс. лк, фотопериод 16/8 ч (день/ночь)). В течение последующих 3 нед полиэтилен перфорировали (по два прокола в сутки диаметром 5 мм), чтобы обеспечить постепенное снижение уровня влажности, а через 3 нед полностью удаляли. В качестве основного критерия на данном этапе оценивали долю жизнеспособных регенерантов в каждом варианте эксперимента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ****Укоренение**

Образование и рост корней длиной до 2 см и выше растениями смолевки меловой на агаризованной среде в условиях *in vitro* наблюдали в те-



**Рис. 1.** Экспланты *S. cretacea* на стадии укоренения: *a* – неинокулированные растения, *b* – экспланты, инокулированные бактериями *Azospirillum brasilense* Sp245 ( $10^5$  кл/мл). Штрихами на дне контейнера обозначены места нанесения инокулята

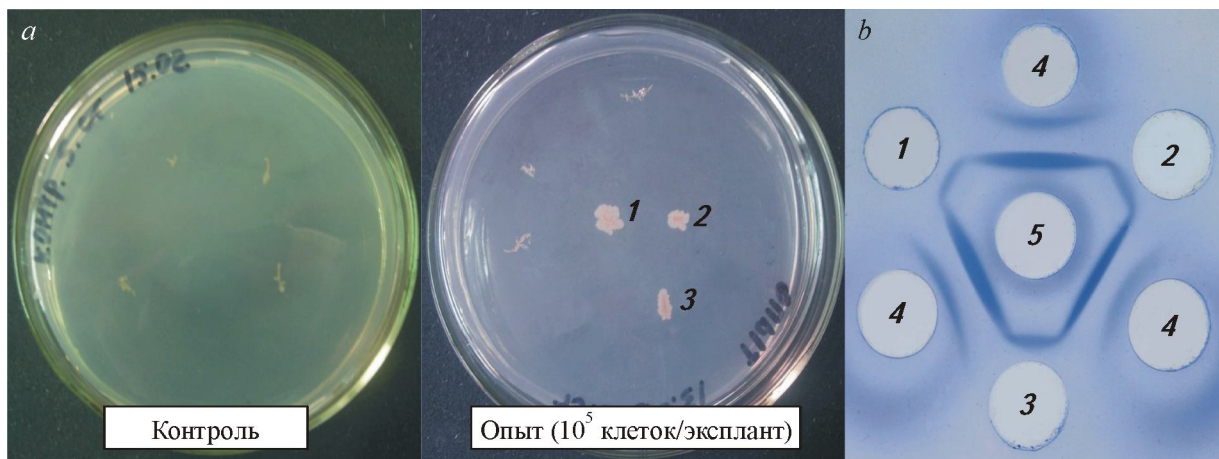
**Fig. 1.** *S. cretacea* explants at the stage of rooting: (*a*), non-inoculated plants; (*b*), explants inoculated by *Azospirillum brasilense* Sp245 bacteria ( $10^5$  cell/mL). Strokes at the bottom of the container indicate the site of the inoculum application

чение 2–3 нед. Доля укорененных эксплантов через 10–15 сут культивирования (см. табл. 1) составила в среднем  $88,2 \pm 6,4\%$ . Инокуляция эксплантов штаммом *Azospirillum brasilense* Sp245 на этапе ризогенеза в течение всего времени наблюдений не приводила к статистически достоверным различиям по морфометрическим параметрам между контролем и опытом, а также между опытными вариантами (см. табл. 1). Однако в опытных вариантах наблюдалось развитие корней второго порядка, чего не отмечалось в контрольных образцах.

После инокуляции эксплантов бактериальный рост в среде культивирования визуально не

выявлялся на протяжении всего эксперимента (рис. 1). При помещении сегментов корней на селективную малатно-солевую питательную среду вокруг примерно половины сегментов корней инокулированных растений наблюдалось образование бактериальных колоний, в отличие от сегментов контрольных растений, вокруг которых бактериальное обрастание отсутствовало (рис. 2, *a*). Из бактериальной массы вокруг разных сегментов корней опытных растений были выделены три культуры (изоляты): Si15a, Si15b и Si15c, ЭДТА-экстракты клеток которых в иммунодиффузионном анализе показали значительное сходство с культурой инокулята (*A. brasilense* Sp245) (см. рис. 2, *b*).

