



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ВЛИЯНИЕ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ НА МИКРОКЛОНЫ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Евсеева Н.В.¹, Ткаченко О.В.², Денисова А.Ю.², Бурьгин Г.Л.^{1,2}, Матора Л.Ю.¹, Щеголев С.Ю.¹

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
410049, Саратов, просп. Энтузиастов 13, email: evseeva_n@ibppm.ru

²Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова,
410012, г. Саратов, Театральная пл., 1

Резюме

Исследовано влияние ростстимулирующих ассоциативных ризобактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 на физиолого-морфологические параметры микроклонов картофеля сорта Невский при осмотическом стрессе в культуре *in vitro*, создаваемом путем добавления к питательной среде для культивирования растений полиэтиленгликоля. Установлено, что инокуляция растений бактериями стимулировала рост растений в условиях *in vitro* и репарационные процессы в модельных условиях осмотического стресса, а также способствовала более быстрому снижению содержания пролина в листьях при постстрессовой репарации. Повышение адаптационного потенциала растений в целенаправленно создаваемых растительно-микробных ассоциациях представляется перспективным с точки зрения общих подходов к экологически чистому земледелию.

Ключевые слова: культура клеток и тканей растений *in vitro*; картофель; *Azospirillum brasilense* Sp245; *Ochrobactrum cytisi*; осмотический стресс

Цитирование: Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Денисова А.Ю., Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Влияние ростстимулирующих ризобактерий на микроклоны картофеля при осмотическом стрессе в условиях *in vitro*. *Биомика*. 2018. Т.10(2). С. 206-209. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-29

EFFECTS OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA ON OSMOTICALLY STRESSED POTATO MICROCLONES *IN VITRO*

Evseeva N.V.¹, Tkachenko O.V.², Denisova A. Yu.², Burygin G.L.^{1,2}, Matora L.Yu.¹, Shchyogolev S.Yu.¹

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
13 Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russia. Email: evseeva_n@ibppm.ru

²Vavilov Saratov State Agrarian University, 410012, Theatre square, 1. Saratov, Russia

Resume

Effects of plant growth promoting rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 on physiological and morphological characteristics of osmotically stressed potato microclones of Nevsky cultivar *in vitro* were studied. The stress was produced by means of introducing polyethyleneglycol to nutrient solution for plant growth. It was found that bacterial inoculation of plants under the model stress conditions *in vitro* promoted plant growth and reparation, and facilitated more rapid decrease of prolin content in plant leaves during the post-stress reparation as well. Increased adaptation capacities of plants in purposefully created plant-microbe associations may be promising in the context of general approaches to nonpolluting agriculture.

Key words: plant cells and tissue culture *in vitro*; potato; *Azospirillum brasilense* Sp245; *Ochrobactrum cytisi*; osmotic stress

Citation: Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Denisova A. Yu., Burygin G.L., Matora L.Yu., Shchyogolev S.Yu. Effects of plant growth promoting Rhizobacteria on osmotically stressed potato microclones *in vitro*. *Biomcs*. 2018. V.10(2). P. 206-209. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-29 [In Russian]

Введение

Стимулирующие рост растений ризобактерии (plant growth promoting rhizobacteria – PGPR) играют важную роль в жизнедеятельности растения-хозяина. Известно, что PGPR снабжают растения дополнительно минеральными и органическими питательными веществами, фитогормонами, доступным азотом, участвуют в конкурентном биорегулировании микробных ассоциаций в почве, а также индуцируют системную устойчивость растения к абиотическим и биотическим факторам внешней среды [Bashan et al, 2014; Maksimov et al, 2011; Tkachenko et al, 2015]. Предполагаемые механизмы, используемые PGPR для защиты растения от стрессоров, включают продукцию различных фитогормонов, АЦК-деаминазу, экзополисахариды. Бактерии также влияют на содержание пролина в растениях, как одного из компонентов клеточных защитных систем [Кузнецов, Шевякова 1999; Aghaee et al., 2011].

Цель нашей работы заключалась в оценке влияния бактеризации в культуре *in vitro* на физиолого-морфологические параметры и содержание пролина в микроклонах картофеля сорта Невский при осмотическом стрессе.

Материалы и методы

Исследования проводили на сорте картофеля Невский из пересадочной коллекции кафедры Растениеводство, селекция и генетика агрономического факультета ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». В качестве инокулянтов использовали модельный штамм *Azospirillum brasilense* Sp245 и природный изолят из ризосферы картофеля *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Осмотический стресс создавали путем добавления к питательной среде полиэтиленгликоля (ПЭГ, М.м. 6000) в концентрации 25 г/л. Для изучения влияния на растения бактерий и водного дефицита закладывалось 4 варианта опыта: контроль без добавления бактерий и ПЭГ (K1); вариант с

бактериями без ПЭГ (K2); вариант без бактерий с ПЭГ (K3). Опытный вариант содержал бактерии и ПЭГ (O).

На 10-е сутки культивирования растений в стандартной среде Мурасиге и Скуга [Murashige, Skoog, 1962] в пробирки добавляли суспензии бактерий выращенных до конца экспоненциальной фазы на малатно-солевой среде (Döbereiner J., Day J.M., 1976), в концентрации 10^6 кл/мл. Через 3 суток проводили замену питательной среды на среду аналогичного состава, но с содержанием ПЭГ. Действие стресса продолжалось 7 суток, после чего питательную среду с ПЭГ вновь заменяли на стандартную. Через 7 суток после снятия стрессора оценивали эффективность репарации. Состояние растений характеризовали морфо-физиологические параметры: длина побега, количество узлов на побеге, количество корней, средняя длина корня, сырая масса листьев, корней и побегов. Проллин определяли колориметрическим методом по стандартной методике [Bates et al., 1973]. Статистическую обработку результатов проводили методом дисперсионного анализа (ANOVA) с вычислением наименьшей существенной разницы (НСР) и проведением множественных сравнений по тесту Дункана при уровне значимости 95% ($P \leq 0,05$). Значения критерия Фишера, отвечающие данному условию достоверности, отмечены в итоговых таблицах звездочками. Различия приведенных в них значений считаются существенными, если в сопутствующих им буквенных обозначениях присутствуют только разные символы английского алфавита.

