BIOMICS/БИОМИКА

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КАЛЛУСОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Бурыгин Г.Л., Костина Е.Е., Каргаполова К.Ю., Лобачев Ю.В., Ткаченко О.В.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова», Саратов, Россия. E-mail: burygingl@gmail.com

Резюме

Культура тканей *in vitro* активно используется в современной селекции растений для генетической трансформации, эффективного отбора, быстрого получения и размножения генетически однородных линий. Для многих культур низкий выход растений-регенерантов является лимитирующим для использования каллусов в селекционном процессе. Некоторые бактериальные липополисахариды способны увеличивать морфогенетическую активность каллусов растений, повышая эффективность технологии *in vitro*. В данной работе было исследовано влияние липополисахаридов (ЛПС) ризобактерий *Ensifer adhaerens* T1Ks14, *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02 и *Pseudomonas chlororaphis* K3 на процессы каллусогенеза, формирования морфогенных каллусов и растений-регенерантов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) низкоморфогенной линии с геном короткостебельности *Rht-B1a*, полученной на основе сорта Саратовская 29. Установлено, что препараты ЛПС в концентрации 10 мкг/мл по-разному действовали на культуру тканей пшеницы. Выход каллусов из эксплантов, полученных из незрелых зародышей, достоверно увеличивался на 2,5% при действии ЛПС штамма *O. quorumnocens* T1Kr02 и уменьшался на 4% в варианте с ЛПС *P. chlororaphis* K3. Выход морфогенных каллусов увеличивался при действии ЛПС *E. adhaerens* T1Ks14 (+ 57%) и *P. chlororaphis* K3 (+41%). ЛПС штамма *O. quorumnocens* T1Kr02 оказывал негативный эффект на выход растений-регенерантов, в то время как два других препарата ЛПС по этому показателю не отличались от контроля. В результате, эффективность применения препарата ЛПС от эксплантов до регенерантов была достоверно выше только в варианте штамма E. adhaerens T1Ks14 (+64%). Полученные данные свидетельствуют о существенных отличиях в реакции культур тканей растений в отношении ЛПС различных ризосферных бактерий.

Ключевые слова: культура тканей растений, каллусы, морфогенез, *Triticum aestivum* L., липополисахарид, ризосферные бактерии

Цитирование: Бурыгин Г.Л., Костина Е.Е., Каргаполова К.Ю., Лобачев Ю.В., Ткаченко О.В. Влияние липополисахаридов грамотрицательных бактерий различных таксономических групп на морфогенетическую активность каллусов мягкой пшеницы // Biomics. 2024. Т.16(1). С. 13-17. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-2

EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM VARIOUS TAXONOMIC GROUPS ON THE MORPHOGENETIC ACTIVITY OF COMMON WHEAT CALLUSES

Burygin G.L., Kostina E.E., Kargapolova K.Yu., Lobachev Yu.V., Tkachenko O.V.

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia. E-mail: burygingl@gmail.com

Resume

In vitro tissue culture is actively used in modern plant breeding for genetic transformation, effective selection, rapid production and propagation of genetically homogeneous lines. For many crops, the low

yield of regenerated plants is limiting for the use of calluses in the breeding process. Some bacterial lipopolysaccharides are able to increase the morphogenetic activity of plant calluses, increasing the efficiency of in vitro technology. In this work, we investigated the effect of lipopolysaccharides (LPS) from the rhizobacterial strains Ensifer adhaerens T1Ks14, Ochrobactrum quorumnocens T1Kr02, and Pseudomonas chlororaphis K3 on the processes of callusogenesis, the formation of morphogenic calluses and regenerant plants of common wheat (*Triticum aestivum* L.) of a low-morphogenic line with the Rht-B1a dwarfing gene, obtained on the basis of the cultivar Saratovskaya 29. It was found that LPS preparations at a concentration of 10 μg/ml had different effects on wheat tissue cultures. The yield of calluses from explants obtained from immature embryos significantly increased by 2.5% when exposed to LPS of the O. quorumnocens strain T1Kr02 and decreased by 4% in the variant with LPS from P. chlororaphis K3. The yield of morphogenic calluses increased under the influence of LPS from E. adhaerens T1Ks14 (+57%) and P. chlororaphis K3 (+41%). LPS strain O. quorumnocens T1Kr02 had a negative effect on the yield of regenerated plants, while the other two LPS preparations did not differ from the control in this parameter. As a result, the effectiveness of using the LPS preparations from explants to regenerants was significantly higher only in the variant of the E. adhaerens strain T1Ks14 (+64%). The data obtained indicate significant differences in the response of plant tissue cultures to LPS of various rhizosphere bacteria.