Важным аргументом в пользу применения именно азоспирилл в качестве PGPR на этапе укоренения эксплантов является то, что видовым биохимическим признаком штаммов *Azospirillum brasilense* является их неспособность усваивать сахарозу как источник углерода [21]. Поэтому при инокуляции культурой *A. brasilense* Sp245 растений-регенерантов, культивируемых на WPM, питательными веществами для бактерий могут служить только метаболиты (экссудаты) растений. В частности, это проявляется в том, что после бактериализации не происходит размножения бактерий в среде культивирования растений, о чем свидетельствует сохранение ее прозрачности (см. рис. 1). Подсчет КОЕ (на 1 г образца) показал, что в среде культивирования растений (вариант с ино-



**Рис. 2.** Выявление бактерий на корнях *S. cretacea* с помощью микробиологического теста (*a*) и иммунодиффузионного анализа (*b*). *a* (справа): 1, 2, 3 – сегменты корней 15-дневных эксплантов выращенных *in vitro*; *b*: 1, 2, 3 – экстракты из бактерий Si15a, Si15b и Si15c, соответственно, образовавших колонии; 4 – экстракт из клеток *A. brasilense* Sp245 (положительный контроль); 5 – антитела. Полосы преципитации свидетельствуют о положительном результате

**Fig. 2.** Detection of bacteria on the *S. cretacea* roots by the microbiological (*a*) and immunodiffusion (*b*) tests. (*a*): (1), (2) and (3), segments of 15-day explants grown *in vitro*; (*b*): (1), (2) and (3), extracts of colony-forming bacteria Si15a, Si15b and Si15c, respectively. (4), extract of *A. brasilense* Sp245 cells (positive control); and (5), antibodies. Precipitation bands testify to the positive result



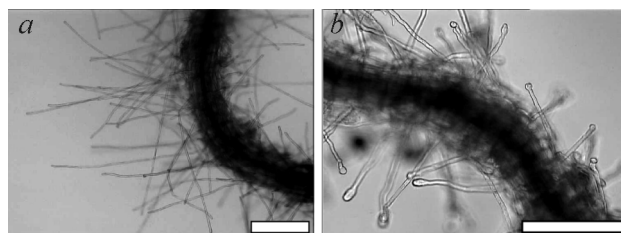
куляцией  $10^5$  кл/мл) численность бактерий снижается с  $(1,82 \pm 0,13) \cdot 10^5$  (сразу после инокуляции) до  $(2,62 \pm 0,57) \cdot 10^3$  (на 15-й день после инокуляции). При этом численность бактерий на корнях растений смолевки меловой остается практически постоянной и равной  $(9,66 \pm 1,11) \cdot 10^4$ . Методом ИФА было показано наличие антигенов штамма *A. brasilense* Sp245 в гомогенате корней опытных образцов, измеряемое величиной примерно  $(7 \pm 1) \cdot 10^4$  клеток на 1 см корней инокулированных растений (данные не приведены).

При микроскопировании корней было выявлено, что корневые волоски контрольных и опытных растений сильно различались по длине и форме. Так, корневые волоски опытных растений были намного короче и в большинстве своем деформированы (рис. 3). Методом иммунофлуоресцентной микроскопии на корнях инокулированных растений были выявлены отдельные бактериальные клетки (а иногда и скопления клеток), как на поверхности самого корня, так и на корневых волосках (рис. 4); в то же время, на корнях контрольных растений не было обнаружено бактериальных клеток, меченных флуорохромом.

Таким образом, показано, что бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 колонизируют корни эксплантов смолевки и сохраняют жизнеспособность к 15-му дню культивирования в условиях *in vitro*.

