Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. № 51. С. 6–24

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 577.15:579.83
doi: 10.17223/19988591/51/1

А.В. Сидоров, Ю.В. Зайцева, О.А. Маракаев

Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, г. Ярославль, Россия

Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro*

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России,
государственное задание ЯрГУ, работа № 0856-2020-0008

Установлено, что штаммы бактерий Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca GRP225 и P. brassicacearum GRT221, ассоциированные с подземными органами пальчатокоренника мясокрасного (Dactylorhiza incarnata (L.) Soó), тубероидной орхидеей средней полосы европейской части России, синтезируют и выделяют в культуральную жидкость индолил-3-уксусную кислоту в концентрациях от 18,2±1,30 до 31,1±1,94 мг/л. Внесение культуральной жидкости ассоциативных бактерий в питательную среду для культивирования D. incarnata in vitro способствовало ускорению прорастания зрелых семян и повышению их всхожести, увеличению темпов развития проростков, линейных размеров формирующихся ортотропного побега и придаточных корней, накоплению сырой массы. Наиболее выраженное стимулирующее действие отмечено для штамма P. chlororaphis subsp. aurantiaca GRP225.

Ключевые слова: *Pseudomonas; орхидные; протокорм; ювенильное растение; супернатант; индолил-3-уксусная кислота.*

Введение

Бактерии рода *Pseudomonas* являются типичными представителями почвенных микроорганизмов в составе ассоциированных с растениями микробных сообществ [1]. Они обладают способностью синтезировать фитогормоны [2], вторичные метаболиты [3], вещества с антибактериальной и фунгицидной активностями [4]. Эти бактерии также оптимизируют условия минерального питания растений [5]. Их используют в качестве основы биологических средств регуляции роста и защиты растений, рассматривают как перспективные агенты биоконтроля [1]. Бактеризация семян и проростков сельскохозяйственных культур суспензией на основе *Pseudomonas* увеличивает прирост линейных размеров и повышает урожайность [6]. Наряду с инокуляцией растений живыми клетками бактерий в культуре *in vitro* в ка-

честве компонента питательных сред используют культуральные жидкости (КЖ) микроорганизмов [7]. В исследовании на пшенице показано, что КЖ бактерий рода *Pseudomonas* способствовали увеличению энергии прорастания и всхожести семян до 15%, а также двукратному увеличению прироста линейных размеров проростков [8]. Известно, что применение КЖ бактерий может быть эффективнее, чем использование самих клеток, отмытых от КЖ [9].

Среди бактерий, ассоциированных с орхидными (Orchidaceae), также выявлены представители рода *Pseudomonas*. Они обнаружены на поверхности и внутри надземных и подземных органов как у тропических видов [10], так и у видов умеренного климата Северного полушария [11]. Исследования по симбиотическому проращиванию семян орхидных на искусственных питательных средах ранее проводились. Первая попытка инокуляции семян орхидных бактериальными культурами предпринята Кнудсоном в 1922 г. [12]. Он показал, что бактерии *Bacillus radicicola* увеличивали всхожесть семян эпифитных видов *Epidendrum* и *Laelia-Cattleya*. В 90-х годах было продемонстрировано, что *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas maltophili*a и *Bacillus cereus* в комплексе с микоризными грибами способствовали прорастанию семян *Pterostylis vittata* [13]. Последние исследования показали, что бактеризация семян *Dendrobium nobile Pseudomonas fluorescens* штаммами бактерий *Klebsiella oxytoca,* выделенными из растения-хозяина, способствовала их прорастанию *in vitro* [10, 14, 15]. Однако при использовании живого инокулята возникает ряд сложностей: невозможность отследить конечную концентрацию ауксинов в культуральной среде, неустойчивое равновесие в моделируемой симбиотической системе, различный состав питательных сред для бактериальных и растительных культур. С практической точки зрения решением этих проблем может стать применение биостимуляторов микробного происхождения отдельно от клеток [7]. Однако исследования по влиянию КЖ ассоциативных бактерий на рост и развитие орхидных умеренного климата Северного полушария в культуре *in vitro* до настоящего времени не проводились. Между тем эти растения имеют особенности онтогенеза, связанные с длительным прорастанием семян, формированием специфических структур (протокормов, проторизомов), продолжительной подземной жизнью проростков, вторичным покоем, зависимостью в природных условиях от микосимбионта и др. [16]. Исследования влияния КЖ ассоциативных бактерий на эффективность прорастания семян, анатомо-морфологическую структуру и физиологические особенности проростков орхидных умеренного климата Северного полушария в культуре *in vitro* могут способствовать разработке технологий культивирования редких и охраняемых видов с использованием биологически активных компонентов питательных сред.

Цель работы – оценка влияния двух культуральных жидкостей ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы генеративных особей *Dactylorhiza incarnata*, на прорастание семян, морфогенез и рост

проростков пальчатокоренника мясокрасного в культуре *in vitro* как одного из представителей орхидных средней полосы европейской части России.

Материалы и методики исследования

Dactylorhiza incarnata (L.) Soó (пальчатокоренник мясокрасный) относится к орхидным с тубероидной жизненной формой, широко распространен на территории средней полосы европейской части России [17], охраняется – включен в Европейский список краснокнижных сосудистых растений, Приложение II к конвенции CITES, а также в некоторые региональные Красные книги [18].

Бактерии рода *Pseudomonas* – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и *P. brassicacearum* GRT221 выделены из ризосферы генеративных особей *D. incarnata*, произрастающих в осоково-разнотравном сообществе на дерново-подзолистой суглинистой почве (содержание гумуса в корнеобитаемом слое 5,7%, сумма поглощенных оснований – 14 мг/экв, pH – 6,3) на территории Ярославской области. Для идентификации штаммов использовали молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Геномная ДНК выделена с помощью набора ExtractDNA (Евроген) согласно инструкциям производителя. Гены 16S рРНК амплифицированы с использованием универсальных праймеров 9F(5›-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1512R(5›-ACGGCTACCTTGTTACGACTT). Режим проведения ПЦР: 95 °C – 4 мин; (95 °C – 1 мин; 55 °C – 1 мин; 72 °C – 1 мин 30 с) – 30 циклов; 72 °C – 5 мин. Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле. Фрагменты размером около 1,5 т.п.н. вырезали и очищали с помощью набора Cleanup Mini (Евроген) согласно инструкциям производителя. Амплифицированные фрагменты ДНК легировали с ДНК вектора pAL-TA (Евроген). Секвенирование клонированной последовательности ДНК проводили, используя универсальные M13-праймеры. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в GenBank (MH469936, MH469937). Штамм *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика под регистрационным номером B–13158.