Key words: plant tissue culture, callus, morphogenesis, *Triticum aestivum* L., lipopolysaccharide, rhizosphere bacteria

Citation: Burygin G.L., Kostina E.E., Kargapolova K.Yu., Lobachev Yu.V., Tkachenko O.V. Effect of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria from various taxonomic groups on the morphogenetic activity of common wheat calluses. *Biomics*. 2024. V.16(1). P.13-17. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-2

Введение

Культура клеток и тканей растений *in vitro* является основой целого ряда практических технологий производства вторичных метаболитов [El Meskaoui, 2013], микроразмножения [Kumar, Redd, 2011] и селекции растений, в том числе на основе клеточной селекции сомаклонов [Бишимбаева, 2012], гаплоидии [Dunwell, 2010] и создания трансгенных растений со специфическими агрономическими признаками [Loyola-Vargas, Ochoa-Alejo 2018]. Однако, для многих культур выход растений-регенерантов является очень низким, что ограничивает широкое применение агробиотехнологии культуры каллусов в селекционном процессе. В частности, с такой проблемой сталкивается селекция мягкой пшеницы [Yadav et al., 2020]. Для эффективного морфогенеза в тканях экспланта компетентные клетки должны получить специфические индицирующие сигналы [Zhao et al., 2008]. Чаще всего в качестве таких сигналов используют физические и химические воздействия на культуру ткани. При этом, использование ризосферных бактерий, которые активно применяются в качестве стимуляторов роста вегетативно размножаемых растений, в культуре *in vitro* затруднительно или невозможно из-за развития контаминации и конкуренции бактерий с растительным эксплантом за питательные вещества. В связи с этим, перспективным является использование в биотехнологии *in vitro* бактериальных метаболитов, обладающих рост-стимулирующей активностью в отношении растений. Так, для некоторых липополисахаридов (ЛПС), являющихся мажорными компонентами клеточных стенок грамотрицательных бактерий, была показана способность повышать морфогенетическую активность каллусов растений, значительно увеличивая выход растений-регенерантов [Evseeva et al., 2018]. Позднее, для ЛПС трёх штаммов *Azospirillum* spp., принадлежащих к разным серотипам, были показаны различия в эффектах, оказываемых на каллусогенез, морфогенную активность и выход растений-регенерантов [Tkachenko et al., 2021].

ЛПС других ризосферных бактерий не были ранее изучены в отношении влияния на морфогенную активность культуры ткани пшеницы. В данной работе мы провели исследования действия на развитие *in vitro* каллусов и регенерантов препаратов ЛПС трёх бактериальных штаммов, принадлежащих к родам *Ensifer*, *Ochrobactrum* и *Pseudomonas*, выделенных нами ранее из ризосферы картофеля и кукурузы, для которых была показана рост-стимулирующая активность в отношении растений *in vivo*.

Материалы и методы

Растения мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) низкоморфогенной линии с геном короткостебельности *Rht-B1a*, полученной на основе сорта Саратовская 29, выращивались в полевых условиях. Через две недели после цветения колосья срезали и выделяли незрелые зерновки в молочной

стадии созревания. Стерилизацию зерновок проводили раствором коммерческого препарата Белизна, содержащего гипохлорит натрия, и воды в концентрации 1:1 в течение 10 минут при постоянном помешивании, затем промывали стерильной автоклавированной водой 4 раза. В условиях ламинар-бокса из зерновок вычленяли незрелые зародыши и помещали в чашки Петри щитком вверх на питательную среду Линсмайера-Скуга [Linsmaier, Skoog, 1965], содержащую 50 мл/л маточного раствора макросолей (KNO_3 38 г/л, NH_4NO_3 33 г/л, KH_2PO_4 3,4 г/л, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 7,4 г/л, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 8,8 г/л); 1 мл/л маточного раствора микросолей ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ 250 мг/л, $CuSO_4 \times 5H_2O$ 25 мг/л, H_3BO_3 6,2 г/л, $MnSO_4 \times 5H_2O$ 24 мг/л, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ 8,6 мг/л, KI 830 мкг/л, $CoCl_2 \times 6H_2O$ 25 мг/л); 5 мл/л хелата железа ($FeSO_4$ 5,57 г/л, Трилон Б 7,45 г/л); 30 г/л сахарозы и 7 г/л агар-агара. В питательную среду также добавляли аспарагиновую кислоту 100 мг/л, инозит 100 мг/л, витамин B1 (тиамин) 0,4 мг/л и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4Д) 2 мг/л. Показатель pH питательной среды до автоклавирования доводили до значения 5,8. Автоклавирование проводили при 0,8 атм. в течение 30 минут.

