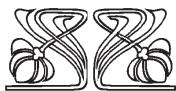
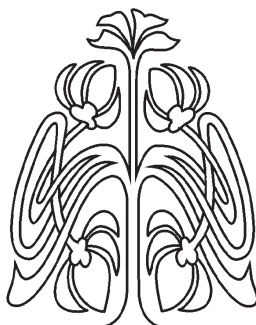
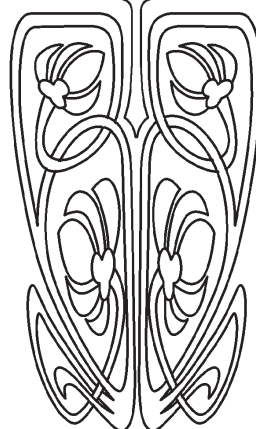




БИОЛОГИЯ



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



УДК 58.006 + 58.084.1

СОХРАНЕНИЕ ВИДОВ И СОРТОВ РАСТЕНИЙ В КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* БОТАНИЧЕСКОГО САДА САРАТОВСКОГО ГОСУНИВЕРСИТЕТА

Е. А. Блюднева, Т. А. Крицкая, А. С. Кашин, И. М. Кириллова

Учебно-научный центр «Ботанический сад» Саратовского государственного университета
E-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru, kashinas2@yandex.ru

В ботаническом саду СГУ создана коллекция *in vitro* экономически важных многолетних культур, а также ведется активная деятельность по созданию коллекции редких и исчезающих видов растений Саратовской области. В настоящее время коллекционный фонд *in vitro* насчитывает 107 образцов 60 видов 48 родов, принадлежащих к 26 семействам покрытосеменных растений, из которых 26 видов 21 рода 14 семейств являются охраняемыми видами Саратовской области.

Ключевые слова: коллекция *in vitro*, сохранение биоразнообразия, клональное микро-размножение, ботанический сад.

Conservation of Plant Species and Cultivars in Botanical Garden Saratov State University *in vitro* Collection

Е. А. Bliudneva, Т. А. Kritckaia, А. S. Kashin, I. M. Kirillova

In vitro collection of economically-valued long-standing cultures was established in Botanical Garden of Saratov State University. The work is carried out to compose the rare plants collection. At present time the *in vitro* collection includes 107 cultivars of 60 species of 48 genera which belong to 26 families of Angiosperms. 26 species of 21 genera of 14 families among these plants are endangered in Saratov Region.

Key words: *in vitro* collection, genetic resources, conservation of biodiversity, clonal micropropagation, botanical garden.

Сохранение биологического разнообразия является одной из важнейших задач ботанических садов. Вся деятельность по сохранению видов и сортов растений базируется на ряде программных документов, таких как «Конвенция о биологическом разнообразии» (1995, 2006), «Международная программа ботанических садов по охране растений» (2000), «Global Strategy Plant Conservation» (2002) и других.

Одним из наиболее эффективных способов сохранения биоразнообразия растительного мира является создание генетического банка *in vitro*, в котором все образцы хранятся при пониженной температуре в условиях замедленного роста. Независимость от климатических условий, возможность использования минимального количества эксплантов для получения асептической культуры без нарушения природных популяций, экономия площадей и трудовых затрат – главные преимущества системы *in vitro* по сравнению с традиционными методами вегетативного размножения растений [1]. Современные методы биотехнологии, в частности клонального микро-размножения растений, позволяют не только массово получать посадочный матери-



ал экономически ценных многолетних культур, но и сохранять редкие и исчезающие виды растений, имеющие трудности с семенным размножением. Разработка эффективных методов клонального микроразмножения растений является основным и необходимым условием в работах по созданию генетических банков *in vitro* [2, 3, 4].

Коллекция ценных многолетних культур

В настоящее время коллекция образцов культурных растений *in vitro* ботанического сада насчитывает 81 сорт 34 видов 27 родов, принадле-

жащих 15 семействам. Из них растения 36 сортов 16 видов 16 родов, принадлежащих к 5 семействам, были самостоятельно введены в культуру *in vitro* сотрудниками лаборатории (табл. 1), остальные образцы были любезно предоставлены уже в виде асептической культуры коллегами из других ботанических садов (Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград; Главный ботанический сад имени Н. В. Цицина РАН, г. Москва; Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г. Ялта, Украина).