Бактерии культивировали на среде LB в условиях постоянного перемешивания на роторном шейкере ES-20 (Biosan, Латвия) при температуре 30 °C в течение 5–7 суток. КЖ ассоциативных бактерий получали путем отделения бактериальной массы центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 20 мин при 4 °C (Eppendorf 5804R, Германия). КЖ стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр «Millipore» (США) с диаметром пор 0,22 мкм. Содержание индолил-3-уксусной кислоты (IAA) в КЖ исследуемых штаммов бактерий определяли колориметрическим методом с реактивом Сальковского [10]. Культуру бактерий вносили в питательную среду

Чапека с 5 мг/л триптофана и культивировали на роторном шейкере ES-20 (Biosan, Латвия) при 180 об/мин при температуре 28 °С, суспензию центрифугировали 15 мин при 7 000 об/мин. К полученной КЖ добавляли реактив Сальковского (1:1) и оставляли в темноте на 20 мин при 30 °С. Аналогично поступали в вариантах со средой Чапека и дистиллированной водой. Оптическую плотность жидкости определяли на спектрофотометре Unico-2802S/VIS (США) при 540 нм. Концентрацию IAA устанавливали по калибровочному графику, построенному на основе разведений стандартного раствора синтетической IAA.

Изучение влияния КЖ ассоциативных бактерий на прорастание семян, морфогенез и рост проростков *D. incarnata* проводили в культуре *in vitro* с использованием модифицированной питательной среды Кнудсона с активированным углем и гуматом натрия [19]. В нее дополнительно вносили стерильные КЖ ассоциативных бактерий в количестве 10% от общего объема среды. Для сравнения использовали модифицированную питательную среду Кнудсона с IAA в концентрации 1,75 мг/л (10 мкМ), а также контроль – вариант с использованием модифицированной питательной среды Кнудсона без внесения КЖ и IAA.

Посевы зрелых семян культивировали *in vitro* в течение 2 месяцев в темноте и 16 месяцев в климатической камере КС-200 (СКТБ, Россия) при интенсивности освещения 2000 лк и 16/8 фотопериоде. Для поддержании влажности питательной среды флаконы закрывали парафинизированной пленкой. Количество проросших семян определяли на 3-, 6-, 12- и 18-й месяцы культивирования. О прорастании судили по количеству образовавшихся протокормов. Полную всхожесть семян определяли по количеству проростков через 18 месяцев после посева. При описании морфогенеза *D. incarnata* в культуре *in vitro* выделяли протосому (на стадиях протокорма и проторизома) и ювенильное растение. Под протосомой понимали своеобразную форму постсеменного развития орхидных, представляющую собой метамерное или неметамерное тело, развивающееся из апикального полюса зародыша, состоящее из протокорма (1-я стадия развития протосомы) и проторизома (2-я стадия развития протосомы) с закладкой на его верхушке почки с зачатками первых листьев. Ювенильным растением называли комплексную структуру, состоящую из протосомы и первого одноосного побега с корнями и листьями [20]. Морфофизиологические параметры (линейные размеры протосом, побегов и придаточных корней, сырую массу проростков) определяли на 3-, 6-, 12- и 18-й месяцы культивирования. В каждом варианте проанализировано не менее 20 экземпляров. Повторность опыта трехкратная.

Статистическая обработка результатов проведена по стандартным методикам [21]. Данные в таблицах приведены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой ($M \pm m_M$). Оценка различий выборочных средних проведена при значении доверительной вероятности 0,95.

Результаты исследования и обсуждение

Содержание ИУК в КЖ исследуемых штаммов. Ауксины – один из важнейших компонентов культуральной среды, необходимый для размножения растений в культуре *in vitro*. Индолил-3-уксусная кислота (IAA) – наиболее характерный ауксин, продуцируемый многими бактериями [1, 22]. Экзогенная IAA контролирует широкий спектр процессов роста и развития растений: низкие концентрации стимулируют первичное удлинение корней, высокие – образование боковых корней, уменьшают длину первичных корней и увеличивают образование корневых волосков [22, 23]. Известно, что бактерии, связанные с орхидными, способны продуцировать ауксины [2, 10, 24]. В наших предыдущих исследованиях впервые показано, что бактерии, ассоциированные с растениями рода *Dactylorhiza*, также способны продуцировать ауксины [25]. Нами проведен скрининг бактерий, ассоциированных с *D. incarnata*, по их способности синтезировать IAA. Наиболее активные штаммы-продуценты этого фитогормона были отобраны для дальнейших исследований. Сравнительный анализ последовательности генов 16S рРНК показал, что филогенетически эти штаммы относятся к роду *Pseudomonas*. При этом штамм *Pseudomonas* sp. GRP225 ближе всего к виду *Pseudomonas chlororaphis*, подвид *aurantiaca* (99,93%), штамм *Pseudomonas* sp. GRT221 – к виду *Pseudomonas brassicacearum* (99,73%). Максимальное количество IAA в КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 составило 18,2±1,30 мг/л, для *P. brassicacearum* GRT221 – 31,1±1,94 мг/л. Ризобактерии в основном синтезируют IAA из триптофана, который в различных концентрациях присутствует в корневых экссудатах [22]. В наших исследованиях добавление триптофана значительно увеличивало количество синтезируемого ауксина. Наивысший уровень продукции IAA получен при культивировании штаммов в среде Чапека, дополненной 5 мг/л триптофана при pH 7 и инкубировании на роторном шейкере ES-20 (Biosan, Латвия) (200 об/мин) при 30 °C в течение 5 дней.

Прорастание семян. На прорастание зрелых семян орхидных оказывают влияние приемы их предпосевной обработки, составы питательных сред, режимы проращивания и др. [20]. Скрининг биостимуляторов микробного происхождения, способствующих семенному размножению *D. incarnata* в культуре *in vitro*, может оказаться полезным для выяснения факторов, влияющих на рост и развитие орхидных на ранних стадиях онтогенеза.

В нашей работе показано, что к третьему месяцу прорастание зрелых семян *D. incarnata* связано с набуханием зародыша и формированием многочисленных ризоидов (рис. 1, *а*). При этом на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 прорастание семян достигает максимума (21%) и превышает значение в контроле в 5 раз, в опыте с IAA – в 1,8 раза (рис. 2).