В работе были исследованы препараты ЛПС ризосферных штаммов *Ensifer adhaerens* T1Ks14, *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02 и *Pseudomonas chlororaphis* K3, выделенные нами ранее из корней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Кондор и кукурузы (*Zea mays* ssp. *mays* L.), собранных с сельскохозяйственных полей Саратовской области (Россия). Указанные штаммы в лабораторных опытах *in vitro* были описаны как стимулирующие рост растений картофеля и пшеницы. Для проведения экспериментов препараты ЛПС вносили в среду Линсмайера-Скуга до конечной концентрации 10 мкг/мл до автоклавирования. Концентрация ЛПС была выбрана по литературным данным, как оптимальная для проявления биологической активности в отношении растений [Tkachenko et al., 2021].

Каллусы культивировали в темноте при температуре 24°C и влажности воздуха 75%. Через 30 суток культивирования подсчитывали количество каллусов и количество морфогенных каллусов. Показатели каллусогенеза и морфогенной активности выражали в процентах от эксплантов. В качестве контроля использовали чашки Петри с эксплантами, культивируемыми на среде без добавления препаратов ЛПС. Достоверность различий между вариантами оценивали с использованием формул для двояковозможной изменчивости [Evseeva et al., 2018].

Каллусы, имеющие морфогенные очаги, пересаживали в пробирки со средой Линсмайера-Скуга без 2,4Д, но с индолил-3-уксусной кислотой и кинетином по 0,5 мг/л и культивировали в течение 30 суток при освещении 1400 люкс с продолжительностью дня/ночи в 16/8 часов, после чего производили подсчет количества растений-регенерантов. Этапы развития растений-регенерантов из эксплантов, полученных из незрелых зародышей пшеницы, представлены на рисунке 1.

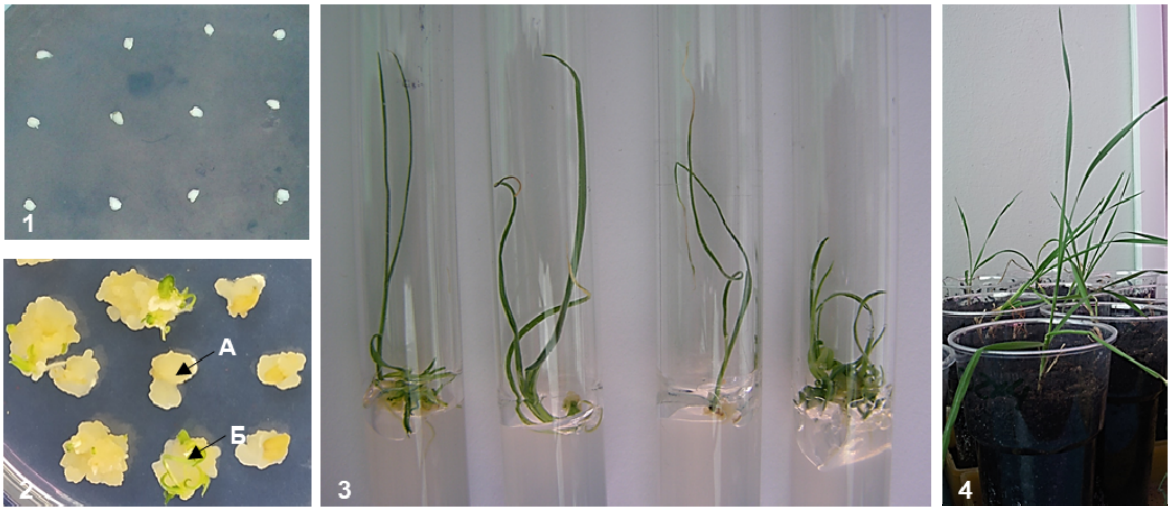

Рисунок 1. Этапы культивирования соматических тканей пшеницы: 1 – вычленение незрелых 14-суточных зародышей и высадка на питательную среду для каллусогенеза; 2 – каллус на 30 сутки культивирования неморфогенный (А) и морфогенный (Б); 3 – регенерация растений из очагов морфогенеза; 4 – растения-регенеранты, высаженные с почву.