Таблица 1

Перечень объектов коллекции декоративных и плодово-ягодных многолетних культур, введённых в культуру *in vitro* сотрудниками лаборатории микроразмножения растений УНЦ «Ботанический сад» СГУ

№	Семейство	Название образца
1	Rosaceae	<i>Amygdalus triloba</i> Ricker.
2		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Студенческая»
3		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Молодёжная»
4		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Орлица»
5		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Банкетная»
6		<i>Kerria japonica</i> (L.) DC.
7		<i>Pentaphylloides fruticosa</i> (L.) O. Schwarz сорт «Goldfinger»
8		<i>Prunus divaricata</i> Ldb. сорт «Алая заря»
9		<i>Rosa hybrida</i> L. сорт «Crimson Glory»
10		<i>Rosa hybrida</i> L. сорт «Michelangelo»
11		<i>Rosa hybrida</i> L. сорт «Konfetti»
12		<i>Rosa hybrida</i> L. сорт «Versilia»
13		<i>Rosa chinensis</i> Jacq.
14		<i>Rubus idaeus</i> L. сорт «Бальзам»
15		<i>Rubus caesius</i> L. сорт «Tornfree»
16		<i>Sorbus aucuparia</i> L. сорт «Гранатная»
17		<i>Spiraea japonica</i> L. сорт «Shirobana»
18		<i>Stephanandra tanakae</i> Franch. Et Sav.
19	Grossulariaceae	<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Зуша»
20		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Чудное мгновение»
21		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Элвеста»
22		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Багира»
23		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Загадка»
24		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Десертная Ольхиной»
25		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Тамерлан»
26		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Дачница»
27		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Черный жемчуг»
28		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Маленький принц»
29		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Чаровница»
30		<i>Lonicera caerulea</i> L. сорт «Камчадалка»
31		<i>Lonicera caerulea</i> L. сорт «Лазурная»
32		<i>Weigela × hybrida</i> Jacq. сорт «Eva Rathke»
33	<i>Weigela × hybrida</i> Jacq. сорт «Candida»	
34	Asparagaceae	<i>Hosta undulata</i> (Otto & A.Dietr.) L.H.Bailey сорт «Mediovariegata»
35	Anacardiaceae	<i>Cotinus adans coggygria</i> Scop.
36	Fabaceae	<i>Cladrastis lutea</i> (Michx.f) C.Koch



Максимально по количеству образцов в коллекции представлены семейства Rosaceae – 35 шт. (43.2%), Grossulariaceae – 11 шт. (13.5%), Ericaceae – 7 шт. (8.6%), Caprifoliaceae – 6 шт. (7.4%) и Ranunculaceae – 6 шт. (7.4%). Семейства Oleaceae, Actinidiaceae, Solanaceae и Saxifragaceae включают по 4 (5.0%), 2 (2.5%), 2 (2.5%) и 2 (2.5%) образца соответственно. Остальные семейства представлены в коллекции единичными образцами, составляющими в сумме менее 7.5% всех образцов коллекции.

Для реализации методов клонального микро-размножения в первую очередь выбирались растения с ценными хозяйственными признаками (плодово-ягодные, декоративно-цветущие и др.).

В качестве первичных эксплантов в работе с древесными культурами использовались латеральные почки и узловыи сегменты побегов текущего года. Экспериментально было показано, что наиболее оптимальным сроком изоляции являлась фаза активного роста растения (апрель-май и сентябрь-октябрь) [5]. Поверхностная стерилизация проводилась согласно общепринятой методике [6]. В работе с древесными растениями возник ряд трудностей. Так как исходный материал брался из полевых условий, он отличался высоким уровнем внешней и внутренней инфицированности. Для повышения эффективности стандартной методики стерилизации применялось предварительное выдерживание объектов в растворе синтетического моющего средства в течение 20–30 минут с последующим отмыванием их в проточной воде. Также применялась дополнительная ступенчатая стерилизация растворами фунгицидов и/или антибиотиков, чтобы уничтожить патогенные микроорганизмы и споры грибов. В качестве основных стерилизующих агентов использовались растворы гипохлоритов (в частности бытовые отбеливатели «Белизна» и «Domestos») и препарата «Лизоформин-3000». Концентрация растворов зависела от размеров эксплантов, наличия или отсутствия покровных чешуй, степени загрязненности. Например, стерилизацию побегов *Pentaphylloides fruticososa* осуществляли с использованием 7%, 10% и 15%-ного (время экспозиции 10 мин.) раствора «Domestos». Количество жизнеспособных эксплантов составило соответственно 5%, 24%, 50%. Уменьшение концентрации дезинфицирующего раствора приводило к 100%-му инфицированию, а увеличение – к большому проценту некроза и ингибированию роста.