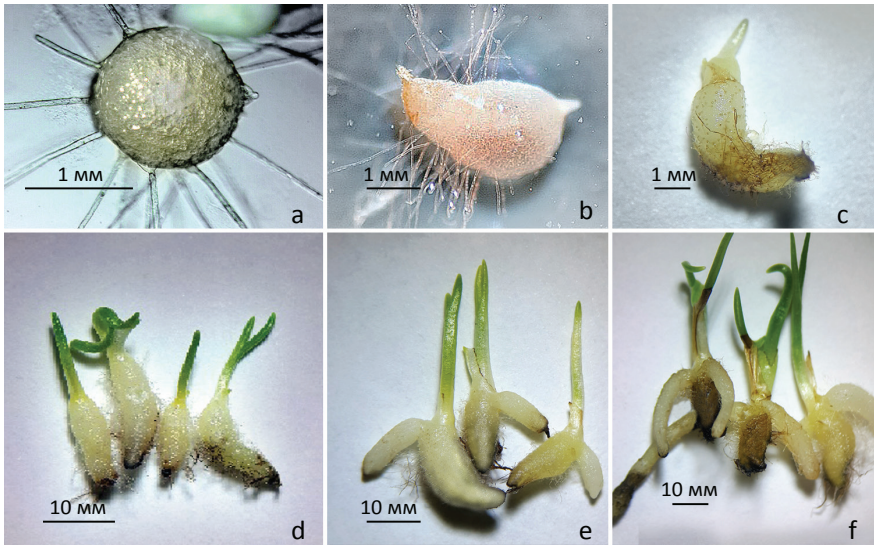

Рис. 1. Прорастание и формирование проростков *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro*: *a* – протокорм (3-й месяц); *b* – протокорм (6-й месяц); *c* – проторизом (6-й месяц); *d* – протосомы с ортотропным побегом (12-й месяц); *e* – протосомы с придаточными корнями (18-й месяц); *f* – ювенильные растения (18-й месяц). Автор фото А.В. Сидоров

[**Fig. 1.** Germination and seedling formation of *Dactylorhiza incarnata in vitro*: *a* - Protocorm (3rd month); *b* - Protocorm (6th month); *c* - Protorizom (6th month); *d* - Protosoms with orthotropic shoot (12th month); *e* - Seedlings with additional roots (18th month); *f* - Juvenile plants (18th month). Photo by Andrey Sidorov]

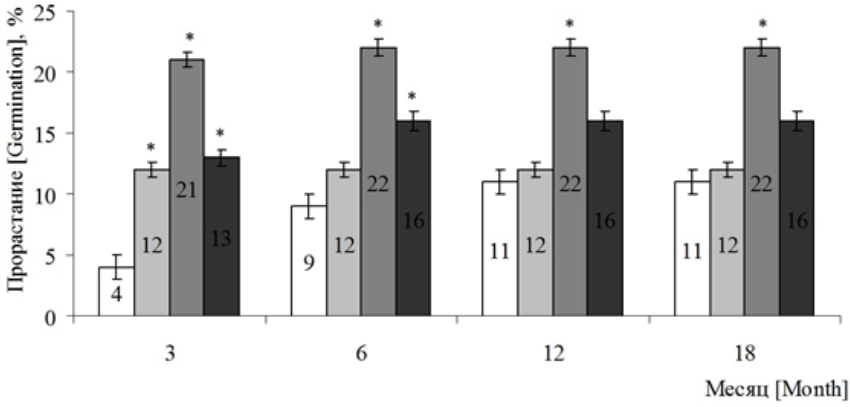

Рис. 2. Прорастание семян *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro* (%)

[**Fig. 2** Germination of *Dactylorhiza incarnata* seeds *in vitro* (%)]:

□ – контроль (Control); ▒ – IAA; ▒ – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225; ■ – *P. brassicacearum* GRT221.

Примечание. *Статистическая значимость различий ($p \leq 0{,}05$) по сравнению с контролем.

[*Note.* Differences are statistically significant ($p \leq 0{,}05$) compared to the control]

Ранее указывалась способность *D. incarnata* (до 15% зрелых семян) к прорастанию на безгормональных питательных средах в культуре *in vitro* [26]. В случае с использованием среды с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 этот показатель оказывается выше, что может свидетельствовать о ее стимулирующем действии.

Аналогичная картина отмечена также для КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221, наиболее выраженная с 6-го месяца (см. рис. 2). При этом эффективность ее стимулирующего влияния на 27% ниже, чем у КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. КЖ двух штаммов в большей степени способствуют прорастанию семян *D. incarnata* в культуре *in vitro* по сравнению с контролем и вариантом с IAA. Известно, что внесение экзогенной IAA в питательную среду может способствовать увеличению всхожести семян тубероидных видов орхидных умеренных широт, характеризующихся трудным прорастанием в культуре *in vitro* [27]. По-видимому, IAA, содержащаяся в КЖ штаммов ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, оказывает сходное влияние. В нашей работе максимальный стимулирующий эффект воздействия на семена *D. incarnata* во всех вариантах опыта с КЖ проявляется к 6-му месяцу.

Таким образом, выявлено стимулирующее влияние КЖ штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225K и *P. brassicacearum* GRT221 на прорастание зрелых семян *D. incarnata* в культуре *in vitro*. При этом действие первой на 27% эффективнее по сравнению со второй и выражается в увеличении количества проросших семян по отношению к контролю в 5 раз и к варианту с IAA в 1,8 раза.

Морфогенез проростков. Начальные этапы роста и развития *D. incarnata* связаны с образованием из метаморфизированного апикального полюса зародыша протосомы, представленной на ранней стадии протокормом. Это утолщенное биполярное образование, способное к дальнейшему формированию структур проростка – ризоидов и проторизомов [20]. В исследованных вариантах опыта у протокормов *D. incarnata* в базальной части отмечались многочисленные ризоиды однорядного типа (см. рис. 1, *b*). На средах с IAA и КЖ штаммов ассоциативных бактерий протокормы к 3-му месяцу культивирования имели более вытянутую форму по сравнению с контролем, которая тяготеет к округлой. Известно, что форма протокормов орхидных определяется генетически, зависит от условий культивирования, активности метаболических процессов в их клетках и др. [28]. Способность ауксинов к полярному транспорту, созданию градиентов фитогормонов позволяет им по-разному изменять скорость деления и роста клеток в зависимости от органа и его положения в пространстве [29].

К 6-му месяцу большая часть посевов во всех вариантах опыта представлена проторизомами – образованиями с видоизмененными стеблями, развивающимися из апикальной зоны протокорма (см. рис. 1, *c*). Доля проторизомов к этому времени возрастает в следующем ряду: контроль – КЖ

штамма *P. brassicacearum* GRT221 – IAA – КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 (рис. 3).

Увеличение этого показателя свидетельствует о более быстрых темпах развития проростков. Дальнейшее развитие *D. incarnata* сопровождается ростом апекса и формированием ортотропного побега (см. рис. 1, *d*). К 12-му месяцу культивирования доля проростков с ортотропным побегом, в том числе имеющих уже придаточные корни, в вариантах опыта с КЖ исследуемых штаммов составляет 95–99%, в контроле – 70% (см. рис. 3). Придаточные корни к этому времени становятся хорошо различимы у проростков во всех вариантах опыта (см. рис. 1, *e*). При этом наибольшая доля (80%) развитых проростков на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. Минимальное количество (39%) проростков с корнями отмечено в контроле (см. рис. 3). К 15-му месяцу культивирования у проростков на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и IAA формируется второй придаточный корень, в то время как в контроле и варианте с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 проростки имеют один придаточный корень. Необходимо отметить, что некоторые придаточные корни проростков на средах с КЖ исследуемых штаммов бактерий и IAA разрастаются, что, вероятно, связано с приобретением ими запасающей функции. Эти особенности не проявляются в контрольном варианте.