### Адаптация растений-регенерантов к нестерильным условиям

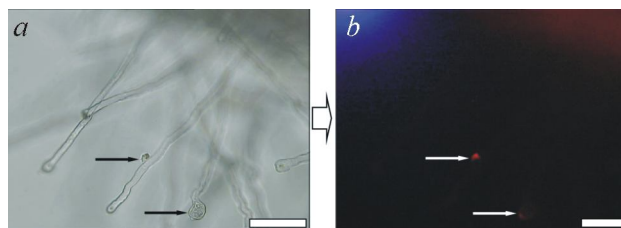
При высадке растений *S. cretacea* в грунт наиболее жизнеспособными оказались регенеранты, инокулированные бактериями. Приживаемость растений-регенерантов на этапе адаптации к нестерильным условиям варьировала в зависимости от субстрата и концентрации бактериального инокулята на этапе укоренения (см. табл. 2). При этом, чем выше была концентрация бактериальных клеток, тем больше растений успешно выдерживало адаптацию (коэффициент корреляции ( $r$ ) между этими показателями составил 0,509). Различия между двумя величинами (при данном уровне значимости  $P$ ) считаются достоверными постольку, поскольку среднее значение любой (каждой) из них находится вне пределов доверительного интервала другой сравниваемой величины [16]. С этой точки зрения различия между контрольными и опытными вариантами по доле жизнеспособных регенерантов (см. табл. 2) достоверны с вероятностью 95%.



**Рис. 3.** Участки корня экспланта контрольного (неинокулированного) (а) и опытного (инокулированного *A. brasilense* Sp245) (b) растения. Корневые волоски опытных растений короче и в большинстве своем деформированы. Масштабная полоса соответствует 400 мкм

**Fig. 3.** Segments of explant root of control (non-inoculated) (a) and experimental (*A. brasilense* Sp245-inoculated) (b) plants. Root hairs in experimental plants are shorter and mostly deformed. Scale strip corresponds to 400  $\mu$ m

Максимальное количество жизнеспособных растений-регенерантов (90,9%) отмечено на субстрате, состоящем из перлита, для растений, инокулированных на этапе укоренения штаммом *A. brasilense* Sp245 в концентрации  $10^7$  кл/мл. Приживаемость растений опытных вариантов при концентрации инокулята  $10^5$  и  $10^6$  кл/мл на всех видах субстратов также превосходила приживаемость контрольных растений, но достоверно уступала показателю растений, инокулированных азоспириллами в концентрации  $10^7$  кл/мл. Важно подчеркнуть, что в более стрессовых условиях эффект инокуляции был выше. Например, при использовании субстрата из торфяного грунта, слишком кислого для кальцефита, приживаемость регенерантов, обработанных азоспириллами в концентрации  $10^7$  кл/мл, оказалась в 2,5 раза выше, чем в контроле, тогда как на перлите различие составляло 1,4 раза.



**Рис. 4.** Корневые волоски растения, инокулированного *A. brasilense* Sp245, исследованные методами световой (а) и иммунофлуоресцентной (b) микроскопии. Бактериальные клетки флуоресцируют красным цветом. Стрелками показаны бактериальная клетка и скопление бактерий в утолщении корневого волоска. Масштабная полоса соответствует 100 мкм

**Fig. 4.** Root hairs of an *A. brasilense* Sp245-inoculated plant investigated by light (a) and immunofluorescent microscopy (b). Bacterial cells fluoresce red. Arrows indicate a bacterial cell and accumulation of bacterial cells in a root hair thickening. Scale strip corresponds to 100  $\mu$ m

**Приживаемость опытных (инокулированных бактериями) и контрольных (неинокулированных) растений-регенерантов *S. cretacea* на нестерильных субстратах различного состава**

**Survival of experimental (bacteria-inoculated) and control (non-inoculated) *S. cretacea* explants on various unsterile substrates**

Концентрация бактериального инокулята в питательной среде, кл/мл	Доля жизнеспособных растений, %			
	Нейтрализованный торфяной грунт (НТГ)	НТГ-перлит (1:1)	НТГ-перлит (1:2)	Перлит
0 (контроль)	18,2 ± 5,7	36,3 ± 7,1	45,4 ± 7,3	63,6 ± 7,1
10 <sup>5</sup>	36,4 ± 7,1	54,5 ± 7,3	63,6 ± 7,1	81,8 ± 5,7
10 <sup>6</sup>	36,6 ± 7,1	54,7 ± 7,3	63,8 ± 7,1	82,0 ± 5,6
10 <sup>7</sup>	45,5 ± 7,3	63,6 ± 7,1	72,7 ± 6,5	90,9 ± 4,2

*Примечание:* Общее число растений в эксперименте 180. Доверительный интервал рассчитан по формулам работы [16] при  $P=0.05$ .  
*Footnote:* Total number of plants was 180. Confidence interval was calculated by formulae in [16]  $P=0.05$ .