На этапе микро-размножения и укоренения для каждого сорта (даже в пределах одного вида) минеральный состав питательной среды, количе-

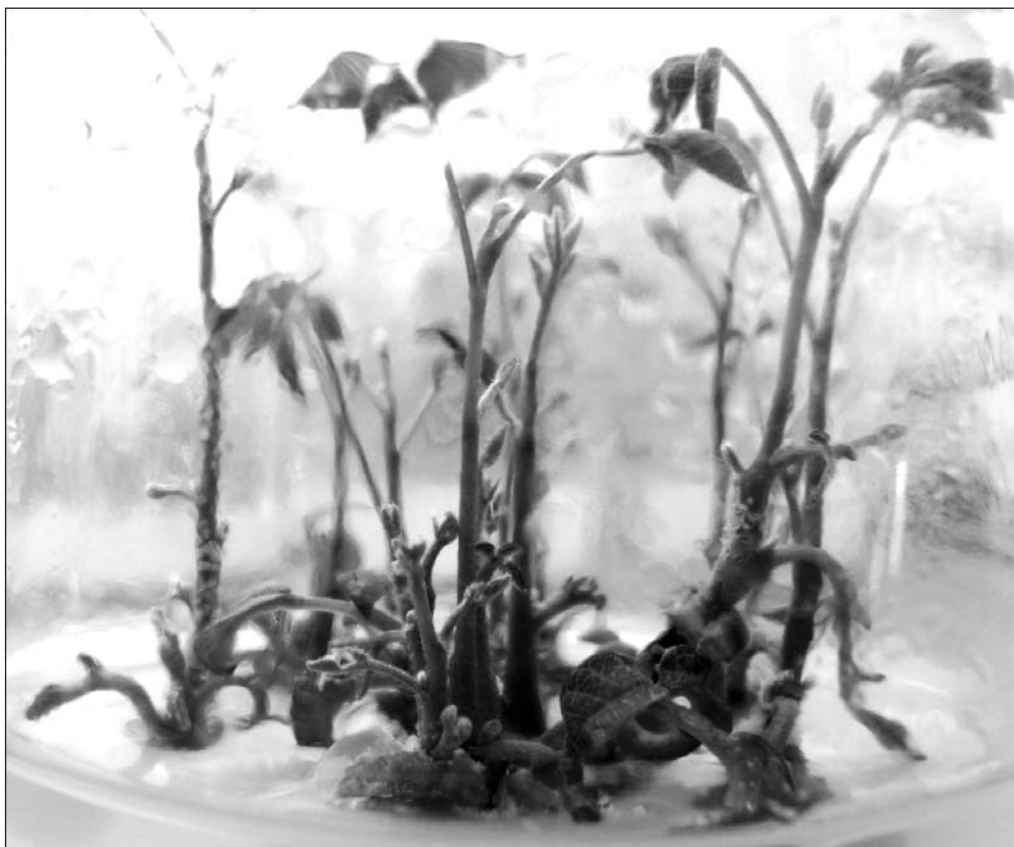
ство и соотношение регуляторов роста подбирали индивидуально. Коэффициент размножения варьировал от 1:2 до 1:30 в зависимости от биологических особенностей вида или сорта.

Культивировали растения при температуре 22–25 °С и 16-часовом фотопериоде.

В качестве цитокининов обычно использовали 6-бензиламинопурин (БАП), кинетин и зеатин. Концентрация цитокининов подбиралась индивидуально в зависимости от состояния экспланта и желаемого результата, обычно она составляла от 0.2 до 3.0 мг/л. Повышенная концентрация БАП в большинстве случаев приводила к увеличению коэффициента размножения, однако, побеги в этом случае получались мелкими и, чаще всего, оводнёнными. Например, для *Spiraea japonica* «Shirobana» оптимальным был диапазон концентрации БАП от 0.5 до 1.0 мг/л. При этом количество микропобегов на один эксплант через 30 суток культивирования составило 9.2 ± 2.3 . Однако побеги в данном случае оказывались очень мелкими, что приводило к потере части материала при пересадках. Добавление 0.5 мг/л ГК способствовало увеличению длины междоузлий и значительно облегчало работу с ними в последующем. В связи с хрупкостью побегов спиреи, значительную роль играл размер экспланта. Пересадка одиночных побегов повышала вероятность некроза, тогда как группы по 2–3 побега характеризовались лучшей приживаемостью.