К 15–16-му месяцам культивирования у *D. incarnata* отмечается образование первого настоящего листа (см. рис. 1, *f*), что свидетельствует о переходе в состояние ювенильных растений. Первые растения с шиловидно-линейным листом формируются на средах с исследуемыми КЖ на 1,5–2 месяца раньше, чем в контроле и варианте с IAA. К 18-му месяцу доля проростков с первым настоящим листом на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 максимальна и в 1,8–2 раза превышает этот показатель в вариантах с IAA и КЖ *P. brassicacearum* GRT221 (см. рис. 3). Менее развиты проростки в контроле, у которых к этому времени настоящие листья отсутствуют.

Таким образом, у проростков *D. incarnata* на питательных средах с КЖ отмечены более высокие темпы развития. Это проявляется в более раннем и активном формировании проторизомов, ортотропного побега, первого и второго придаточных корней. У проростков на средах с КЖ выявлено формирование запасающих корней, отсутствующих в контроле. Влияние КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 сопоставимо с действием IAA. На среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 к 18-му месяцу культивирования формируется наибольшее число проростков с фотосинтезирующим листом – ювенильных растений.

Рост проростков. Накопление сырой массы *D. incarnata* в культуре *in vitro* является интегральным параметром, отражающим наряду с водным статусом проростков содержание образующихся в них пластических соединений в процессе роста.

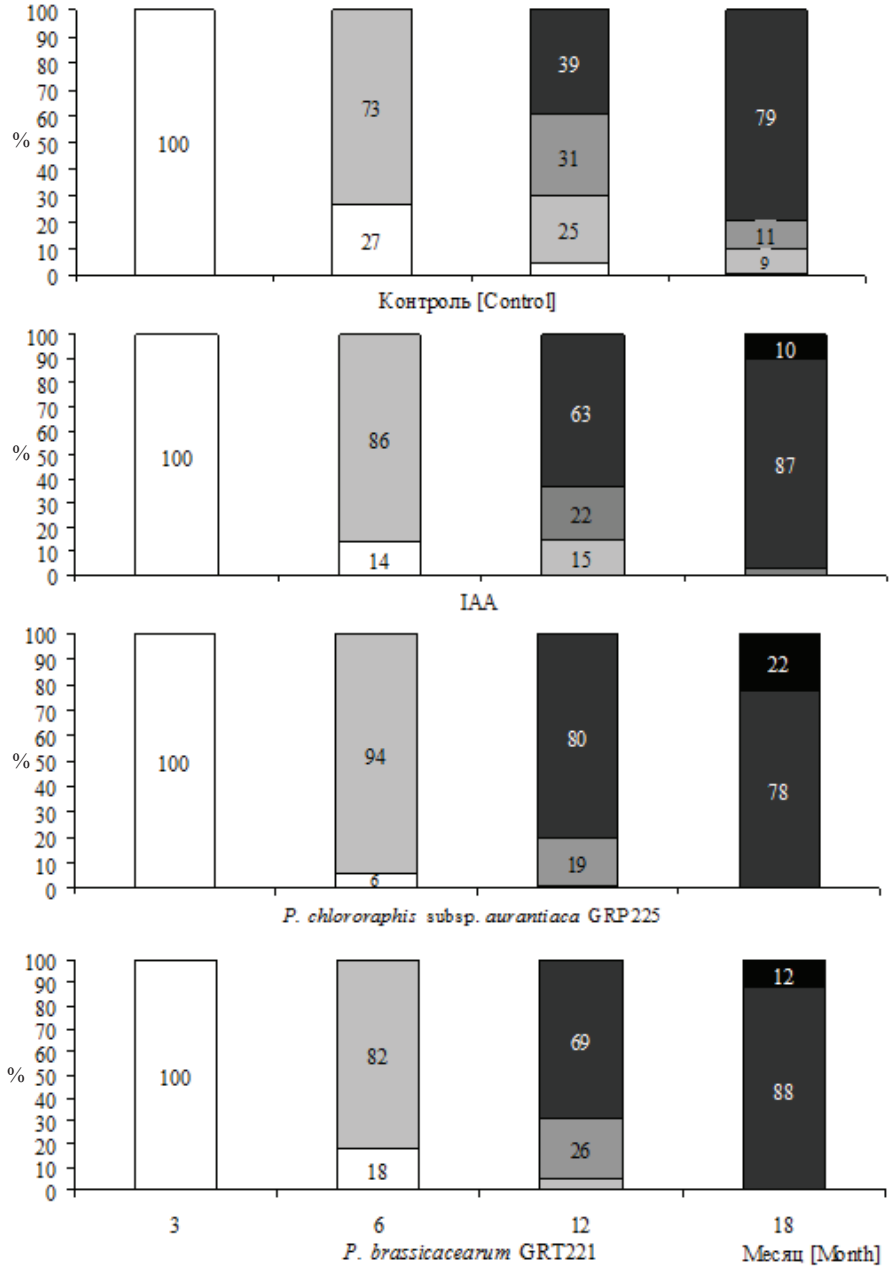

Рис. 3. Влияние КЖ ассоциативных бактерий на морфогенез *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro* (%): □ – протокормы; ▒ – проторизомы; ▓ – проростки с ортотропным побегом; ■ – проростки с придаточными корнями; ■ – ювенильные растения

[**Fig. 3.** Effect of supernatant of associative bacteria on the morphogenesis of *Dactylorhiza incarnata in vitro* (%): □ - Protocorms; ▒ - Protorizoms; ▓ - Seedlings with orthotropic shoot; ■ - Seedlings with additional roots; ■ - Juvenile plants]

на накопление массы увеличивается в следующем ряду: контроль – IAA – КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 – КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 (табл. 1).

Таблица 1 [Table 1]

Влияние КЖ ассоциативных бактерий на темпы прироста сырой массы *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro*
[Effect of supernatant of associative bacteria on the growth rate of *Dactylorhiza incarnata* wet weight *in vitro*], %

Вариант [Sample]	Месяц [Month]			
	3-й	6-й	12-й	18-й
Контроль [Control]	100	289	1 117	1 644
IAA	100	310	1 519	2 048
P. chlororaphis subsp. *aurantiaca* GRP225	100	350	1 717	2 458
P. brassicacearum GRT221	100	314	1 648	2 386

Масса проростков, формирующихся к 18-му месяцу, составляет на среде с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 – 50,1±3,11 мг и на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 – 59,0±3,91 мг. При этом она на 14–27% выше, чем в варианте с IAA, и на 40–50% превышает аналогичный показатель в контроле. Проростки *D. incarnata* на среде с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 отличаются высокими значениями сырой массы и наибольшими темпами ее прироста в культуре *in vitro*.