Существуют многочисленные публикации о том, что ризобактерии *A. brasilense* Sp245 усиливают развитие корневой системы, апикальную деятельность побегов и функциональную активность корневых меристем инокулированных растений [11–13, 20, 22]. Опубликованы также данные об аналогичном эффекте ризобактерий (*Rhizobium leguminosarum*) при ассоциативном симбиозе с растением [23].

Кроме обеспечения азотом и регуляторами роста *A. brasilense* способны влиять на особенности анатомического и морфологического строения растений, что также может способствовать их лучшей адаптации *ex vitro* [20]. Это и наблюдалось в нашем эксперименте при изучении свойств эксплантов смолевки меловой.

Таким образом, в проделанной работе удалось оптимизировать этапы укоренения и адаптации *ex vitro* культуры *S. cretacea*. Инокуляция бактериями *A. brasilense* Sp245 на этапе укоренения растений позволила получить более 90% адаптированных растений-регенерантов без химической или термической обработки почвенного субстрата. В совокупности с эффективным протоколом стерилизации и микроразмножения [24] инокуляция азоспириллами позволяет использовать клональное микроразмножение *in vitro* для массового получения посадочного материала *S. cretacea* с целью восстановления численности популяций или в селекционно-производственных целях при введении данного вида в культуру.

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР ИБФРМ РАН (№ государственной регистрации 01201359056) при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки России в рамках базовой части Государственного задания (№ 2014/203, код проекта 1287) в сфере научной деятельности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Devyatov A.G. Cretaceous catchfly *Silene cretacea* Fisch. Ex Spreng. In: The Red Data Book of the Russian Federation (Plants and Fungi). Moscow: Tov. Nauch. Izd. KMK, 2008, 172–173.
2. Nevski S.A., Davidenko O.N., Berezutski M.A., and Arkhipova E.A. On a find of *Silene cretacea* Fisch. Ex Spreng., Caryophyllaceae in the Saratov region. *Povolzhsk. Ekol. Zh.*, 2009, 2, 170–172.
3. Tuleuov B.I., Turdybekov K.M., Khabdolda G., et al. Structure and Stereochemistry of Phytoecdysone from *Silene cretacea* Fisch. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2014, 84(4), 625–628. doi: 10.1134/S1070363214040173
4. Mamadalieva N.Z., Zibareva L.N., Lafont R., et al. Phytoecdysteroids from the *Silene* genus. *Chem. Nat. Compd.*, 2004, 40(6), 574–578. doi: 10.1007/s10600-005-0040-z
5. Kritskaya T.A., and Kashin A.S. Use of *in vitro* culture techniques for conservation of some endangered calciphilic plant species of Saratov region. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta, Ser. Chem. Biol. Ecol.*, 2013, 13(4), 65–73.
6. Kritskaya T.A., Blyudneva E.A., and Kashin A.S. The culture medium for micropropagation of calciphilic plants in culture *in vitro*. Patent of RF, 2552174, C 12 N 5/00. 2015.