Иногда совместное использование цитокининов и ауксинов на этапе размножения давало значительное увеличение коэффициента размножения. Например, при культивировании *Cladrastis lutea* на питательной среде, дополненной БАП 0.5 мг/л, микро-размножение практически отсутствовало. При совместном использовании БАП 0.2–0.5 мг/л и ИУК 0.5–1.0 мг/л коэффициент размножения составил 1:3–1:5 (рисунок). Сходные результаты были получены в культурах *Rubus idaeus*, *Lonicera caerulea* и *Cotinus adans* при различных комбинациях БАП и ИУК.

В качестве сред для укоренения использовали те же среды, на которых размножались экспланты, минеральный состав уменьшали вдвое, а цитокинины замещали ауксинами. В качестве индукторов ризогенеза для большинства культур использовали ИУК, ИМК и НУК. Наиболее эффективным в отношении древесных культур оказалось использование ИМК в концентрации 1.0 мг/л (*Cerasus vulgaris*, *Prunus domestica*, *Rubus caesius* и др.). В некоторых случаях длительное воздействие экзогенных ауксинов ингибировало развитие корней (*Cladrastis lutea*).



Регенерация микропобегов *Cladrastis lutea* на питательной среде с БАП 0.2 мг/л + ИУК 0.5 мг/л, 12-й пассаж. Длительность пассажа – 30 суток

Для подобных объектов наиболее эффективной оказалась методика, по которой регенеранты непродолжительное время (5–14 дней) выдерживают на питательной среде с повышенным содержанием ауксинов, а потом пересаживают на среду без регуляторов роста с добавлением активированного угля или рибофлавина [7, 8].

Процент укорененных регенерантов составлял, в зависимости от объекта, от 60 до 100%.

Перемещение культуры в условия замедленного роста осуществляли согласно методам, разработанным ННЦ-НБС для древесных культур [4, 9]. Каждый образец подвергали хемотерапии в целях освобождения от вирусных патогенов и пересаживали на питательные среды с повышенным содержанием углеводов. После этого пробирки с растениями помещали в культуральную камеру с температурой $+5\pm 1$ °С.

Коллекция редких и исчезающих видов растений

Коллекционный фонд редких и исчезающих видов растений Саратовской области *in vitro* в настоящее время насчитывает 26 видов 21 рода

14 семейств (табл. 2). При этом 24 вида коллекции занесены в Красную книгу Саратовской области [10] с категориями редкости: категория 1 – 6 видов (23% от объема коллекции), категория 2 – 13 видов (50%), категория 3 – 5 видов (19%). Остальные 8% составляют виды, исчезнувшие с территории области и представляющие интерес для реинродукции. В составе коллекции 16 видов занесены в Красную книгу Российской Федерации (КК РФ), большинство из них имеет критерий редкости 2 и 3 [11].

При работе с редкими и исчезающими видами растений в качестве первичных эксплантов были выбраны зрелые семена, так как они в полной мере охватывают генетическое разнообразие в пределах вида, и изъятие небольшого количества семян, необходимых для введения в культуру, не наносит урон природной популяции охраняемого растения [12]. При отборе растительного материала для длительного хранения в условиях *in vitro* предпочтение отдавали видам, занесенным в КК РФ, с высокими декоративными качествами, а также наиболее уязвимым растениям с узкой экологической амплитудой.