Что касается линейных размеров, то первые три месяца культивирования протосомы *D. incarnata* статистически значимо ($p \leq 0{,}05$) различались только длиной. Она превышает показатель в контроле на 40% у проростков на среде с КЖ исследуемых штаммов бактерий и на 18% у проростков на среде с IAA (табл. 2).

Таблица 2 [Table 2]

Влияние КЖ ассоциативных бактерий на линейные размеры *Dactylorhiza incarnata* в культуре *in vitro*
[Effect of supernatant of associative *Pseudomonas* bacteria on *Dactylorhiza incarnata* linear parameters *in vitro*] (mm) ($M \pm m_M$)

Параметр [Parameter]	Контроль [Control]	IAA	*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225	*P. brassicacearum* GRT221
3-й месяц [Third month]				
Длина, мм [Length, mm]	1,0±0,08	1,4±0,12*	1,7±0,12*	1,7±0,11*
Ширина, мм [Width, mm]	1,0±0,09	0,9±0,08	1,1±0,10	0,8±0,08
6-й месяц [Sixth month]				
Длина, мм [Length, mm]	3,1±0,16	3,4±0,19	3,7±0,19*	3,4±0,17
Ширина, мм [Width, mm]	2,1±0,13	2,3±0,13	2,9±0,16*	2,4±0,14

Окончание табл. 2 [Table 2 (end)]

Параметр [Parameter]	Контроль [Control]	IAA	*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225	*P. brassicacearum* GRT221
Длина побега, мм [Shoot length, mm]	1,1±0,11	1,1±0,12	2,3±0,14*	1,6±0,13*
12-й месяц [Twelfth month]				
Длина, мм [Length, mm]	9,4±0,82	14,3±1,41*	14,1±1,34*	16,2±1,15*
Ширина, мм [Width, mm]	6,3±0,11	9,1±0,12*	12±0,11*	9,3±0,14*
Длина побега, мм [Shoot length, mm]	29,1±1,93	35,8±2,18*	48,2±2,65*	36,1±2,42*
Длина придаточных корней, мм [The length of adventitious roots, mm]	3,0±0,15	11,8±1,09*	12,1±1,03*	13,2±1,18*
18-й месяц [Eighteenth month]				
Длина, мм [Length, mm]	9,4±1,26	15,4±1,50*	14,6±1,69*	16,8±1,18*
Ширина, мм [Width, mm]	7,2±1,34	9,2±1,17	9,3±1,08	11,2±1,25*
Длина побега, мм [Shoot length, mm]	41,4±3,24	42,9±3,33	63,5±5,16*	44,3±3,15
Длина придаточных корней, мм [The length of adventitious roots, mm]	11,1±0,61	34,8±1,79*	36,2±1,32*	32,0±1,72*

* Статистическая значимость различий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.
[* Differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) compared to the control].

К 6-му месяцу культивирования у проторизомов появляются различия по ширине, которая в варианте с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 оказывается больше на 28%, чем в контроле. Линейные размеры проторизомов не различаются на средах с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 и с IAA, одновременно имея несколько большие значения по сравнению с контрольным вариантом. Длина формирующегося в это время ортотропного побега у проростков на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 оказывается максимальной и более чем в 2 раза превышает аналогичные показатели у проростков в контроле и варианте с IAA (см. табл. 2).

Наиболее существенные различия линейных размеров проторизомов в исследуемых вариантах опыта отмечаются к 12-му месяцу (см. табл. 2). На среде с КЖ штамма *P. brassicacearum* GRT221 их длина на 42%, а ширина на 32% больше по сравнению с контролем. Проторизомы на средах с КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и IAA не различаются по длине, однако их ширина на 24% больше в варианте с КЖ. К этому времени длина ортотропного побега у проростков существенно увеличивается и оказывается на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 на 40% выше, чем в контроле. При этом длина ортотропного побега у проростков на средах с IAA и КЖ *P. brassicacearum* GRT221 статистически значимо ($p \leq 0,05$) не различается. Придаточные корни у проростков формируются к

12-му месяцу, и их длина на среде с КЖ исследуемых штаммов бактерий и IAA в 4 раза выше по сравнению с контролем.

При дальнейшем культивировании (к 18-му месяцу) линейные размеры проторизомов в исследованных вариантах опыта меняются незначительно при активизации процессов органогенеза, связанных с активным формированием ортотропных побегов и придаточных корней. Так, у проростков на среде с КЖ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 длина ортотропного побега оказывается максимальной и превышает более чем на 30% значения в других вариантах опыта (см. табл. 2). Темпы прироста и абсолютные значения длины придаточных корней во всех опытных вариантах являются довольно сходными, превышая контрольные значения в 3 раза.

Таким образом, ризосферные микроорганизмы и соединения, которые они выделяют, представляют собой ценные биостимуляторы и имеют существенное значение в регуляции жизнедеятельности растений [1]. Использование ассоциативных бактерий и / или их экзометаболитов может быть эффективной стратегией для управления ростом и развитием растений в культуре *in vitro*. Нами впервые показано положительное влияние двух КЖ ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы растения-хозяина, на прорастание семян, морфогенез и рост *D. incarnata* в культуре *in vitro*. Прорастание семян в этом случае происходило в отсутствие каких-либо экзогенных растительных гормонов или стимуляторов роста, которые обычно добавляют в среду. Можно предположить, что стимулирующее влияние КЖ бактерий рода *Pseudomonas* связано с присутствием в их составе ауксинов. Как известно, экзогенная обработка ауксинами вызывает целый ряд изменений показателей роста. Они участвуют в стимуляции образования придаточных корней, формировании разных типов их симметрии и проводящих систем [22, 23]. По-видимому, добавление в питательную среду КЖ ассоциативных штаммов бактерий, содержащих IAA, приводит к выявленному в работе разрастанию придаточных корней проростков *D. incarnata* и приобретению ими запасающей функции. При этом содержание IAA в КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 сопоставимо с концентрацией синтетической IAA в контроле. Использованные концентрации IAA соответствуют таковым в работах по семенному размножению *in vitro* других видов орхидных [30, 31]. Однако КЖ оказывала более выраженный эффект на рост и развитие *D. incarnata* в условиях *in vitro*. Выявленные эффекты могут быть связаны с наличием в КЖ бактерий и иных физиологически активных соединений, например сидерофоров, ацилгомосеринлактонов и др. [1, 3, 4, 32].