Figure 1. Cultivation stages of common wheat somatic tissue: 1 – isolation of immature 14-day embryos and planting on nutrient medium for callusogenesis; 2 – calluses on the 30th day of cultivation, non-morphogenic (A) and morphogenic (B) calluses; 3 – the regeneration of plants from foci of morphogenesis; 4 – regenerated plants planted from the soil.

Результаты и их обсуждение

Анализ результатов подсчёта количества каллусов показал, что препараты ЛПС трёх ризосферных штаммов по-разному действовали на культуру тканей пшеницы (Таблица 1). Выход каллусов из эксплантов, полученных из незрелых зародышей, достоверно увеличивался на 2,5% при действии ЛПС штамма *O. quorumnocens* T1Kr02 и уменьшался на 4% в варианте с ЛПС *P. chlororaphis* K3. В то время как ЛПС *E. adhaerens* T1Ks14 достоверного влияние на каллусогенез не оказывал. При этом следует отметить, что значения выхода каллусов из эксплантов во всех вариантах было высоким – более 90 %.

Выход морфогенных каллусов увеличивался при действии ЛПС штаммов *E. adhaerens* T1Ks14 (+57%) и *P. chlororaphis* K3 (+41%). При этом, значения выходов для ЛПС обоих штаммов были сопоставимы со значениями, которые ранее нами были описаны для наиболее активных ЛПС штаммов *Azospirillum baldaniorum* Sp245 [Evseeva et al., 2018] и *Azospirillum lipoferum* SR65 [Tkachenko et al., 2021].

Таблица 1.

Влияние бактериальных ЛПС (10 мкг/мл) на морфогенетическую активность каллусов и выход растений-регенерантов мягкой пшеницы

Вариант	Выход каллусов от эксплантов, %	Выход морфогенных каллусов от всех каллусов, %	Выход регенерантов, %	
			от морфогенных каллусов	от каллусов
Контроль	96,8±1,89	17,2±4,7	44,2±12,3	7,6±4,1
ЛПС T1Ks14	95,5±2,89	27,0±7,1*	46,3±15,7	12,5±4,2*
ЛПС T1Kr02	99,29±1,41*	21,2±6,8	28,6±13,6*	6,1±2,4
ЛПС K3	92,5±4,12*	24,3±5,0*	41,7±11,7	10,1±4,9

Примечание: * показывает достоверность различий опытного варианта с контрольным при уровне достоверности 95% ($p \leq 0,05$).

Table 1. Effect of bacterial LPS (10 μg/ml) on the morphogenetic activity of calluses and the yield of regenerated plants of common wheat

Variants	Yield of calluses from explants, %	Yield of morphogenetic calluses from all calluses, %	Yield of regenerated plants, %	
			from morphogenetic calluses	from calluses
Control	96,8±1,89	17,2±4,7	44,2±12,3	7,6±4,1
LPS T1Ks14	95,5±2,89	27,0±7,1*	46,3±15,7	12,5±4,2*
LPS T1Kr02	99,29±1,41*	21,2±6,8	28,6±13,6*	6,1±2,4
LPS K3	92,5±4,12*	24,3±5,0*	41,7±11,7	10,1±4,9

Note: * shows the significance of the differences between the experimental variant and the control at a confidence level of 95% ($p \leq 0.05$).

После переноса каллусов с морфогенными очагами на питательную среду для регенерации, не содержащую ЛПС, развитие растений-регенерантов во всех вариантах было примерно одинаковым – выход составлял 40-45% от числа морфогенных каллусов. Исключение составляли каллусы, пересаженные со среды, содержащей на первом этапе культивирования ЛПС штамма *O. quorumnocens* T1Kr02. Такие каллусы образовывали на 35% меньше регенерантов, чем контрольные каллусы. В целом же, при подсчёте выхода регенерантов на 100 исходных эксплантов было выявлено, что эффективность применения препаратов ЛПС на стадии формирования морфогенных каллусов была достоверно выше только в варианте штамма *E. adhaerens* T1Ks14 (+64%). Полученные данные свидетельствуют о существенных отличиях в реакции культуры тканей растений в отношении ЛПС различных ризосферных бактерий.

По предварительным данным в составе ЛПС штамма *E. adhaerens* T1Ks14 большую массовую долю составляют остатки уроновых кислот, в отличие от ЛПС *O. quorumnocens* T1Kr02 и *P. chlororaphis* K3, содержащих остатки фукозы (6-дезоксисахар) и аминосахаров соответственно. Таким образом, одной из причин разного действия бактериальных ЛПС на культуру тканей пшеницы могут быть существенные различия в моносахаридном составе и физико-химических свойствах гликанов.