Таблица 2

Перечень видообразцов редких и исчезающих растений Саратовской области в коллекции *in vitro* УНЦ «Ботанический сад» СГУ

№	Семейство	Вид	Статус редкости по КК СО*	Статус редкости по КК РФ**
1	Liliaceae	<i>Fritillaria meleagroides</i> Patrin ex Schult. et Schult. fil.	2 (V)	–
2		<i>Tulipa gesneriana</i> L. (<i>T. schrenkii</i> Regel)	1 (E)	2а,б
3	Alliaceae	<i>Allium regelianum</i> A.Beck.	1 (E)	2а
4	Iridaceae	<i>Iris pseudacorus</i> L.	2 (V)	–
5	Caryophyllaceae	<i>Silene hellmanii</i> Claus.	2 (V)	3д
6		<i>Silene cretacea</i> Fisch. ex Spreng.	–	3в
7	Ranunculaceae	<i>Pulsatilla pratensis</i> (L.) Mill.	2 (V)	3б
8		<i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill.	2 (V)	–
9	Paeoniaceae	<i>Paeonia tenuifolia</i> L.	2 (V)	2б
10	Brassicaceae	<i>Alyssum tortuosum</i> Waldst. et Kit. ex Willd.	2 (V)	–
11		<i>Alyssum lenense</i> Adams.	2 (V)	–
12		<i>Mattiola fragrans</i> Bunge	2 (V)	3а
13	Rosaceae	<i>Potentilla vulgarica</i> Juz.	1 (E)	1
14	Fabaceae	<i>Astragalus dasyanthus</i> Pall.	2 (V)	–
15		<i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall.	3 (R)	3в
16		<i>Hedysarum razoumiovianum</i> Fisch. et Helm	1 (E)	3д
17		<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	3 (R)	–
18		<i>Calophaca wolgarica</i> (L.fil.) Fisch. ex D.C.	–	2а
19	Cistaceae	<i>Helianthemum nummularium</i> (L.) Mill.	2 (V)	–
20	Lamiaceae	<i>Hyssopus cretaceus</i> Dubjan.	3 (R)	3в
21	Scrophulariaceae	<i>Scrophularia sareptana</i> Kleop. ex Ivanina	2 (V)	3в
22	Globulariaceae	<i>Globularia punctata</i> Lapeyr.	2 (V)	3б,в
23	Asteraceae	<i>Anthemis trotziana</i> Claus.	1 (E)	3в
24		<i>Centaurea kasakorom</i> Iljin	3 (R)	–
25		<i>Centaurea ruthenica</i> Lam.	3 (R)	–
26		<i>Stemmacantha serratuloides</i> (Georgi) M. Dittrich	1 (E)	–

Примечание. *Красная книга Саратовской области (2006); **Красная книга Российской Федерации (2008).

В результате исследований была установлена оптимальная схема стерилизации семян из природных популяций. В соответствии с ней перед началом стерилизации семена промывали в растворе синтетического моющего средства в течение 20–30 минут, затем погружали в 70% спирт на 2–5 минут, после чего переносили в 25% (1:3) раствор бытового отбеливателя «Белизна» и экспонировали 20–30 минут. По окончании стерилизации семена троекратно промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на питательную среду. Для каждого объекта учитывали тип покоя семян и условия их прорастания [13].

Стерильные проростки переносили на питательную среду с различными регуляторами роста для подбора оптимальных условий клонального микроразмножения.

Так же, как и в работе с хозяйственно-ценными древесными культурами, для каждого исследуемого объекта условия культивирования подбирали с учётом биологических особенностей вида.

Для многих объектов существуют уже разработанные протоколы клонального микроразмножения, дающие высокие результаты (*Tulipa gesneriana* [14], *Pulsatilla pratensis* [15], *Paeonia tenuifolia* [16], *Mattiola fragrans* [17], *Stemmacantha*



serratuloides [18] и др.), однако почти каждый из них требует корректировки в зависимости от генотипа исследуемого образца [4].

Таким образом, проводимая сотрудниками ботанического сада работа по созданию и поддержанию коллекции *in vitro* редких и полезных видов растений способствует сохранению, размножению и изучению ценных растительных объектов. В настоящее время в коллекции *in vitro* лаборатории микрклонального размножения растений поддерживается 107 образцов 60 видов 48 родов 26 семейств покрытосеменных растений, из которых 26 видов 21 рода 14 семейств являются охраняемыми видами Саратовской области.