Результаты и обсуждение

Установлено, что азоспириллы в отсутствие ПЭГ положительно влияли на количество корней и сырую массу стебля по сравнению с неинокулированными растениями. В отличие от этого штамм *O. cytisi* IPA7.2 в данных условиях не проявлял заметного ростстимулирующего действия (табл. 1).

Table 1.

Influence of bacterization on potato microclones under osmotic stress (2.5% PEG, duration 7 days) in culture *in vitro*

Treatment		Shoot length, mm	Stem weight, mg	Leaf weight, mg	Root weight, mg	Proline content, $\mu\text{mol/g}$ wet weight
Designation	Presence (+/-) of bacteria or PEG					
K 1	– bact. – PEG	59,7bc	119bc	115bc	97cd	1,35a
K 2	+ bact. Sp245 – PEG	65,4c	153d	129c	112d	1,24a
	+ bact. IPA7.2 – PEG	57,9b	121bc	99bc	77,3bc	1,44a
K 3	– bact. + PEG	46,1a	85a	43,7a	37,7a	27,6d
O	+ bact. Sp245 + PEG	59,6bc	102ab	85,3b	33a	14,2bc
	+ bact. IPA7.2 + PEG	64bc	136cd	119c	87cd	17,6cd
F _{fact.}		11,6*	8,44*	10,7*	10,6*	10,4*
LSD _{0,05}		6,33	26,2	30,1	31	10,3

Table 2.

Influence of bacterization on potato microclones on the 7th day of repair after osmotic stress in culture *in vitro*

Treatment		Shoot length, mm	Stem weight, mg	Leaf weight, mg	Root weight, mg	Proline content, $\mu\text{mol/g}$ wet weight
Designation	Presence (+/-) of bacteria or PEG					
K 1	– bact. – PEG	68,7b	133b	117bc	165d	3,79a
K 2	+ bact. Sp245 – PEG	89,2de	206d	163d	221e	3,27a
	+ bact. IPA7.2 – ПЭГ	90,8e	200d	145cd	160cd	3,41a
K 3	– bact. + PEG	48,5a	113ab	78a	29,3a	30,4cd
O	+ bact. Sp245 + PEG	56,1a	106a	68a	73,7b	31,4d
	+ bact. IPA7.2 + PEG	80cd	184cd	168d	97b	18,5b
F _{fact.}		30,1*	40,8*	23,4*	36,9*	41,6*
LSD _{0,05}		10,0	22,1	27,8	36,3	6,32

ПЭГ оказывал ингибирующее влияние на рост растений, особенно корневой системы. В условиях осмотического стресса наблюдалось резкое увеличение содержания пролина только в листьях. Инокуляция микрорастений бактериями частично способствовала ослаблению действия ПЭГ, что проявлялось в увеличении массы листьев, стеблей и корней при инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 и в увеличении только массы листьев при инокуляции растений азоспирамилами по сравнению с контрольными вариантами при стрессе. Уровень пролина оставался высоким в течение 7 суток после снятия действия стрессового фактора. Однако бактериализация способствовала более быстрому снижению уровня пролина при репарации, что коррелировало с ростом побегов и, соответственно, увеличением массы листьев, стеблей и корней по сравнению с контрольными вариантами (табл. 2).

Следует заметить, что бактерии *O. cytisi* IPA7.2 сильнее проявляли ростстимулирующее действие на растения при репарации по сравнению с азоспириллами. Вероятно, штамм *A. brasilense* Sp245 не выдерживал длительного стресса, что приводило к частичной потере его функций. Таким образом, инокуляция растений бактериями стимулировала рост растений в условиях *in vitro* и репарационные процессы в модельных условиях осмотического стресса. Повышение адаптационного потенциала растений в целенаправленно создаваемых растительно-микробных ассоциациях представляется перспективным с точки зрения общих подходов к экологически чистому земледелию с уменьшением количества используемых пестицидов и удобрений.

References

1. Kuznetsov V.I., Shevyakova N.I. Proline under stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russ. J. Plant Physiol.* 1999. V. 46. P. 274-288.
2. Aghaee A., Moradi F., Zare-Maivan H., Zarinkamar F., Irandoost H.P., Sharifi P. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. *Afr. J. Biotechnol.* 2011. V. 10(39). P. 7617-7621. doi: 10.5897/AJB11.069
3. Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil.* 2014. V. 378. P. 1-33. doi: 10.1007/s11104-013-1956-x
4. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies *Plant Soil.* 1973. V. 39 (1). P. 205-207. doi: 10.1007/BF00018060
5. Döbereiner J., Day J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Newton W.E., Nyman C.J. (eds) *Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation*. Washington State University Press, WA, 1976. P. 518-538.
6. Maksimov I.V., Abizgil'dina R.R., Pusenkova L.I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2011. V. 47(4). P. 333-345. doi: 10.1134/S0003683811040090
7. Murashige T., Skoog G. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 1962. V. 15. P. 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
8. Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Yu.V., Shchyogolev S.Yu. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum*. *Agron. Sustain. Develop.* 2015. V. 35. P. 1167-1174. doi: 10.1007/s13593-015-0304-3