Данное исследование расширяет наши знания о взаимодействии орхидных и микроорганизмов, предоставляет новые возможности применения бактериальных биостимуляторов в системах культивирования, размножения и сохранения редких видов. IAA микробного происхождения обладает высоким потенциалом для стимуляции роста и развития растений в культуре *in vitro*, ее

использование более рентабельно по сравнению с синтетическими гормонами.

Заключение

Таким образом, впервые проведено изучение влияния двух КЖ ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы генеративных особей *D. incarnata*, на прорастание семян, морфогенез и рост пальчатокоренника мясокрасного в культуре *in vitro*. Использование КЖ ассоциативных бактерий – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 и *P. brassicacearum* GRT221, выделенных из ризосферы *D. incarnata*, в качестве дополнительных биологически активных компонентов модифицированной питательной среды Кнудсона можно считать эффективным для ускорения прорастания зрелых семян и повышения их всхожести, увеличения темпов развития проростков, линейных размеров формирующихся ортотропного побега и придаточных корней, накопления сырой массы. Наиболее выраженное стимулирующее действие отмечено для КЖ штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225, что открывает перспективы его применения в технологии культивирования *in vitro* редких и охраняемых видов орхидных средней полосы европейской части России для их сохранения и воспроизводства.

Литература

1. Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture // Front Plant Sci. 2018. Vol. 9. P. 1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473
2. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots // Microbiology. 2005. Vol. 74, № 1. PP. 46–53. doi: 10.1007/s11021-005-0027-6
3. Bhattacharya A. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (III) chelation // Cey. J. Sci. (Bio. Sci.). 2010. Vol. 39, № 2. PP. 147–155. doi: 10.4038/cjsbs.v39i2.3001
4. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Исследование содержания биологически активных веществ в культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* при хранении // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2012. Т. 8, № 3. С. 26–30.
5. Simons M., Bij A.J.I., Brand L.A.W., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J.J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria // MPMI. 1996. № 9. PP. 600–607. doi: 10.1094/mpmi-9-0600
6. Сидоренко О.Д. Действие ризосферных псевдомонад на урожайность сельскохозяйственных культур // Агрохимия. 2001. № 8. С. 56–62.
7. Ali B., Hasnain S. Potential of bacterial indoleacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture // Letters in Applied Microbiology. 2007. Vol. 45. PP. 128–133. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02158.x
8. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Действие культуральной жидкости бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на развитие семян пшеницы и фитопатогенных грибов // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. 2012. Вып. 3. С. 198–206.

9. Саламатова Ю.А., Минаева О.М., Акимова Е.Е. Эффективность хранения ряда бактериальных препаратов в жидкой форме // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2010. № 1 (9). С. 20–28.
10. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G., Netrusov A.I. Bacteria, associated orchid roots and microbial production of auxin // Microbiol. Res. 2007. Vol. 162. PP. 69–76. doi: 10.1016/j.micres.2006.07.014
11. Шеховцова Н.В., Первушина К.А., Маракаев О.А., Холмогоров С.В., Осипов Г.А. Микроорганизмы, ассоциированные с подземными органами орхидных средней полосы России // Проблемы агрохимии и экологии. 2010. № 4. С. 30–36.
12. Knudson L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds // Bot Gazette. 1922. Vol. 73. PP. 1–25.
13. Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithamparam K. *et al.* Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria // Plant Soil. 1994. Vol. 159. PP. 291–295. doi: 10.1007/BF00009292
14. Teixeira J.A., Tsavkelova E.A., Zeng S., Tzi Bun Ng., Parthibhan S., Dobránszki J., Cardoso J., Rao M.V. Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development // Planta. 2015. Vol. 242, № 1. PP. 1–22. doi: 10.1007/s00425-015-2301-9
15. Pavlova A.S., Leontieva M.R., Smirnova T.A., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I., Tsavkelova E.A. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. J // Appl Microbiol. 2017. Vol. 123, № 1. PP. 217–232. doi: 10.1111/jam.13481
16. Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). М. : Товарищество научных изданий КМК, 2014. 437 с.
17. Вахрамеева М.Г. Род Пальчатокоренник // Биологическая флора Московской области. М., 2000. Вып. 14. С. 55–86.
18. Маракаев О.А. Семейство Орхидные – Orchidaceae // В: Красная книга Ярославской области / под ред. М.А. Нянковского. Ярославль : Академия 76, 2015. С. 114–138.
19. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. Киев : Наукова думка, 1986. 197 с.
20. Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание. М. : Геос, 2012. 352 с.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. М. : Высшая школа, 1990. 352 с.
22. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development // Annu Rev Plant Biol. 2010. Vol. 61. PP. 49–64. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112308
23. Saini S., Sharma I., Kaur N., Pati P.K. Auxin: a master regulator in plant root development // Plant Cell Rep. 2013. Vol. 32, № 6. PP. 741–757. doi: 10.1007/s00299-013-1430-5
24. Faria D.C., Dias A.C., Melo I.S., de Carvalho Costa F.E. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth // World J Microbiol Biotechnol. 2013. Vol. 29, № 2. PP. 217–221. doi: 10.1007/s11274-012-1173-4
25. Шеховцова Н.В., Маракаев О.А., Первушина К.А., Холмогоров С.В., Цапляева К.Г. Образование ауксинов эндофитными бактериями подземных органов *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) // Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. № 12(131). С. 366–368.
26. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Прорастание семян и развитие проростков *in vitro* у некоторых орхидных умеренной зоны // Экология и интродукция растений на Урале. Свердловск: УрО АН СССР, 1991. С. 39–43.
27. Андронова Е.В., Батыгина Т.Б., Васильева Е.В. Протокорм // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / под ред. Т.Б. Батыгиной, СПб., 2000. С. 324–329.

28. Иванников Р.В. Обусловленность морфогенеза первичного протокорма орхидных // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. 2008. Вып. 9. С. 76–85.
29. Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // The Plant Cell. 2015. Vol. 27, № 1. PP. 44–63. doi: 10.1105/tpc.114.133595
30. Nongdam P., Tikendra L. Establishment of an efficient *in vitro* regeneration protocol for rapid and mass propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. using seed culture // Scientific World Journal. 2014. Vol. 2014. PP. 1–8. doi: 10.1155/2014/740150
31. Deb C.R., Temjensangba I. *In vitro* propagation of threatened terrestrial orchid, *Malaxis khasiana* Soland ex. Swartz through immature seed culture // Indian J. Exp Biol. 2006. Vol. 44, № 9. PP. 762–766.
32. Зайцева Ю.В., Сидоров А.В., Маракаев О.А, Хмель И.А. Растительно-микробные взаимодействия с участием Quorum Sensing регуляции // Микробиология. 2019. № 88 (5). С. 519–531. doi: 10.1134/S0026261719040131