Благодарности

Выражаем искреннюю признательность сотрудникам Волгоградского регионального ботанического сада (г. Волгоград) и лично его директору, канд. биол. наук О. И. Короткову, Главного ботанического сада имени Н. В. Цицина РАН (Москва) и лично зав. лабораторией биотехнологии растений, канд. биол. наук О. И. Молкановой, Никитского ботанического сада – Национального научного центра (г. Ялта, Украина) и лично зав. лабораторией биотехнологии и вирусологии, д-ру биол. наук И. В. Митрофановой за неоценимую помощь, консультационную поддержку и предоставленные образцы введённых в культуру *in vitro* видов растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности по заданию № 2014/203 (код проекта 1287).

Список литературы

1. Молканова О. И., Коротков О. И., Горбунов Ю. Н. Методология сохранения коллекций редких и ценных растений в генетических банках *in vitro* // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира : материалы II Всерос. науч.-практ. конф., Волгоград, 19–21 авг. 2008 г. / под ред. А. С. Демидова. Белгород : Изд-во Белг. ГУ, 2008. С. 118–122.
2. Агеева С. Е., Круглова Л. Н., Буганова А. В., Жолобова О. О., Сафронова Г. Н. Сохранение биоразнообразия редких и исчезающих видов растений в Волгоградском региональном ботаническом саду // Вестн. Балт. федер. ун-та им. И. Канта. Калининград : Изд-во БФУ им. И. Канта, 2012. Вып. 7. С. 103–109.
3. Новикова Т. И., Набиева А. Ю., Полуобоярова Т. В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада // Вестн. ВОГиС. Новосибирск : Изд-во ИЦиГ СО РАН, 2008. Т. 12, № 4. С. 564–572.
4. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев : Аграрна наука, 2011. 344 с.
5. Крицкая Т. А., Блюднева Е. А., Кашин А. С. Клональное микроразмножение некоторых декоративных видов растений семейства Rosaceae и Carpfoliaceae // Цветоводство : традиции и современность : материалы VI Междунар. науч. конф. Волгоград, 15–18 мая 2013 г. / отв. ред. А. С. Демидов. Белгород : ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2013. С. 431–434.
6. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. М. : Наука, 1983. 232 с.
7. Klavina D., Priede G. *In vitro* cultivation and root initiation of the endangered plant *Pulsatilla patens* // Environmental and Experimental Biology. Latvia : Published by University of Latvia, 2011. Vol. 9. P. 71–74.
8. Криницына А. А., Мурашев В. В., Успенская М. С. Микрклональное размножение *Paeonia suffruticosa* Andr. с целью интродукции в урбанофитоценозы // Вестн. ИрГСХА. Иркутск : Изд-во ИрГСХА, 2011. Т. 44, № 2. С. 82–89.
9. Митрофанова О. В., Михайлов А. П., Чехов А. В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур : сб. науч. тр. Ялта : Изд-во СП РИФ «Южный берег», 1997. Т. 119. С. 7–34.
10. Красная книга Саратовской области : Грибы. Лишайники. Растения. Животные / Комитет охраны окружающей среды и природных ресурсов Саратов. обл. Саратов : Изд-во Торг.-пром. палаты Саратов. обл., 2006. 528 с.
11. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы); гл. ред. Ю. П. Трутнев / Мин-во природ. ресурсов и экологии РФ; Федер. служба по надзору в сфере природопольз.; РАН; Рос. бот. о-во; МГУ М. : Тов. науч. изд. КМК, 2008. 855 с.
12. Горбунов Ю. Н., Дзыбов Д. С., Кузьмин З. Е., Смирнов И. А. Методические рекомендации по реинтродукции редких и исчезающих видов растений (для ботанических садов). Тула : Гриф и К, 2008. 56 с.
13. Николаева М. Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л. : Наука, 1985. 347 с.
14. Ахметова А. Ш., Миронова Л. Н. Клональное микроразмножение тюльпана сорта Lucky Strike // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира : материалы II Всерос. науч.-практ. конф., Волгоград, 19–21 августа 2008 г. / под ред. А. С. Демидова. Белгород : Изд-во БелГУ, 2008. С. 148–152.
15. Naumovski D., Radic S., Pevalek-Kozlina B. *In vitro* micropropagation of *Pulsatilla pratensis* (L.) Miller ssp. *nigricans* (Störck) Zämelis // Propagation of Ornamental Plants. Bulgaria : Sejani Ltd., 2009. Vol. 9. P. 16–20.
16. Ветчинкина Е. М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 22 с.