Сравнение полученных в данной работе результатов с ранее описанными данными для ЛПС бактерий рода *Azospirillum* [Evseeva et al., 2018; Tkachenko et al., 2021] показывает, что исследованные

ЛПС штаммов *E. adhaerens* T1Ks14, *O. quorumnocens* T1Kr02 и *P. chlororaphis* K3 уступают ЛПС штаммов *Azospirillum baldanoirum* Sp245 и *Azospirillum lipoferum* SR65 в способности повышать выход растений-регенерантов. В то же время они обладают биологической активностью на уровне ЛПС штаммов *Azospirillum brasilense* SR55 и SR75 и могут быть использованы для повышения эффективности отдельных стадий получения растений-регенерантов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-26-00293, https://rscf.ru/en/project/22-26-00293

Литература

1. Бишимбаева Н.К. Сомаклональная вариабельность как источник получения новых форм пшеницы с ценными признаками // Вестник КазНУ. Серия биологическая. 2012. Т. 55(3). С. 41-46.
2. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8(4). P. 377-424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
3. El Meskaoui A. Plant cell tissue and organ culture biotechnology and its application in medicinal and aromatic plants // Med. Aromat. Plants. 2013. V. 2. P. e147. doi: 10.4172/2167-0412.1000e147
4. Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Matora L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses // World J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 34(3). P. 1-6. doi: 10.1007/s11274-017-2386-3
5. Kumar N., Redd M.P. In vitro plant propagation: a review // J. For. Environ. Sci. 2011. V. 27. P. 61-72. doi: 10.7747/JFS.2011.27.2.1
6. Linsmaier E.M., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1965. V. 18(1). P. 100-127. doi: 10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x
7. Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. Plant cell culture protocols. NY: Springer. 2018. 507 p. doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4
8. Tkachenko O.V., Burygin G.L., Evseeva N.V., Fedonenko Y.P., Matora L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Morphogenesis of wheat calluses treated with *Azospirillum* lipopolysaccharides // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2021. V. 147(1). P. 147-155. doi: 10.1007/s11240-021-02114-2
9. Yadav H., Malik K., Kumar S., Jaiwal P.K. Comparative regeneration in six bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties from immature and mature scutella for developing efficient and genotype-independent protocol prerequisite for genetic improvement of wheat // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2020. V. 56. P. 610-617. doi: 10.1007/s11627-020-10070-3
10. Zhao X.Y., Su Y.H., Cheng Z.J., Zhang X.S. Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis // J. Integr. Plant Biol. 2008. V. 50(7). P. 816–824. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00701.x

References

1. Bishimbaeva N.K. Somaclonal variability as a source of generating new forms of wheat valuable signs. *KazNU Bulletin. Biology series.* 2012. V. 55(3). P. 41-46.
2. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8(4). P. 377-424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
3. El Meskaoui A. Plant cell tissue and organ culture biotechnology and its application in medicinal and aromatic plants. *Med. Aromat. Plants*. 2013. V. 2. P. e147. doi: 10.4172/2167-0412.1000e147
4. Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Matora L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2018. V. 34(3). P. 1-6. doi: 10.1007/s11274-017-2386-3
5. Kumar N., Redd M.P. In vitro plant propagation: a review. *J. For. Environ. Sci.* 2011. V. 27. P. 61-72. doi: 10.7747/JFS.2011.27.2.1
6. Linsmaier E.M., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1965. V. 18(1). P. 100-127. doi: 10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x
7. Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. Plant cell culture protocols. NY: Springer. 2018. 507 p. doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4
8. Tkachenko O.V., Burygin G.L., Evseeva N.V., Fedonenko Y.P., Matora L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Morphogenesis of wheat calluses treated with *Azospirillum* lipopolysaccharides. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2021. V. 147(1). P. 147-155. doi: 10.1007/s11240-021-02114-2
9. Yadav H., Malik K., Kumar S., Jaiwal P.K. Comparative regeneration in six bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties from immature and mature scutella for developing efficient and genotype-independent protocol prerequisite for genetic improvement of wheat. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2020. V. 56. P. 610-617. doi: 10.1007/s11627-020-10070-3
10. Zhao X.Y., Su Y.H., Cheng Z.J., Zhang X.S. Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *J. Integr. Plant Biol.* 2008. V. 50(7). P. 816–824. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00701.x