Поступила в редакцию 04.06.2020 г.; повторно 06.08.2020 г.; принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:
Сидоров Андрей Владимирович – ассистент кафедры ботаники и микробиологии, факультет биологии и экологии, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова (Россия, 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14).
E-mail: sidan43@yandex.ru
Зайцева Юлия Владимировна – канд. биол. наук, доцент кафедры ботаники и микробиологии, факультет биологии и экологии, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова (Россия, 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14).
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-9522-010X
E-mail: zjv9@mail.ru
Маракаев Олег Анатольевич – канд. биол. наук, доцент кафедры ботаники и микробиологии, факультет биологии и экологии, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова (Россия, 150003, г. Ярославль, ул. Советская, 14).
ORCID iD: http://orcid.org/0000-0002-7685-3275
E-mail: marakaev@uniyar.ac.ru

Для цитирования: Сидоров А.В., Зайцева Ю.В., Маракаев О.А. Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro* // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 6–24. doi: 10.17223/19988591/51/1

For citation: Sidorov AV, Zaytseva YV, Marakaev OA. Effect of supernatant of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* on germination, morphogenesis and growth of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) *in vitro*. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:6-24. doi: 10.17223/19988591/51/1 In Russian, English Summary

Andrey V. Sidorov, Yulia V. Zaytseva, Oleg A. Marakaev

P.G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russian Federation

Effect of supernatant of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* on germination, morphogenesis and growth of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) *in vitro*

No studies on the influence of supernatant of associative bacteria on the growth and development of orchid temperate climate of the northern hemisphere *in vitro* have been conducted to date. However, it is necessary to develop technologies for the cultivation

of rare and protected species *in vitro* using biologically active components of culture media. The aim of this research was to assess the effect of two supernatants of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* from the rhizosphere of generative individuals of *Dactylorhiza incarnata* on seed germination, morphogenesis and seedling growth of this species *in vitro*, a representative of orchids in the middle part of the European part of Russia.

We isolated bacteria of the genus *Pseudomonas* (*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 and *P. brassicacearum* GRT221) from the rhizosphere of generative individuals of *D. incarnata*, growing in a sedge-herb community in the middle zone of the European part of Russia (Yaroslavl region). Molecular genetic analysis of the nucleotide sequences of 16S rRNA genes was used to identify the strains. Bacteria were grown on LB medium with constant stirring for 5-7 days at 30 ºC. Supernatant was obtained by separation of the bacterial mass by centrifugation (5000 rpm, 20 min, at 4 °C). The content of IAA in supernatant was determined by the Salkovsky method [Tsavkelova EA et al, 2007]. For supernatant strain *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225, this parameter was 18.2±1.30 mg/l, for *P. brassicacearum* GRT221 it was 31.1±1.94 mg/l. We carried out the study according to the following scheme: 1) a modified Knudson nutrient medium (control); 2) the same with IAA 1.75 mg/l (10 µM); 3) the same with supernatant *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 (10% of volume); 4) the same with supernatant *P. brassicacearum* GRT221 (10% of the volume). Crops of seeds were cultivated for 2 months in the dark and 16 months in the light (2000 lux, 16 h). Seed germination was judged by the amount of proto-feeds formed. The number of germinated seeds was determined at the 3rd, 6th, 12th and 18th months of cultivation by the number of formed protocorms. Full germination of seeds was determined by the number of seedlings 18 months after sowing. We distinguished a protosome and a juvenile plant when describing morphogenesis [Kolomeytseva GL et al, 2012]. The morphophysiological parameters of the seedlings (linear dimensions of protosomes, shoots and adventitious roots, the wet weight of seedlings) were determined at the 3rd, 6th, 12th and 18th months of cultivation.

We revealed a stimulating effect of supernatant of *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225 and *P. brassicacearum* GRT221 for the germination of mature seeds of *D. incarnata in vitro* (*See Fig. 2*). Moreover, the effect of the first supernatant is 27% more effective compared to the second supernatant and is expressed in an increase in the number of sprouted seeds in relation to the control 5 times and in the test with IAA 1.8 times. *D. incarnata* seedlings on nutrient media with a supernatant are characterized by accelerated rates of development (*See Fig. 3*). This is confirmed by the early and active formation of protorizomes, orthotropic shoots and accessory roots. The effect of the supernatant of the strain *P. brassicacearum* GRT221 coincides with the action of IAA. On a medium with supernatant *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225, more seedlings with photosynthetic leaf - juvenile plants are formed by the 18th month (*See Fig. 1f*). The growth parameters of *D. incarnata* seedlings on nutrient media with a supernatant are high (*See Table 1 and 2*). For linear sizes of protorizomes, this was noted from the 3rd month and amounts to 20-30% compared with the control. Orthotropic shoot growth is most pronounced in seedlings on a medium with supernatant *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. Its length is 30% more than the corresponding values in other tests. On the same medium, seedlings have the maximum wet weight.

Thus, the use of supernatant of associative bacteria is effective for accelerating the germination of mature seeds, increasing their germination, the rate of development of seedlings, the size of the orthotropic shoot and adventitious roots, as well as the accumulation of fresh mass. The maximum stimulating effect is shown for the supernatant of *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* GRP225. This opens up prospects for

its use *in vitro* cultivation of rare and protected orchid species of the middle zone of the European part of Russia for their conservation and reproduction.

The paper contains 3 Figures, 2 Tables and 32 References.

Key words: *Pseudomonas*; Orchidaceae; protocorm; juvenile plant; supernatant; indole-3-acetic acid.

Funding: This work was partially supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education (Project No 0856-2020-0008).

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front Plant Sci*. 2018;9:1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473
2. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*. 2005;74(1):46-53. doi: 10.1007/s11021-005-0027-6
3. Bhattacharya A. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (III) chelation. *Cey. J. Sci.* (*Bio. Sci.*). 2010;39(2):147-155. doi: 10.4038/cjsbs.v39i2.3001
4. Burova YA, Ibragimova SA, Revin VV. Study of content of biologically active substances in the culture medium bacterium *Pseudomonas aureofaciens* under storage. *Vestnik biotehnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova = Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2012;8(3):26-30. In Russian
5. Simons M, Bij AI, Brand LW, Wijffelman CA, Lugtenberg BJ. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *MPMI*. 1996;9:600-607. doi: 10.1094/mpmi-9-0600
6. Sidorenko OD. Deystvie rizosfernykh psevdomonad na urozhaynost' sel'skokhozyaystvennykh kul'tur [The effect of rhizospheric pseudomonads on crop yields]. *Agrokhimiya = Agrochemistry*. 2001;8:56-62. In Russian
7. Ali B, Hasnain S. Potential of bacterial indoleacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture. *Letters in Applied Microbiology*. 2007;45:128-133. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02158.x
8. Burova YA, Ibragimova SA, Revin VV. Deystvie kul'tural'noy zhidkosti bakteriy *Pseudomonas aureofaciens* na razvitie semyan pshenitsy i fitopatogennykh gribov [The study of the culture fluid of bacteria *Pseudomonas aureofaciens* on the development seeds of wheat and phytopathogens]. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki = Izvestiya Tula State University. Natural sciences*. 2012;3:198-206. In Russian
9. Salamatova YA, Minaeva OM, Akimova EE. Effectiveness of storing some bacterial preparations in liquid form. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2010;1(9):20-28. In Russian, English Summary
10. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. Bacteria, associated orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res*. 2007;162:69-76. doi: 10.1016/j.micres.2006.07.014
11. Shekhovtsova NV, Pervushina KA, Marakaev OA, Kholmogorov SV, Osipov GA. Mikroorganizmy, assotsiirovannye s podzemnymi organami orkhidnykh sredney polosy Rossii [Microorganisms associated with underground organs of Central Russia ORCHIDACEAE]. *Problemy Agrohimii i Ekologii*. 2010;4:30-36. In Russian
12. Knudson L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gazette*. 1922;73:1-25.
13. Wilkinson KG, Dixon KW, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant Soil*. 1994;159:291-295. doi: 10.1007/BF00009292