17. Жолобова О. О. Сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro* и оценка уровня их внутривидового полиморфизма : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Белгород : Изд-во БелГУ, 2012. 23 с.
18. Ишмуратова М. М. Сохранение *Stemmacanta ser-*

ratuloides ex situ // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира : материалы II Всерос. науч.-практ. конф., Волгоград, 19–21 авг. 2008 г. / под ред. А. С. Демидова. Белгород : Изд-во БелГУ, 2008. С. 60–63.

УДК 579.242:579.841.2

ОСОБЕННОСТИ ВЫЖИВАНИЯ РИЗОБАКТЕРИИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245 В ЖИДКОЙ КУЛЬТУРЕ ПРИ БОЛЬШИХ СРОКАХ ХРАНЕНИЯ

М. А. Кушнерук¹, Е. А. Славкина², Н. И. Старичкова², Л. П. Антонюк¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: ant306@ibppm.sgu.ru

²Саратовский государственный университет
E-mail: natstar-12@mail.ru



Изучали особенности выживания неспорообразующей ризобактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 в жидкой культуре при ее хранении в течение 6 лет 8 мес., а также возобновление размножения при внесении покоящихся бактерий в свежую среду. Установлено, что на протяжении всего периода наблюдения азоспириллы сохраняют достаточно высокое (не менее 10³ кл./мл) число клеток, не утративших способности к делению. Выявлено образование флокулодержательной биопленки бентосного типа, сохранявшейся до конца наблюдения, а также кристаллов игольчатой формы. Показано, что бактериальные клетки в длительно хранящейся культуре *A. brasilense* сохраняют высокий ростовой потенциал и быстро возобновляют рост при перенесении в свежую синтетическую среду. Присутствие в свежей среде белка АЗП в концентрации 1 нг/мл стимулировало размножение бактерий. Полученные результаты, наряду с более ранними сведениями о высоком ростстимулирующем потенциале азоспирилл, свидетельствуют о перспективности создания жидких препаратов для растениеводства на основе *A. brasilense*.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, покой у бактерий, биопленка, агглютинин зародышей пшеницы, АЗП, длительное хранение культур, кристаллы.

Features of the Rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 Long-term Survival in Liquid Culture

М. А. Kushneruk, E. A. Slavkina,
N. I. Starichkova, L. P. Antonyuk

Features of the survival of non-spore forming rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 in liquid culture at its storage for 6 years 8 months, as well as the revert to growth when dormant bacteria incubated in fresh medium were studied. During the entire period of observation azospirilla were established to retain rather high (at least 10³ cells/ml) the number of cells which have not lost the ability to divide. A flocs-containing biofilms of benthic type persisted until the end of observation and needle-shaped crystals were found. It has been

shown that bacterial cells in the long-term *A. brasilense* culture retain a high growth potential and rapidly resume growth when transferred to fresh synthetic medium. The presence of the protein 1 ng/ml WGA in the fresh medium was stimulated proliferation of bacteria. The obtained results, together with earlier information on high growth-stimulating potential of azospirilla, indicate the prospects of creating a liquid preparations for crop based on *A. brasilense*.

Key words: *Azospirillum brasilense*, dormancy in bacteria, biofilm, lectin, wheat germ agglutinin, WGA, long-term culture, crystals.

Почти все известные штаммы *Azospirillum brasilense* относятся к функциональной группе ростстимулирующих ризобактерий (plant-growth promoting rhizobacteria – PGPR) в силу присущей им способности колонизировать агрономически значимые растения, улучшать их рост, защищать от патогенов и увеличивать урожайность [1–2]. Несмотря на очевидный биотехнологический потенциал азоспирилл и наличие на агрорынке препаратов на их основе, разработчики новых бактериальных препаратов при прочих равных условиях зачастую отдают предпочтение представителям родов *Bacillus* и *Paenibacillus* [3]. Основными причинами такого предпочтения являются способность бацилл к спорообразованию и их ожидаемая хорошая выживаемость при длительном хранении готовых биопрепаратов.

Азоспириллы относятся к неспорообразующим бактериям и при неблагоприятных условиях формируют цисты, близкие по строению к цистам *Azotobacter vinelandii* [4, 5]. Сохранение жизнеспособности *A. brasilense* при длительных сроках хранения уже изучалось, однако лишь для одного случая – когда бактерии заключены в альгинатные