7. Zakharchenko N.S., Pigoleva S.V., Kochetkov V.V., et al. Effects of associative pseudomonads and methylbacteria on plant growth and resistance to phytopathogens and xenobiotics. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2011, 59(1), 79–87. doi: 10.1134/S1021443711060197
8. Parray J.A., Kamili A.N., Reshi Z.A., et al. Interaction of rhizobacterial strains for growth improvement of *Crocus sativus* L. under tissue culture conditions. *Plant Cell Tiss., Organ Cult.*, 2015, 121(2), 325–334. doi: 10.1007/s11240-014-0703-1
9. Pereg L., de-Bashan L.E., and Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant Soil.*, 2016, 399(1), 389–414. doi: 10.1007/s11104-015-2778-9
10. Bashan Y., and de-Bashan L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv. Agron.*, 2010, 108, 77–136. doi: 10.1016/S0065-2113(10)08002-8
11. Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., et al. Improved potato clonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum*. *Agron. Sustain. Dev.*, 2015, 35(3), 1167–1174. doi: 10.1007/s13593-015-0304-3
12. Vettori L., Russo A., Felici C., et al. Improving clonal micropropagation: effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree. *J. Plant Interact.*, 2010, 5(4), 249–259. doi: 10.1080/17429145.2010.511280
13. Russo A., Vettori L., Felici C., et al. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. *J. Biotechnol.*, 2008, 134(3–4), 312–319. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.01.020
14. Butenko R.G. Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnologies on their bases. Moscow: FBC-Press, 1999, 13–21.
15. McCown B.H., and Lloyd G. Woody plant medium (WPM) – a revised mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *Hort. Sci.*, 1981, 16, 453.
16. Dospikhov B.A. Methods of performing of field experiments (with principles of statistic processing of the results). 5<sup>th</sup> ed. Moscow: Agropromizdat, 1985, 157–166.
17. Yegorenkova I.V., Tregubova K.V., Matora L.Yu., et al. Use of ELISA with anti-xopolysaccharide antibodies to evaluate wheat-root colonization by the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa*. *Curr. Microbiol.*, 2010, 61(5), 376–380. doi: 10.1007/s00284-010-9622-5
18. Matora L.Yu., Shvartsburd B.I., and Shchegolev S.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides from the soil nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Mikrobiologiya* (Microbiology), 1998, 67(6), 815–820.
19. Ouchterlony O., and Nilsson L.A. Handbook experimental immunology. V. 1 [Ed. D.M. Weiz]. Oxford, UK: Alden Press, 1979, 19–33.
20. Llorente B.E., and Larraburu E.E. *In vitro* micropropagation of fraser photinia using *Azospirillum* mediated root development. In: Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. V. 1 [Eds. M. Lambardi, E.A. Ozudogru, S.M. Jain] New York, USA: Springer Science + Business Media, 2012, 245–258. doi: 10.1007/978-1-62703-074-8
21. Krieg N.R., and Döbereiner J. Genus *Azospirillum*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 9<sup>th</sup> edn. [Eds. J.G. Holt, N.R. Krieg] Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984, 94–104.
22. Evseeva N.V., Matora L.Y., Burygin G.L., et al. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells. *Plant Soil.*, 2011, 346(1), 181–188. doi: 10.1007/s11104-011-0808-9
23. Vershinina Z.F., Blagova D.K., Nigmatullina L.R., et al. Associative Symbiosis between *Rhizobia* and Transgenic Tomatoes Increases Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biotechnologiya*, 2015, (3), 42–53.
24. Kritskaya T.A., Kashin A.S., Spivak V.A., and Firstov V.E. Features of clonal micropropagation of *Silene cretacea* (Caryophyllaceae) in *in vitro* culture. *Russ. J. Dev. Biol.*, 2016, 47(6), 359–366. doi: 10.1134/S1062360416060023

## Use of *Azospirillum brasilense* Sp245 to Increase the Efficacy of Clonal Micropropagation of Cretaceous Catchfly (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng)

T.A. KRITSKAYA<sup>1,\*</sup>, N.V. EVSEEVA<sup>2,\*\*</sup>, G.L. BURYGIN<sup>2</sup>, A.S. KASHIN<sup>1</sup>, S.Yu. SHCHYOGOLEV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The Chernyshevskii Saratov National State Research University, 410012, Saratov Russia

<sup>2</sup>The Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russ. Acad. Sci. (IBPPM), 410049, Saratov Russia

\*e-mail: kritckaiata@gmail.com, \*\*e-mail: evseeva\_n@ibppm.ru

Received October 28, 2016

Accepted November 01, 2016

**Abstract** – The article is the first to report the use of inoculation of a calcicole plant species, *Silene cretacea* Fisch. ex Spreng, by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 to optimize the plant clonal micropropagation. Using enzyme immunoassay, fluorescence microscopy, and bacteriological plating, we confirmed the colonization by the bacteria of explant roots *in vitro* and detected the attendant morphological colonization traits. We found out that the inoculation of the plant with the growth-promoting rhizobacterium *A. brasilense* Sp245 at the stage of culturing *in vitro* has a large positive effect on the adaptation of regenerated plants *ex vitro* (survival rate was enhanced up to more than 90%), thereby increasing the efficacy of the entire process of *S. cretacea* clonal micropropagation.

**Key words:** acclimatization *ex vitro*, *Azospirillum brasilense* Sp245, Caryophyllaceae, clonal micropropagation, *Silene cretacea*.

**Acknowledgements** – This work was performed as a part of the planned topics of the IBPPM RAS (State Registration Code 01201359056) and it was partly financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of the basic part of the Government Commission in the Field of Research, Project no. 2014/203 and Project Code 1287.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-1-72-79