14. Teixeira JA, Tsavkelova EA, Zeng S, Tzi Bun Ng, Parthibhan S, Dobránszki J, Cardoso J, Rao MV. Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*. 2015;242(1):1-22. doi: 10.1007/s00425-015-2301-9
15. Pavlova AS, Leontieva MR, Smirnova TA, Kolomeitseva GL, Netrusov AI, Tsavkelova EA. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. *J. Appl Microbiol*. 2017;123(1):217-232. doi: 10.1111/jam.13481
16. Vakhrameeva MG, Varlygina TI, Tatarenko IV. Orkhidnye Rossii (biologiya, ekologiya i okhrana) [Orchids of Russia: Biology, ecology and protection]. Moscow: KMK Scientific Press LTD; 2014. 437 p. In Russian
17. Vakhrameeva MG. *Dactylorhiza*. In: *Biologicheskaya flora Moskovskoy oblasti* [Biological flora of Moscow region]. Pavlov VN, editor. Moscow: "Grif i Ko" Publ.; 2000. Iss. 14. pp. 55-68. In Russian
18. Marakaev OA. Orchidaceae. In: *Krasnaya kniga Yaroslavskoy oblasti* [The Red Data Book of the Yaroslavl region]. Nyankovskiy MA, editor. Yaroslavl: Akademiya 76 Publ.; 2015. pp. 114-138. In Russian. Available at: http://oopt.aari.ru/ref/1722 (access 25.05.2020)
19. Cherevchenko TM, Kushnir GP. Orkhidei v kul'ture [Orchids in culture]. Kiev: Naukova dumka Publ.; 1986. 197 p. In Russian
20. Kolomeytseva GL, Antipina VA, Shirokov AI, Khomutovskiy MI, Babosha AV, Ryabchenko AS. Semena orkhidey: razvitie, struktura, prorastanie [Orchid seeds: Development, structure, germination]. Moscow: Geos Publ.; 2012. 352 p. In Russian
21. Lakin GF. Biometriya [Biometry]. Moscow: Vysshaya shkola Publ.; 1990. 352 p. In Russian
22. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*. 2010;61:49-64. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112308
23. Saini S, Sharma I, Kaur N, Pati PK. Auxin: A master regulator in plant root development. *Plant Cell Rep*. 2013;32(6):741-757. doi: 10.1007/s00299-013-1430-5
24. Faria DC, Dias AC, Melo IS, de Carvalho Costa FE. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29(2):217-221. doi: 10.1007/s11274-012-1173-4
25. Shekhovtsova NV, Marakaev OA, Pervushina KA, Kholmogorov SV, Tsaplyaeva KG. Auxine production by endophytic bacteria from underground organs of *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae). *Vestnik Orenburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta*. 2011;12(131):366-368. In Russian, English Summary
26. Kulikov PV, Filippov EG. Prorastanie semyan i razvitie prorostkov *in vitro* u nekotorykh orkhidnykh umerennoy zony [Seed germination and *in vitro* seedling development in some orchid temperate zones]. *Ekologiya i introduktsiya rasteniy na Urale* [Ecology and introduction of plants in the Urals]. Sverdlovsk: UrO AN SSSR Publ.; 1991. pp. 9-43. In Russian
27. Andronova EV, Batygina TB, Vasil'eva EV. Protokorm. In: *Embriologiya tsvetkovykh rasteniy. Terminologiya i kontseptsii* [Embryology of Flowering Plants: Terminology and Concepts]. Batygina TB, editor. Saint Petersburg: Mir & Sem'ya Publ.; 2000; Vol. 3. pp. 324-329. In Russian
28. Ivannikov RV. Obuslovlennost' morfogeneza pervichnogo protokorma orkhidnykh [Conditionality of a morphogenesis of orchids primary protocorm]. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Biologiya i ekologiya = Herald of Tver State University. Series: Biology and Ecology*. 2008;9:76-85. In Russian
29. Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ. The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*. 2015;27(1):44-63. doi: 10.1105/tpc.114.133595

30. Nongdam P, Tikendra L. Establishment of an efficient *in vitro* regeneration protocol for rapid and mass propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. using seed culture. *Scientific World Journal*. 2014;2014:1-8. doi: 10.1155/2014/740150
31. Deb CR, Temjensangba I. *In vitro* propagation of threatened terrestrial orchid, *Malaxis khasiana* Soland ex. Swartz through immature seed culture. *Indian J Exp Biol*. 2006;44(9):762-766.
32. Zaytseva YuV, Sidorov AV, Marakaev OA, Khmel' IA. Plant-Microbial interactions involving quorum sensing regulation. *Mikrobiology*. 2019;88(5):519-531. doi: 10.1134/S0026261719040131

Received 04 June 2020; Revised 06 August 2020;
Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:
Sidorov Andrey V, Assistant, Department of Botany and Microbiology, Faculty of Biology and Ecology, P.G. Demidov Yaroslavl State University, 14 Sovetskaya Str., Yaroslavl 150003, Russian Federation.
E-mail: sidan43@yandex.ru
Zaytseva Yulia V, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Botany and Microbiology, Faculty of Biology and Ecology, P.G. Demidov Yaroslavl State University, 14 Sovetskaya Str., Yaroslavl 150003, Russian Federation.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-9522-010X
E-mail: zjv9@mail.ru
Marakaev Oleg A, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Botany and Microbiology, Faculty of Biology and Ecology, P.G. Demidov Yaroslavl State University, 14 Sovetskaya Str., Yaroslavl 150003, Russian Federation.
ORCID iD: http://orcid.org/0000-0002-7685-3275
E-mail: marakaev@uniyar.ac.ru